

CÍCERO NICOLINI

**ANÁLISE MOLECULAR DA ADAPTABILIDADE HOSPEDEIRA DE *Cowpea aphid-
borne mosaic virus* E CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO TYMOVÍRUS
INFECTANDO *Cassia hoffmannseggii***

**RECIFE-PE
SETEMBRO – 2011**

CÍCERO NICOLINI

**ANÁLISE MOLECULAR DA ADAPTABILIDADE HOSPEDEIRA DE *Cowpea aphid-borne mosaic virus* E CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO TYMOVÍRUS
INFECTANDO *Cassia hoffmannseggii***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Dr. Gilvan Pio Ribeiro

Co-Orientadores: Dr.^a Genira Pereira de Andrade

Prof. Dr. Tatsuya Nagata

**RECIFE-PE
SETEMBRO – 2011**

Ficha catalográfica

N644a Nicolini, Cícero
Análise molecular da adaptabilidade hospedeira de
Cowpea aphid-borne mosaic virus e caracterização de um
novo tymovírus infectando *Cassia hoffmannseggii* / Cícero
Nicolini. -- Recife, 2011.
60 f. : il.

Orientador: Gilvan Pio Ribeiro.
Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de
Agronomia, Recife, 2011.
Referências.

1. Capa protéica 2. Lava-pratos 3. Maracujazeiro
4. Feijão-caupi 5. Tymobox 6. CABMV I. Pio-Ribeiro, Gilvan,
orientador II. Título

CDD 632

ANÁLISE MOLECULAR DA ADAPTABILIDADE HOSPEDEIRA DE *Cowpea aphid-borne mosaic virus* E CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO TYMOVÍRUS INFECTANDO *Cassia hoffmannseggii*

CÍCERO NICOLINI

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 01/09/2011

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Gilvan Pio Ribeiro (UFRPE)

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Tatsuya Nagata (UnB)

Dr^a. Sandra Roberta Vaz Lira Maranhão (PNPD/CAPES)

Prof^a. Dr^a. Elvira Maria Regis Pedrosa (UFRPE)

Dr^a. Genira Pereira de Andrade (UFRPE)

**RECFE-PE
SETEMBRO – 2011**

A DEUS pela presença constante na minha vida, por sempre me mostrar o caminho certo a seguir, pela saúde, sabedoria e por mais essa conquista.

OFEREÇO

Aos meus familiares, mestres e amigos e a todos que sempre me apoiaram e incentivaram no meu crescimento pessoal e profissional.

DEDICO

Aos meus pais Tarcísio Nicolini e Maria de Fátima Nicolini (*in memoriam*) e minha irmã Cecília Nicolini, pelo amor, educação e exemplo de vida.

AGRADEÇO

AGRADECIMENTOS

- ✓ À Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela oportunidade de realização do Curso de Doutorado em Fitopatologia;
- ✓ Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo;
- ✓ Ao Professor Dr. Gilvan Pio Ribeiro pela orientação, ensinamentos sempre valiosos, pelo exemplo de trabalho, ética e responsabilidade, pela amizade e paciência em todos os momentos de nossa convivência;
- ✓ À Dr.^a Genira Pereira de Andrade pelos conselhos, incentivo e oportunidades oferecidas;
- ✓ Aos Professores da Área de Fitossanidade, Dr. Sami J. Michereff, Dr. Delson Laranjeira, Dr.^a Sônia Maria Alves de Oliveira, Dr.^a Elvira Maria Régis Pedrosa, Dr.^a Elineide Barbosa da Silveira, Dr.^a Rosa de Lima Ramos Mariano, Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara; Dr. Péricles de Albuquerque Melo Filho, Dr. Manoel G. C. Gondim Jr. e ao Dr. Hebert A. A. de Siqueira, pelos conhecimentos transmitidos e amizade;
- ✓ Ao Dr. Elliot W. Kitajima, Dr. Jorge A. M. Rezende e ao Dr. Francisco A. O. Tanaka pela acolhida, aprendizado e sugestões durante estadia na ESALQ/USP.
- ✓ Ao Prof. Dr. Tatsuya Nagata, pela dedicação e orientação em momentos fundamentais da execução do trabalho, pelo conhecimento e amizade transmitidos;
- ✓ Ao Prof. Renato de Oliveira Resende, pela oportunidade oferecida, pela boa recepção e amizade durante a estadia na UnB.
- ✓ À minha turma de doutorado: Maria Santana, Erlen Keila, Litervaldo Machado e Joyce Silva pela amizade e estudo;
- ✓ Aos meus colegas e amigos do PPGF: Rinaldo Malaquias, Marcelo Rodrigues, Valéria Sandra, Paula Radaelli, Sarah Cavalcanti, Robson Nascimento, Jean Herllington, Marcelo Cruz, Francisco Câmara, Francisco Gonçalves, Aldenir de Oliveira, Kátia Cilene, Hailson Ferreira, Frank Magno, Kamila Câmara, Isadora Fernandes, Nelson Bernardi, Leonardo Tavares, Kirley Michelly e Marco Gama pela amizade, estudo e os momentos de descontração;
- ✓ Aos funcionários da Área de Fitossanidade: Darci, Romildo, Adelmo, Maurício, Roberto Luis e Luis Coelho pela ajuda oferecida sempre que precisamos;
- ✓ A todos os demais Professores, funcionários e colegas da Área de Fitossanidade do Departamento de Agronomia, que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Páginas
AGRADECIMENTOS	v
SUMÁRIO	vi
RESUMO GERAL	vii
GENERAL ABSTRACT	viii
CAPÍTULO I – Introdução Geral	01
1. A cultura do maracujazeiro	02
1.1. Aspectos culturais e econômicos	02
1.2. Endurecimento dos frutos do maracujazeiro	03
2. A cultura do feijão-caupi	04
2.1. Aspectos culturais e econômicos	04
2.2. Mosaico de potyvírus causado pelo <i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i>	05
3. <i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i>	06
4. Doenças causadas por tymovírus no Brasil	07
4. 1. O gênero <i>Tymovirus</i>	08
5. Caracterização molecular de potyvírus e tymovírus	09
6. Referências Bibliográficas	10
CAPÍTULO II - Possible host adaptation as an evolution factor of <i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> deduced by coat protein gene analysis	15
Resumo	17
Abstract	18
Introduction	19
Materials and Methods	20
Results	22
Discussion	23
Acknowledgements	25
References	26
CAPÍTULO III - A distinct tymovirus infecting <i>Cassia hoffmannseggii</i> in Brazil	34
Resumo	35
Abstract	36
Introduction	37
Material and Methods	38
Results	41
Discussion	43
Acknowledgements	44
References	45
CONCLUSÕES GERAIS	51

RESUMO GERAL

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá. Os problemas fitossanitários especialmente as doenças ocasionadas por vírus estão entre os fatores limitantes ao aumento de produtividade e longevidade dos plantios. A principal virose do maracujazeiro no Brasil é o endurecimento dos frutos causado por *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). O CABMV também é o agente do mosaico de potyvírus em feijão-caupi, virose que provoca sérios danos nessa cultura. No Brasil, o feijão-caupi é produzido principalmente na Região Nordeste e representa fonte importante de proteína e amido para a população. Há alguns anos atrás, um potyvírus foi encontrado em Pernambuco infectando naturalmente o lava-pratos, uma leguminosa nativa da Mata Atlântica comumente encontrada nas bordas de cultivos de maracujá e feijão-caupi. No município de Paudalho foi observado um grupo de plantas de lava-pratos apresentando sintomas muito intensos com manchas amarelas nas folhas. Dessas plantas, ao ser analisadas preparações em microscópio eletrônico de transmissão, além da presença de partículas alongadas flexuosas e de inclusões cilíndricas típicas de potyvírus foram detectadas partículas isométricas em alta concentração e vesículas nas bordas dos cloroplastos, o que sugeria ser de um tymovírus. Foram realizadas análises sorológicas e seqüenciamento da capa protéica para identificação do potyvírus, assim como estudar a adaptação hospedeira a maracujazeiro e feijão-caupi, utilizando-se isolados obtidos dessas culturas. O vírus com partículas isométricas foi purificado quimicamente para produção de antissoro policlonal e submetido a estudos sorológicos, gama de hospedeiros e seqüenciamento de parte do genoma para caracterização. Concluiu-se que o potyvírus encontrado em lava-pratos é o CABMV e filogeneticamente se observou que ocorre adaptação hospedeira deste vírus em plantas das famílias Fabaceae e Passifloraceae. Para alguns isolados, a distância geográfica não foi o fator mais forte para agrupamento genético e os isolados brasileiros formam um grande grupo distinto aos de outros países. De acordo com os critérios de taxonomia, usando-se seqüência de aminoácidos da capa protéica e região conservada “tymobox”, foi determinada a presença em lava-pratos de um tymovírus, para o qual foi proposto ser uma nova espécie nomeada *Cassia yellow mosaic-associated virus* (CAYMaV).

Palavras-chaves: capa protéica, lava-pratos, maracujazeiro, feijão-caupi, tymobox, CABMV

GENERAL ABSTRACT

Brazil is the world's largest passion fruit producer. The sanitary problems, mainly diseases caused by viruses are among the limiting factors for increasing productivity and longevity of the plantations. In Brazil, passion fruit woodiness, caused by *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) is the major viral disease of this crop. CABMV is also causing agent of the potyvirus mosaic, a viral disease that produces serious damages in cowpea. This crop in Brazil is important mainly in the Northeastern region and represents a relevant source of protein and starch for the population. Some years ago, in the state of Pernambuco it was found a potyvirus naturally infecting "lava-pratos", leguminous plant native to Atlantic Forest commonly found on the margins of passionflower and cowpea crops. In the city of Paudalho it was found a group of "lava-pratos" plants presenting very intense symptoms with yellow spot on the leaves. From those plants, preparations examined in a transmission electron microscope showed the presence of elongated flexuous particles and cylindrical inclusions typical of potyvirus as well as isometric particles in high concentration and vesicles on the periphery of the chloroplasts which suggested the occurrence of a tymovirus. Serological analyses and coat protein sequencing to identify the potyvirus as well as studies on host adaptation in passionflower and cowpea, using isolates from these crops were undertaken. The virus with isometric particles was chemically purified to produce polyclonal antiserum and subjected to serological studies, host range and genome sequencing for characterization. It was concluded that the potyvirus found in "lava-pratos" is CABMV and phylogenetically observed the host adaptation of this virus to the families Fabaceae and Passifloraceae. For some strains geographical distance was not the strongest factor for genetic grouping and the Brazilian isolates form a large group distinct to other countries. According to the criteria of taxonomy, using amino acid sequence of coat protein and conserved region "tymobox", it was determined the presence of a tymovirus in "lava-pratos", for which was proposed to be a new species named Cassia yellow mosaic-associated virus (CAYMaV).

Keywords: Coat protein, lava-pratos, passionflower, cowpeas, tymobox, CABMV

CAPÍTULO I

Introdução Geral

TÍTULO DO TRABALHO: ANÁLISE MOLECULAR DA ADAPTABILIDADE HOSPEDEIRA DE *Cowpea aphid-borne mosaic virus* E CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO TYMOVÍRUS INFECTANDO *Cassia hoffmannseggii*

INTRODUÇÃO GERAL

1. A cultura do maracujazeiro

1.1. Aspectos culturais e econômicos

O maracujazeiro é uma planta tropical pertencente à família Passifloraceae e ao gênero *Passiflora*. O gênero *Passiflora* apresenta cerca de 400 espécies distribuídas em regiões tropicais, a maioria nas Américas, sendo o Brasil e a Colômbia os países com maior número de espécies (NUNES; QUEIROZ, 2007; CERVI, 1997). Oliveira et al. (1994) e Viana et al. (2003) destacam que 150 são nativas do Brasil e cerca de 60 podem ser utilizadas na alimentação humana. Contudo, poucas são cultivadas comercialmente sendo mais importantes o maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis), maracujá-roxo (*Passiflora edulis* Sims) e maracujá-amarelo ou maracujá-azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) (FISHER; REZENDE, 2008). O maracujá-amarelo é o mais conhecido, cultivado e comercializado devido à qualidade de seus frutos e ao seu maior rendimento industrial. O maracujá-roxo é muito apreciado na Austrália e na África do Sul, sendo usado para fazer suco ou consumido como fruta fresca. O maracujá-doce tem sua produção e comercialização limitada pela falta de hábito de consumo e pelo desconhecimento pela maioria da população. Ao contrário do maracujá-amarelo, o maracujá-doce é consumido exclusivamente como fruta fresca (FALEIRO et al., 2005).

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá sendo a espécie de maracujá-amarelo *P. edulis* f. *flavicarpa* a mais cultivada (NOGUEIRA et al., 2010). Segundo dados do IBGE do ano de 2009 foram produzidas 713,5 mil t em 51 mil ha. A Região Nordeste destacou-se com a maior produção nacional de 523 mil t, seguido pela Região Sudeste com 110 mil t. Os principais Estados produtores são Bahia e Ceará com 317 mil e 129 mil t respectivamente. O Estado de Pernambuco produziu 15 mil t em uma área plantada de 1,5 mil ha, obtendo produtividade de 10 t/ha, ficando abaixo da média nacional que foi de aproximadamente 14 t/ha (IBGE, 2011).

O cultivo em escala comercial do maracujá-amarelo no Brasil foi iniciado na década de 1970 e a produtividade por unidade de área vem aumentando, atingindo em 2009 14 t/ha. Essa produtividade pode ser considerada baixa, em relação ao potencial de 30 a 35 t/ha da

cultura. Vários fatores contribuem para essa baixa produtividade, entre eles os fitossanitários, especialmente as viroses (ANJOS; JUNQUEIRA; CHARCHAR, 2001).

De acordo com Anjos; Junqueira e Charchar (2001) e Fisher e Rezende (2008) há relatos de pelo menos nove viroses ocorrendo em maracujazeiro. No Brasil, até o momento, foram relatadas sete. Com vírus reconhecido pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses* - ICTV): o endurecimento dos frutos do maracujazeiro causado pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), anteriormente confundido com o *Passionfruit woodiness virus* (PWV), o mosqueamento amarelo brilhante das folhas por *Cucumber mosaic virus* (CMV) do gênero *Cucumovirus* e o mosaico amarelo das folhas por *Passion fruit yellow mosaic virus* (PFYMV) do gênero *Tymovirus*. Com vírus ainda não reconhecidos pelo ICTV: o mosaico do maracujá-roxo por *Purple granadilla mosaic virus* (PGMV), o enfezamento do maracujazeiro por *Passion fruit vein-clearing virus* (PVCV) e a pinta verde do maracujá por *Passion fruit green spot virus* (PGSV).

1.2. Endurecimento dos frutos do maracujazeiro

Segundo Fisher; Kimati e Rezende (2005) e Fisher e Rezende (2008), a cultura do maracujazeiro é afetada por problemas fitossanitários que causam prejuízos econômicos e podem até inviabilizar a produção. Estes autores relatam que o endurecimento dos frutos é a principal doença dessa cultura, reduzindo a produtividade assim como o período produtivo das plantas.

Maracujazeiros infectados apresentam sintomas de mosaico, com intensidade variável, às vezes acompanhado de bolhosidade, rugosidade e deformação do limbo foliar. As plantas afetadas normalmente apresentam crescimento reduzido. Os frutos podem ficar deformados e menores do que os produzidos por plantas sadias e o pericarpo fica com uma espessura irregular e consistência endurecida, com grande redução na cavidade da polpa (FISHER; KIMATI; REZENDE, 2005).

Inicialmente, essa doença foi atribuída a um potyvírus denominado PWV semelhante ao vírus descrito na Austrália. Posteriormente, estudos moleculares comparando seqüências do gene da capa protéica de isolados brasileiros apresentaram alta identidade genética com CABMV, indicando não ser o PWV o causador do endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Brasil (BARROS et al., 2011; NASCIMENTO et al. 2004, 2006). Na África também foi descrito o *South african passiflora virus* (SAPV) infectando esta cultura (McKERN et al., 1994; SITHOLE-NIANG et al., 1996). Estudos moleculares posteriores observaram alta identidade entre SAPV e o CABMV identificado no Brasil, indicando que o

SAPV possivelmente seja uma estirpe de CABMV (McKERN et al., 1994; SITHOLENIANG et al., 1996). Recentemente, no Japão e Taiwan, foi identificado o *East asian passiflora virus* (EAPV) infectando maracujazeiro, geneticamente diferente do PWV e CABMV, sendo reconhecido como uma nova espécie de potyvírus agente do endurecimento dos frutos (IWAI et al., 2006a, 2006b).

O CABMV é transmitido naturalmente de maneira não-persistente ou estiletar por várias espécies de afídeos como *Myzus persicae* Sulzer, *Aphis gossypii* Glover, *Toxoptera citricida* Kirkaldy entre outras e também mecanicamente através de ferramentas de poda. Transmissão por sementes não foi observada para CABMV em maracujazeiro (FISHER; KIMATI; REZENDE, 2005, FISHER; REZENDE, 2008).

O controle do endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Brasil não é satisfatório, devido à transmissão não-circulativa do vírus pelos afídeos, tornando ineficiente o controle químico do inseto vetor como método de controle da doença assim como a falta de variedades resistentes (COSTA, 1996). Novaes e Rezende (2003) observaram que tentativas de proteção cruzada com seis isolados brasileiros atenuados do vírus não foram promissoras, pois não foi observada a resistência contra a reinfecção por isolados fortes.

O uso de transgênicos para o controle do endurecimento dos frutos do maracujazeiro expressando porções do genoma viral, chamada resistência derivada do patógeno foi relatada por Alfenas et al. (2005) e por Trevisan et al. (2006). Esses autores demonstraram que o uso de plantas transgênicas pode ser um método eficiente para o controle dessa virose. Entretanto, Alfenas et al. (2005) relataram que as plantas transgênicas foram resistentes apenas ao isolado utilizado para a transformação.

2. A cultura do feijão-caupi

2.1. Aspectos culturais e conômicos

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) pertence à família Fabaceae. Um dos centros de origem com maior diversidade genética é o oeste da África e atualmente é cultivado em muitos países em desenvolvimento abrangendo as regiões dos trópicos. O feijão-caupi é importante fonte de nutriente para alimentação humana, seus grãos possuem entre 23-25% de proteína e 50-67% de amido. É uma cultura rústica suportando climas áridos sobrevivendo a condições solos secos, pois desenvolve sistema radicular profundo, desse modo suporta condições climáticas da região central da África e do Nordeste do Brasil (SINGH et al. 1997).

A produção mundial de feijão-caupi em 2009 chegou a 5,2 milhões de t em uma área de 9,9 milhões de ha com produtividade média de 526,5 Kg/ha (FAO, 2011). O maior produtor em 2009 foi a Nigéria com 2,3 milhões de t. O Brasil não aparece na lista da FAO no ano de 2009 indicando que possivelmente a produção brasileira de feijão-caupi foi contabilizada conjuntamente com feijão comum (FAO, 2011). A produção nacional de feijão-caupi em 2006 foi de 1,1 milhões de t em 2,1 milhões de ha com produtividade média de 524,7 Kg/ha. A Região Nordeste foi a maior produtora com 949,2 mil t sendo o Estado do Ceará o maior produtor com 343,7 mil t seguido pela Bahia com 233,8 mil t. O Estado de Pernambuco produziu 94,7 mil t em 238,4 mil ha com produtividade média 397,4 Kg/ha ficando abaixo da média nacional (IBGE, 2011). Segundo Lima (1988) em condições ótimas a produtividade pode chegar a 2.600 Kg/ha. A produtividade média por unidade de área do feijão-caupi obtida nos Estados Unidos em 2009 foi de aproximadamente 1,5 t/ha (FAO, 2011). Segundo Coyne et al. (2003) e Singh et al. (1997) a produtividade baixa atribuída aos maiores produtores de feijão-caupi como África e América Latina está na falta de práticas efetivas de manejos de doenças.

2.2. Mosaico de potyvírus causado pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus*

A produção de feijão-caupi brasileira também é bastante afetada por problemas fitossanitários. Segundo Pio-Ribeiro; Assis-Filho; Andrade (2005) há relatos de ocorrência de CABMV em feijão-caupi desde 1974 no Brasil e as perdas relacionadas a este vírus podem chegar a até 50% da produção dependendo da interação entre a variedade plantada e a estirpe do vírus assim como do início da infecção. Kareem e Taiwo (2007) e Taiwo et al. (2007) obtiveram até 100% de perdas quando o CABMV ocorreu em infecção mista com outras espécies virais. Lima (1988) relata que entre os vírus desta cultura estudados no Estado do Ceará o CABMV é o mais disseminado. Em plantios de feijão-caupi, pode ser disseminado através de sementes infectadas e por espécies de afídeos de maneira não-persistente como *Aphis craccivora* Koch, *A. fabae* Scopoli, *A. gossypii*, *Macrosiphum euphorbiae* Thomas, *M. persicae* entre outras. Plantas infectadas pelo CABMV apresentam um mosaico formado pela alternância de cores entre áreas do limbo foliar verdes normais e áreas cloróticas (LIMA, 1988). Este vírus é transmitido mecanicamente para uma série de espécies. No Brasil o CABMV já foi relatado infectando naturalmente espécies como amendoim (*Arachis hypogaea* L.) (PIO-RIBEIRO et al., 2000), crotalária (*Crotalaria juncea* L.) (FREITAS et al., 2002) e feijão-da-praia (*Canavalia rosea* (Sw.) DC.) (KITAJIMA et al., 2008). O vírus das manchas amarelas da cassia isolado de “lava-pratos” (*Cassia hoffmannseggii* Mart.) caracterizado por

Souto; Kitajima (1991, 1992) foi sorologicamente relacionado com diversos potyvírus que infectam feijão-caupi e feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), havendo necessidades de testes mais específicos para devida identificação desse isolado. Algumas dessas espécies funcionam como hospedeiros alternativos do CABMV servindo de fonte de inóculo para cultivos de maracujazeiro e feijão-caupi (SINGH et al. 1997).

O controle do CABMV em feijão-caupi pode ser feito através da utilização de sementes livre de vírus, eliminação de hospedeiros alternativos, controle de vetores, alteração do período e local do plantio e uso de material resistente (PIO-RIBEIRO; ASSIS-FILHO; ANDRADE, 2005).

3. Cowpea aphid-borne mosaic virus

O CABMV pertence ao gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae* a qual inclui aproximadamente 30% dos vírus de plantas conhecidos (FAUQUET et al., 2005; LÓPEZ-MOYA; GARCÍA, 2008; RIECHMANN; LAÍN; GARCÍA, 1992). Espécies do gênero *Potyvirus* possuem partícula alongada flexuosa com 680 a 900 nm de comprimento e 11 a 13 nm de largura. Seu genoma é composto por uma molécula de fita simples de RNA senso positiva com aproximadamente 10 kb de comprimento apresentando uma proteína denominada VPg ligada ao terminal 5' e uma cauda poli(A) no terminal 3' (FAUQUET et al., 2005; KNELLER; RAKOTONDRAFARA; MILLER, 2006). O genoma do CABMV apresenta uma fase de leitura aberta - *Open Reading Frame* (ORF) que codifica para a síntese de uma grande poliproteína a qual é clivada em aproximadamente 10 proteínas (ADAMS; ANTONIW; FAUQUET, 2005; CHUNG et al. 2008; URCUQUI-INCHIMA; HAENNI; BERNARDI, 2001). O mapa genômico dos potyvírus como ilustrado na Figura 1, é composto pelo *Cap* VPg no terminal 5', proteína P1-Pro, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, NIa-VPg, NIa-Pro, NIb e Capa Protéica (ADAMS; ANTONIW; FAUQUET, 2005; CHUNG et al. 2008; FAUQUET et al., 2005). Recentemente foi descrita uma pequena proteína fusionada a P3, codificada pela *Pretty Interesting Potyviridae* ORF – PIPO, sobrepondo a grande ORF (CHUNG et al. 2008). Em análise ultraestrutural de materiais infectados pelos vírus pertencentes à família *Potyviridae* observa-se a formação de inclusões citoplasmáticas cilíndricas (*cylindrical inclusions*, CI), também denominadas “cata-ventos”, no citoplasma das células infectadas (EDWARDSON; CRISTIE, 1978; EDWARDSON; CRISTIE; KO, 1984). O critério para demarcação de espécies dos potyvírus com relação ao genoma deve ter identidade da seqüência de aminoácidos da capa protéica menor que 80%, identidade da seqüência de nucleotídeos do genoma completo menor que 85% e diferentes sítios de

clivagem da poliproteína. Critérios como gama de hospedeiros, características de patogenicidade e citopatológicas, como diferentes tipos de inclusões e propriedades sorológicas podem ser usados a nível de gênero, porém, atualmente não servem para identificar espécies de potyvírus, sendo necessário seqüenciamento completo do genoma ou o gene da capa protéica (ADAMS; ANTONIW; FAUQUET, 2005; CHUNG et al. 2008; FAUQUET et al., 2005).

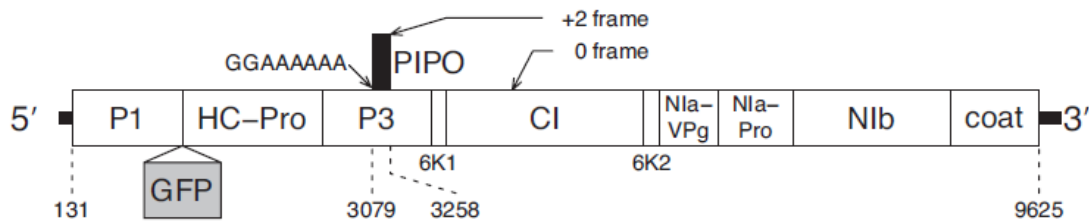


Figura 1. Representação do genoma típico dos potyvírus. No terminal 5' localiza-se o *Cap* VPg. O genoma dos potyvírus apresenta uma ORF PIPO e uma grande ORF que após replicação sofre autoproteólise e é clivada nas proteínas P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, NIa-VPg, NIa-Pro, NIB e CP. No terminal 3' os potyvírus possuem cauda de poli(A). Adaptado de Chung et al. (2008).

4. Doenças causadas por tymovírus no Brasil

No Brasil poucas espécies da família *Tymoviridae* foram descritas até o momento. Entre os primeiros isolados de tymovírus descritos está o vírus da necrose branca do tomateiro (VNBT) relatado em tomateiro por Chagas et al. (1975) e caracterizado por Barradas, (1983) e Barradas, Salas e Buitrón (1992) baseando-se em características químicas, biológicas, sorológicas e físico-químicas. Posteriormente foi definido com sendo um isolado brasileiro do *Eggplant mosaic virus* (EMV) (RIBEIRO et al., 1996; TANAKA; MACHADO; BARRADAS, 2000). O vírus do mosaico amarelo do maracujazeiro causado por PFYMV foi inicialmente relatado no Estado do Rio de Janeiro induzindo sintomas de mosaico amarelo brilhante, às vezes em forma de rede e com as folhas enrugadas em maracujá-amarelo. Foi identificado com base na transmissão mecânica e vetor, análise ultraestrutural em MET e sorologia (CRESTANI et al., 1986) Este isolado não foi relatado em nenhum outro estado do Brasil, somente na Colômbia Morales et al. (2002) observaram em maracujazeiro um isolado causando os mesmos sintomas de PFYMV sendo sorologicamente relacionado ao isolado brasileiro. No estado do Rio Grande do Sul foi isolado o vírus da faixa das nervuras da petúnia causado por *Petunia vein banding virus* (PetVBV), caracterizado por Alexandre et al.

(2000) baseando-se em transmissão mecânica e por vetor, análise ultraestrutural em MET, sorologia e critérios moleculares.

4. 1. O gênero *Tymovirus*

A família *Tymoviridae* é composta pelos gêneros *Tymovirus*, *Marafivirus* e *Maculavirus*. O gênero *Tymovirus* é o mais expressivo apresentando 23 espécies reconhecidas e duas espécies não ainda não reconhecidas pelo ICTV. As propriedades que distinguem os *Tymovirus* dos demais gêneros são derivadas do membro tipo *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV). Estes apresentam RNA genômico de fita simples senso positiva variando de 6 a 6,7 kb de comprimento (FAUQUET et al., 2005; HAENNI; DREHER, 2008; MARTELLI et al., 2002). Seu genoma apresenta uma seqüência distinta denominada “Tymobox” contendo 16 nucleotídeos que tem a função de promotor do RNA subgenômico (DING et al., 1990). A maioria das espécies apresenta estrutura secundária em forma de tRNA junto a região não traduzida – *Untranslated Region* UTR 3’ (FAUQUET et al., 2005; HAENNI; DREHER, 2008; MARTELLI et al., 2002). Seu genoma codifica três ORFs como representado na Figura 2. Uma grande ORF1 que possui seqüências de motivos conservados para metiltransferase, papain-like protease, helicase e RNA polimerase, a ORF2 é quase totalmente sobrepostas pela ORF1, não é requerida para replicação mas é importante para o movimento célula-a-célula. A ORF3 é lida como RNA subgenômico e codifica o gene da capa protéica (MARTELLI et al., 2002). Os tymovírus replicam-se em alta concentração no seu hospedeiro, podendo acumular até 0,1 mg de partículas por g de tecido. Em análise ultraestrutural em Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET), pode se observar a presença de vesículas na superfície dos cloroplastos juntamente com formação de vacúolos e agrupamento dos mesmos (HAENNI; DREHER, 2008). Nas plantas geralmente induzem sintomas de mosaico clorótico, clareamento de nervuras, e mosqueados, sem grande atrofia dos tecidos. Podem ser transmitidos mecanicamente, embora alguns apresentem gama de hospedeiros restrita e até o momento nenhum tymovírus foi isolado de monocotiledônea (ALEXANDRE et al., 2000; HAENNI; DREHER, 2008; MORALES et al., 2002; PAGÁN et al., 2010; STEPHAN et al., 2008). Na natureza é disseminado através de vetores como besouros crisomelídeos como *Diabrotica speciosa* (Germar), *D. bivitula* (Kirsch) e *Cerotoma arcuata* (Olivier) de maneira semi-persistente (CRESTANI et al., 1986; HAENNI; DREHER, 2008). Os critérios para demarcação de espécies do gênero *Tymovirus* podem ser moleculares com identidade da seqüência completa de nucleotídeos de seu genoma menor que 80%, identidade de aminoácidos da capa protéica menor que 80%, gama de hospedeiro diferencial, diferenças no

terminal 3' e especificidade sorológica (FAUQUET et al., 2005; HAENNI; DREHER, 2008; MARTELLI et al., 2002).

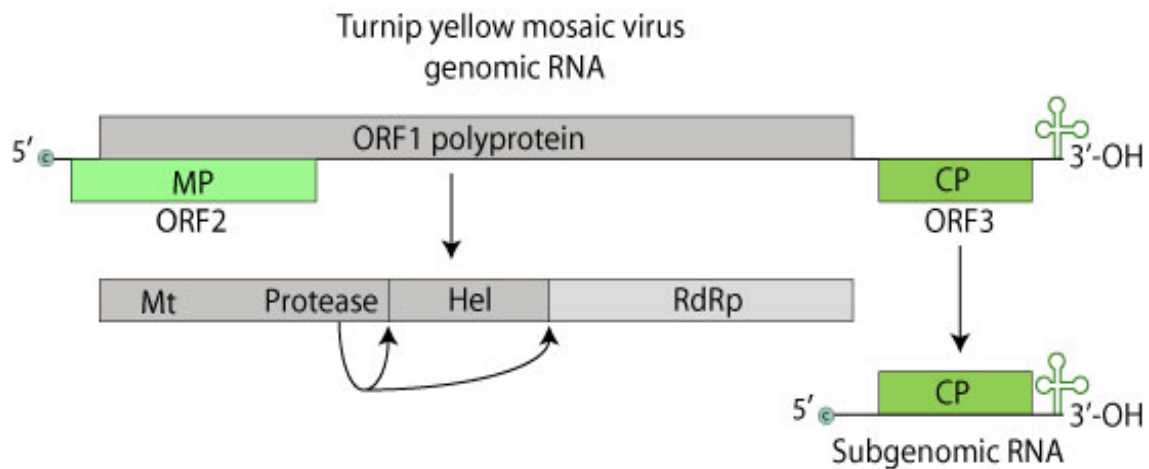


Figura 2. Representação do genoma típico dos tymovirus. A proteína RP representa a ORF1 com os motivos conservados para metil-transferase, protease, helicase e RNA dependente de RNA polimerase. A proteína OP representa a ORF2 quase totalmente sobreposta pela ORF1. A CP representa a ORF3 lida como RNA subgenômico. Após a ORF3 localiza-se a região não traduzida 3'. Adaptado de ExpASy (2011).

5. Caracterização molecular de potyvirus e tymovirus

Testes sorológicos ainda são preferenciais para detecção de potyvirus. Porém, o relacionamento sorológico entre estes é complexo, ocorrendo reações cruzadas inesperadas e não consistentes, limitando o uso da sorologia na taxonomia. O fácil resgate de seqüências genômicas, após transcrição e amplificação via reação na cadeia da polimerase – *Polimerase Chain Reaction* (RT-PCR) é atualmente o melhor caminho para identificação e estudo do genoma de vírus que infectam vegetais (LÓPEZ-MOYA; GARCÍA, 2008). Oligonucleotídeos degenerados são usados para amplificação genômica dos vírus de plantas descritos seja para diagnóstico ou taxonomia. Chen; Chen e Adams (2001) desenharam um oligonucleotídeo universal para membros da família *Potyviridae*. Através do alinhamento múltiplo obtiveram esse iniciador a partir de uma região conservada do gene N1b, sendo possível resgatar todo o terminal 3' do genoma de 21 potyvirus. Após obtenção de seqüências do genoma, pode-se fazer análises filogenéticas da ORF parcial ou completa, sendo o gene CP de grande valor para taxonomia e então separar as espécies em grupos de acordo com a identidade genética (ADAMS; ANTONIW; FAUQUET, 2005; GIBBS; OHSHIMA, 2010). Atualmente com o uso da RT-PCR em combinação com técnicas de hibridização específicas e seqüenciamento

têm levado a identificações precisas de novos vírus infectando hospedeiros diferentes (LÓPEZ-MOYA; GARCÍA, 2008).

Quanto aos tymovírus, no Brasil somente a espécie *Petunia vein banding virus* (PetVBV), descrito por Alexandre et al. (2000) teve seu genoma completamente seqüenciado, sendo posteriormente uma espécie aprovada pelo ICTV.

A estratégia de resgate do genoma de tymovírus é basicamente a mesma dos potyvírus, utilizando iniciadores específicos e degenerados e variando somente o resgate do terminal 3'. Tymovírus não possuem cauda de Poli(A) sendo necessário a adição da mesma artificialmente para posterior amplificação (KOENIG et al., 2005; PAGÁN et al., 2010).

O presente trabalho teve como objetivos: (a) identificar molecularmente ao nível de espécie o vírus da mancha amarela da Cassia descrito por Souto e Kitajima (1991, 1992); (b) caracterizar molecularmente através do seqüenciamento do gene da capa protéica vários isolados de CABMV obtidos de maracujazeiro, feijão-caupi e lava-pratos coletados nos Estado de Pernambuco e Rio Grande do Norte; (c) caracterizar um novo tymovírus obtido em lava-pratos no Estado de Pernambuco.

6. Referências Bibliográficas

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

ALEXANDRE, M. A. V.; DUARTE, L. M. L.; RIVAS, E. B.; CHAGAS, C. M.; BARRADAS, M. M. *Petunia vein banding virus*: Characterization of a new tymovirus from *Petunia x hybrida*. **Plant Disease**, Saint. Paul, v. 84, p. 739-742, 2000.

ALFENAS, P. F.; BRAZ, A. S. K.; TORRES, L. B.; SANTANA, E. N.; NASCIMENTO, A. V. S.; OTONI, W. C.; ZERBINI, F. M. Transgenic passionfruit expressing an RNA derived from *Cowpea aphid-borne mosaic virus* are resistant to passionfruit woodiness disease. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 33-38, 2005.

ANJOS, J. R. N.; JUNQUEIRA, N. T. V.; CHARCHAR, M. J. A. **Incidência e distribuição do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro no cerrado do Brasil central**. Planaltina, DF: EMBRAPA CERRADOS, 2001. 16p. (EMBRAPA-CERRADOS. Documentos, 30).

BARRADAS, M. M. **Caracterização do vírus da necrose branca do tomateiro (VNBT) e sua identificação como um Tymovirus**. 1983. 161 f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

BARRADAS, M. M., SALAS, F. J. S., BUITRÓN, I. P. G. Manutenção da infectividade de Tymovírus em extratos de plantas. **Acta Botanica Brasílica**, Feira de Santana, v. 6, n. 2, p. 15-26, 1992.

- BARROS, D. R.; ALFENAS-ZERBINI, P.; BESERRA Jr., J. E. A.; ANTUNES, T. F. S.; ZERBINI, F. M. Comparative analysis of the genomes of two isolates of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) obtained from different hosts. **Archives of Virology**, New York, v. 156, p. 1-7, 2011.
- CERVI, A.C. *Passifloraceae* do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. **Fontqueria**, Madrid, v. 45, p. 1-92, 1997.
- CHAGAS, C. M.; VICENTE, M.; JULY, J. R. Morfologia e características de um vírus causando necrose branca em tomateiro. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 42, p. 157-162, 1975.
- CHEN, J.; CHEN, J.; ADAMS, M. J. A universal PCR primer to detect members of the *Potyviridae* and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. **Archives of Virology**, New York, v. 146, p. 757-766, 2001.
- CHUNG, B. Y. W.; MILLER, W. A.; ATKINS, J. F.; FIRTH, A. E. An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. **Proceedings of National Academy of Science of USA**, Washington, v. 105, p. 5897-5902, 2008.
- COSTA, A. F. **Comportamento de *Passiflora* spp. diante do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro e a relação entre a nutrição mineral e a interação vírus-*Passiflora edulis* f. *flavicarpa***. 1996. 129 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- COYNE, D. P.; STEADMAN, J. R.; GODOY-LUTZ, G.; GILBERTSON, R.; ARNAUD-SANTANA, E.; BEAVER, J. S.; MYERS, J. R. Contributions of the Bean/Cowpea CRSP to management of bean diseases. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 80, p. 155 – 168, 2003.
- CRESTANI, O. A.; KITAJIMA, E. W.; LIN, M. T.; MARINHO, V. L. A. Passion fruit yellow mosaic virus, a new tymovirus found in Brazil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, n. 9, p. 95-955, 1986.
- DING, S. W.; HOWE, J.; KEESE, P.; MACKENZIE, A.; MEEK, D.; OSORIO-KEESE, M.; SKOTNICKI, M.; SRIFAH, P.; TORRONEN, M.; GIBBS, A. The tymobox, a sequence shared by most tymoviruses: its use in molecular studies of tymoviruses. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 5, p. 1181-1187, 1990.
- EDWARDSON, J. R.; CHRISTIE, R. G. Use of virus-induced inclusions in classification and diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 16, p. 31-55, 1978.
- EDWARDSON, J. R.; CHRISTIE, R. G.; KO, N. J. Potyviral cylindrical inclusions – Subdivision-IV. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 74, p. 1111-1114, 1984.
- ExpASy - Bioinformatics Resource Portal. ViralZone: Tymovirus. Disponível em: http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/57.html. Acesso em: 09 set. 2011.
- FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Germoplasma e melhoramentogenético do maracujazeiro – Desafios da pesquisa. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 187-210.
- FAO - Food and Agriculture Organization. FAOSTAT. Disponível em: <http://faostat.fao.org> . Acesso em: 01 ago. 2011.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. (Eds) **Virus Taxonomy**: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 8th ed. Hong Kong: Elsevier Academic Press, 2005, 1162 p.

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

FISHER, I. H.; KIMATI, H.; REZENDE, J. A. M. Doenças do maracujazeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.) Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2005. p. 467-474.

FREITAS, D. S.; MAIA, I. G.; ARRUDA, P.; VEGA, J. Molecular characterization and evolutionary relationships of a potyvirus infecting *Crotalaria* in Brazil. **Archives of Virology**, New York, v. 147, p. 411-417, 2002.

GIBBS, A.; OHSHIMA, K. Potyviruses and the Digital Revolution. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 48, p. 205-223, 2010.

HAENNI, A-L; DREHER, T. W. Timoviruses. In: MAHY, B. W. J.; VAN REGENMORTEL, M. H. V. (Eds.). **Encyclopedia of Virology**. 3rd ed. San Diego: Academic Press, 2008. v. 5, p. 199-207.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?z=1613>> Acesso em: 01 ago. 2011.

IWAI, H.; TERAHARA, R.; YAMASHITA, Y.; UEDA, S.; NAKAMURA, M. Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of an Amami-O-shima strain of East Asian *Passiflora* potyvirus. **Archives of Virology**, New York, p. 151, p. 1457-1460, 2006a.

IWAI, H.; YAMASHITA, Y.; NISHI, N.; NAKAMURA, M. The potyvirus associated with the dappled fruit of *Passiflora edulis* in Kagoshima prefecture, Japan is the third strain of the proposed new species *East Asian Passiflora virus* (EAPV) phylogenetically distinguished from strains of *Passion fruit woodiness virus*. **Archives of Virology**, New York, v. 151, p. 811-818, 2006b.

KAREEM, K. T.; TAIWO, M. A. Interactions of viruses in Cowpea: effects on growth and yield parameters. **Virology Journal**, London, v. 4, n. 15, p. 1-7, 2007.

KITAJIMA E. W.; ALCÂNTARA, B. K.; MADUREIRA, P. M.; ALFENAS-ZERBINI, P.; REZENDE, J. A. M.; ZERBINI, F. M. A mosaic of beach bean (*Canavalia rosea*) caused by an isolate of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) in Brazil. **Archives of Virology**, New York, v. 153, p. 743-747, 2008.

KNELLER, E. L.; RAKOTONDRAFARA, A. M.; MILLER, W. A. Cap-independent translation of plant viral RNAs. **Virus Research**, Amsterdam, v. 119, p. 63-75, 2006.

KOENIG, R.; PLEIJ, C. W. A.; LESEMANN, D. E.; LOSS, S.; VETTEN, H. J. Molecular characterization of isolates of anagryis vein yellowing virus, plantago mottle virus and scrophularia mottle virus – comparison of various approaches for tymovirus classification. **Archives Virology**, New York, v. 150, p. 2325-2338, 2005.

LIMA, J. A. A. Vírus que infectam o caupi no Brasil. In: ARAÚJO, J. P. P.; WATT, E. E. (Orgs.). **O caupi no Brasil**. Brasília: IITA/EMBRAPA, 1988. cap 18, p. 507-545.

- LÓPEZ-MOYA, J. J.; GARCÍA, J. A. Potyviruses. In.: MAHY, B. W. J.; VAN REGENMORTEL, M. H. V. (Eds.). **Encyclopedia of Virology**. 3rd ed. San Diego: Academic Press, 2008.v. 5, p.313-322.
- MARTELLI, G. P.; SABANADZOVIC, S.; ABOU GHANEM-SABANADZOVIC, N.; EDWARDS, M. C.; DREHER T. The family *Tymoviridae*. **Archives of Virology**, New York, v. 147, n. 9, p. 1837-1846, 2002.
- McKERN, N. M.; STRIKE, P. M.; BARNETT, O. W.; DIJKSTRA, J.; SHUKLA, D. D.; WARD, C. W. *Cowpea aphid borne mosaic virus*-Morocco and South African *Passiflora* virus are strains of the same potyvirus. **Archives of Virology**, New York, v. 136, p. 207-217, 1994.
- MORALES, F. J.; LOZANO, I.; CASTAÑO, M.; ARROYAVE, J.; VELASCO, A. C.; VARON, F. Partial Characterization of a Tymovirus Infecting Passion Fruit in Colombia, South America. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 150, p. 292–296, 2002.
- NASCIMENTO, A. V. S.; SANTANA, E. N.; BRAZ, A. S. K.; ALFENAS; P. F.; PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G. P.; CARVALHO, M. G.; ZERBINI, F. M. *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. **Archives of Virology**, New York, v. 151, p. 2102-2102, 2006.
- NASCIMENTO, A. V. S.; SOUZA, A. R. R.; ALFENAS, P. F.; ANDRADE, G. P.; CARVALHO, M. G.; PIO-RIBEIRO, G.; ZERBINI, F. M. Análise filogenética de potyvirus causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Nordeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, 378-383, 2004.
- NOGUEIRA FILHO, G. C.; RONCATTO, G.; RUGGIERO, C.; OLIVEIRA, J. C.; MALHEIROS, E. B. Estudo da enxertia hipocotiledonar do maracujazeiro-amarelo sobre dois porta-enxertos, através da microscopia de varredura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 647- 652, 2010.
- NOVAES, Q. S. D.; REZENDE, J. A. M. Selected mild strains of *Passion fruit woodiness virus* (PWV) fail to protect pre-immunized vines in Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, p. 699-708, 2003.
- NUNES, T. S.; QUEIROZ, L. P. Uma nova espécie de *Passiflora* L. (*Passifloraceae*) para o Brasil. **Acta Botanica. Brasilica**, São Paulo, v. 21, n. 2, 2007.
- OLIVEIRA, J. C.; NAKAMURA, K.; MAURO, A. O.; CENTURION; M. A. P. C. Aspectos gerais do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A. R. (Ed.) **Maracujá: produção e mercado**. Vitória da Conquista: Universidade Estadual do Sudeste da Bahia, 1994, p.27-37.
- PAGÁN, I.; BETANCOURT, M.; MIGUEL, J.; PIÑERO, D.; FRAILE, A.; GARCÍA-ARENAL, F. Genomic and biological characterization of chiltepín yellow mosaic virus, a new tymovirus infecting *Capsicum annuum* var. *aviculare* in Mexico. **Archives of Virology**, New York, v. 155, p. 675–684, 2010.
- PIO-RIBEIRO, G.; ASSIS FILHO, F. M.; ANDRADE, G. P.. Doenças do caupi. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Eds.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, p.215-222.
- PIO-RIBEIRO, G.; PAPPU, S. S.; PAPPU, H. R.; ANDRADE, G. P.; REDDY, D. V. R. Occurrence of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* in Peanut in Brazil. **Plant Disease**, Saint

Paul, v. 84, p. 760-766, 2000. RIBEIRO, S. G.; KITAJIMA, E. W.; OLIVEIRA, C. R. B.; KOENIG, R. A strain of *Eggplant mosaic virus* isolated from naturally infected tobacco plants in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 80, n. 4, p. 446-449, 1996.

RIECHMANN, J. L.; LAÍN, S.; GARCÍA, J. A. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. **Journal of General Virology**, London, v. 73, p.1-16, 1992.

SINGH, B. B.; MOHAN RAJ, D. R.; DASHIELL, K. E.; JACKAI, L. E. N. (Eds) **Advances in cowpea research**. Ibadan: JIRCAS/IITA, 1997. 375 p.

SITHOLE-NIANG, D. D.; NYATHI, T.; MAXWELL, D. P.; CANDRESSE, T. Sequence of the 3' terminal of a Zimbabwe isolate of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). **Archives of Virology**, New York, v. 141, p. 935-943, 1996.

SOUTO, E. R.; KITAJIMA, E. W. Propriedades biológicas de um Potyvirus isolado de "lava pratos" (*Cassia hoffmannseggii*) procedentes de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 16, p. 256-259, 1991.

SOUTO, E. R.; KITAJIMA, E. W. Purificação do vírus das manchas amarelas da Cassia, eletroforese de proteínas e sorologia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 17, p. 292-301, 1992.

STEPHAN, D.; SIDDIQUA, M.; HOANG, A. T.; ENGELMANN, J.; WINTER, S.; MAISS, E. Complete nucleotide sequence and experimental host range of *Okra mosaic virus*. **Virus Genes**, Norwell, v. 36, n. 1, p. 231-240, 2008.

TAIWO, M. A.; KAREEM, K. T.; NSA, I. Y.; HUGHES, J. D'A. Cowpea viruses: Effect os single and mixed infections on symptomatology and virus concentration. **Virology Journal**. v. 4, n. 15, p. 1-5, 2007.

TANAKA, F. A. O.; MACHADO, S. R.; BARRADAS, M. M. Análise ultra-estrutural de folhas de três espécies de Solanáceas após inoculação com o vírus da necrose branca do tomateiro (VNBT) – Tymovirus). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 161 – 167, 2000.

TREVISAN, F.; MENDES, B. M. J.; MACIEL, S. C.; VIEIRA, M. L. C.; MELETTI, L. M. M. A.; REZENDE, J. A. M. Resistance to *Passion fruit woodiness virus* in transgenic passionflower expressing the virus coat protein gene. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, p. 1026-1030, 2006.

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

VIANA, A. P.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; SOUZA, M. M.; MALDONADO, J. F. M.; AMARAL JÚNIOR, A. T. Diversidade genética entre genótipos comerciais de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e entre espécies de passifloras nativas determinada por marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 498-493, 2003.

CAPÍTULO II

**Possible host adaptation as an evolution factor of *Cowpea aphid-borne mosaic virus*
deduced by coat protein gene analysis**

1 **Possible host adaptation as an evolution factor of *Cowpea aphid-borne mosaic virus***
2 **deduced by coat protein gene analysis**

3

4 **Short title: Host adaptation of CABMV by CP gene analysis**

5

6 *Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade, Universidade Federal Rural de*
7 *Pernambuco, Recife, PE, Brazil*

8

9 CÍCERO NICOLINI¹, FRANCISCO A. C. RABELO FILHO¹, RENATO. O.
10 RESENDE², GENIRA. P. ANDRADE¹, ELLIOT W. KITAJIMA³, GILVAN PIO-
11 RIBEIRO¹ and TATSUYA NAGATA²

12

13 Authors' addresses: ¹ Laboratório de Fitovirologia, Departamento de Agronomia,
14 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, CEP 52171-900; ² Laboratório
15 de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília,
16 Brasília, DF, CEP 70910-900; ³ Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica
17 Aplicada a Agricultura, Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura,
18 Piracicaba, SP, CEP 13418-900.

19 (Correspondence to Tatsuya Nagata. E-mail: tatsuya@unb.br)

20

21 **Keywords:** CABMV, cowpea, passionflower, *Cassia hoffmannseggii*

22

23 **Resumo**

24 O *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) é o agente causal de importantes doenças
25 em feijão-caupi e maracujazeiro no Brasil e também em outros países. No Brasil, além desses
26 dois hospedeiros, o CABMV foi isolado de plantas leguminosas, incluindo, *Cassia*
27 *hoffmannseggii*, *Canavalia rosea*, *Crotalaria juncea* e *Arachis hypogaea*. Esse vírus parece
28 adaptar-se a dois grupos distintos de plantas pertencentes às famílias Passifloraceae e
29 Fabaceae. Com o objetivo de identificar o CABMV e elucidar a possível adaptação
30 hospedeira desta espécie de vírus, isolados de caupi, maracujazeiro e *C. hoffmannseggii* foram
31 coletados nos estados de Pernambuco e Rio Grande do Norte e analisadas por seqüenciamento
32 completo do gene da capa protéica. Foi construída uma árvore filogenética com base nas
33 seqüências obtidas e seqüências disponíveis no bancos de dados. Interessantemente, a maioria
34 dos isolados brasileiros de maracujazeiro, independentemente das distâncias geográficas entre
35 eles, foram agrupados em três grupos diferentes. Uma possível adaptação hospedeira também
36 foi observada em isolados brasileiros de CABMV infectando fabáceas. Esta adaptação
37 hospedeira parece ocorrer de forma independente dentro do Brasil e todos esses grupos
38 pertencem a um grande grupo brasileiro. Os isolados africanos que infectam maracujazeiro e
39 feijão-caupi formaram um agrupamento bastante distinto. Estes resultados mostraram que a
40 adaptação hospedeira pode ser um fator para evolução CABMV, embora o isolamento
41 geográfico seja um fator forte.

42

43 **Abstract**

44 *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) is the causal agent of major diseases in
45 cowpea and passionflower in Brazil and also in other countries. In addition to these two hosts,
46 CABMV has been isolated from leguminous plants including, *Cassia hoffmannseggii*,
47 *Canavalia rosea*, *Crotalaria juncea* and *Arachis hypogaea* in Brazil. Therefore, this virus
48 seemed to adapt in two distinct plant groups pertaining to the families Passifloraceae and
49 Fabaceae. Aiming to identify the CABMV and elucidate a possible host adaptation of this
50 virus species, isolates from cowpea, passionflower and *C. hoffmannseggii* collected in the
51 states of Pernambuco and Rio Grande do Norte were analyzed by sequencing the complete
52 coat protein genes. The phylogenetic tree was constructed based on obtained sequences and
53 those available in public databases. Interestingly, major Brazilian isolates from passionflower,
54 independently of the geographic distances among them, were grouped in three different
55 clusters. The possible host adaptation was also observed in fabaceous-infecting CABMV
56 Brazilian isolates. These host adaptations seemed to occur independently inside Brazil, hence,
57 all these clusters belonged to a bigger Brazilian cluster. Nevertheless, African passionflower
58 or cowpea-infecting isolates formed totally different clusters. These results showed that host
59 adaptation could be one factor for CABMV evolution, although the geographical isolation is
60 stronger factor.

61

62

63

64

65

66

67

68 Introduction

69 *Potyvirus* is a genus which possesses the most divergent plant virus species and causes huge
70 economical losses in the world. Its particle is filamentous of c.a. 700nm. The genome of non-
71 segmented single-stranded RNA encodes a polyprotein in a large open reading frame (ORF)
72 and PIPO protein in a short overlapping ORF, found only recently (Chung et al. 2008).

73 In Brazil, a potyviral disease in passionflower, especially in *Passiflora edulis* Sims f.
74 *flavicarpa* Deg. (Fisher and Rezende 2008) is a common problem causing woodiness
75 symptom on fruits. Based on molecular analysis, the causal agent of this disease was
76 identified as *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) (Nascimento et al. 2004, 2006;
77 Barros et al. 2011), although it had been confused as *Passionfruit woodiness virus* (PWV) for
78 long time (Fisher and Rezende 2008).

79 The *East Asian passiflora virus* (EAPV) was recognized as a woodiness inducing virus in
80 Japan and Taiwan (Iwai et al. 2006a, 2006b) and the South African passiflora virus (SAPV)
81 that causes passionfruit woodiness in Africa, was identified as a strain of CABMV (McKern
82 et al. 1994; Sithole-Niang et al. 1996).

83 By wider survey of CABMV in Brazil, several natural hosts as cowpea (*Vigna unguiculata*
84 (L.) Walp.), beach bean (*Canavalia rosea* DC.) (Kitajima et al. 2008), peanut (*Arachis*
85 *hypogaea* L.) (Pio-Ribeiro et al. 2000), sunn hemp (*Crotalaria juncea* L.) (Freitas et al. 2002),
86 “lava-pratos” (*Cassia hoffmannseggii* Mart.) (Souto and Kitajima, 1991, 1992) were
87 identified.

88 These plants may have an important role as intermediate or alternative hosts for the virus to
89 preserve the inoculum sources to passionflower, cowpea and other important crops. Despite
90 the seed transmission was shown in cowpea (Singh et al. 1997), but not in passionflower until
91 now, it is believed that the natural transmission by several species of aphids such as *Myzus*
92 *persicae* Sulzer, *Aphis gossypii* Glover, *A. spiraecola* Patch and *Toxoptera citricidus* Kirkaldy

93 is more important in cowpea and passionflower for virus dissemination (Fisher and Rezende,
94 2008).

95 In this study, based on CABMV coat protein (CP) gene sequences of isolates from cowpea,
96 passionflower and *C. hoffmannseggii* plants, obtained from Northeast of Brazil, the host
97 adaptation and geographical distribution of this virus was discussed comparing sequences
98 available in public DNA databases. Although the CP gene represents only 8 % of the genome,
99 the phylogenetic relationship based on CP gene is good substitutive measurement of the
100 complete genome (Gibbs and Ohshima, 2010).

101

102 **Materials and Methods**

103 **Virus isolates and maintenance**

104 The total of 20 CABMV isolates were collected from Pernambuco and Rio Grande do Norte
105 states in cowpea, passionflower and *C. hoffmannseggii* plants showing typical virus
106 symptoms. The isolates were maintained in the green house by mechanical inoculation to
107 cowpea seedlings, cv. Sempre Verde for cowpea and *C. hoffmannseggii* isolates and to
108 passionflower seedlings for passionflower isolates. Some of the original infected *C.*
109 *hoffmannseggii* plants were also maintained in pots under green house conditions.

110 The infections of CABMV were confirmed by ELISA and other serological assay using
111 antisera against CABMV, *Cucumber mosaic virus* (CMV) and *Cowpea severe mosaic virus*
112 (CPSMV).

113

114 **Electron microscopy**

115 Selected leaf samples were embedded in Spurr or LR-White resins and ultrathin sections were
116 prepared for the observation of viral inclusions. After contrastation of the samples, specimens
117 were observed using transmission electron microscope Zeiss model EM900.

118

119 CABMV coat protein gene sequencing

120 Leaf samples showing newly developed symptoms were collected for total RNA extraction.
121 Each sample with approximately 0.1 g of leaf was ground with liquid nitrogen in microtubes
122 and subsequently total RNA was extracted using RNA Plant Reagent (Invitrogen). The
123 complementary DNA was synthesized using M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) with
124 anchored oligodT primer (OligodT50PacIM4) (Lucinda et al. 2010). The CP gene were
125 amplified by PCR using 3' end anchor primer M4 (5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC 3') and
126 degenerated primer, Sprimer (5'-GGX AAY AAY AGY GGX CAZCC-3') (Chen et al.
127 2001), targeting complete CP genes with 3'-untranslated regions of c.a. 1.7 k bases. For this
128 reaction, Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) was used for cDNA amplification.
129 After confirmation of amplified cDNA fragments at desired size by agarose gel
130 electrophoresis, cDNA was purified by passing through column using Purelink Gel Band DNA
131 Purification Kit (Invitrogen). Internal primers were designed for direct sequence of CP gene
132 of CABMV; CAB seq1 For (5'- TGA TTG AAG CAT GGG GAT A -3'), CAB seq2 Rev (5'-
133 CTT CAG CTG CGT YTG AGA A -3') and CAB seq3 Rev (5'- TAC TGG TGG AAA ACC
134 ACA C -3'). Amplified and purified cDNA were directly sequenced at Macrogen Inc. (Seoul,
135 South Korea) using automated sequencer 3730XL (Applied Biosystems).

136

137 Sequence analysis

138 Obtained sequences were analyzed by Staden package (Bonfield et al. 1995) to filter and
139 assemble contigs. The identities of sequences were confirmed using BlastN
140 (www.ncbi.nlm.nih.gov). The multiple alignments of obtained sequences and available
141 CABMV (Fig. 3) were done using built-in ClustalW using MEGA 5 (Tamura et al. 2007). A
142 phylogenetic tree was constructed using Maximum-likelihood method with general time

143 reversible model with gamma-distributed rate variation in invariant sites (G+I) of MEGA 5
144 with bootstrap of 1000 replications.

145

146 **Results**

147 **Electron microscopy**

148 For all isolates of cowpea, passionflower and *C. hoffmannseggii* origins (Fig. 1), the same
149 types of subdivision-I cylindrical inclusions and pinwheel inclusion bodies, according to
150 Edwardson and Christie (1978) and Edwardson et al. (1984) were observed. Other types of
151 inclusion bodies and virus particles were not observed.

152

153 **Sequence identity**

154 The amplified cDNA fragments of 1.7 kb, covering the complete CP genes, were sequenced
155 using internal primers. Within the obtained sequences of 20 isolates, there was discrepancy of
156 86.6 to 100 % of nucleotide identities, and above 78.7 % when included all the other CABMV
157 isolates analyzed in this study (data not shown). The CP nucleotide sequence identities of
158 CABMV and PWV isolates were among 67.5 to 69.4%. On the other hand, the identities
159 between CABMV and SAPV were from 82 to 86%.

160

161 **Phylogenetic analysis**

162 In a phylogenetic tree constructed using Maximum-likelihood method with all obtained CP
163 gene sequences and those available in databases (Fig. 3), all Brazilian CABMV isolates
164 formed the same bigger cluster, showing the distinct geographical distribution and possible
165 host adaptation.

166 Major Brazilian isolates from passionflower were grouped into three different clusters,
167 genotype 1, 3 and 4, (Fig. 3), including a mix of isolates from different surveyed areas. For
168 example, the genotype 1 contains passionflower isolates from Pernambuco, Bahia, Paraíba,
169 Minas Gerais states and the Federal District. The most distant location was around 1600km
170 far from each other (Pernambuco and Minas Gerais states or Pernambuco and the Federal
171 District) and the other states are situated between these locations (Fig. 2, 3).

172 The possible host adaptation was also observed in fabaceous-infecting CABMV Brazilian
173 isolates genotype 5, (Fig. 3). For the genotype 5, the isolates were from the fabaceous hosts
174 cowpea, crotalaria, peanut and *C. hoffmannseggii* plants. The analyzed material showed a mix
175 of isolates from four different states, including distance of about 2500 km far from each other.
176 The genotype 2, which consisted only of isolates from *C. hoffmannseggii*, could be adapted to
177 this plant species, however, more isolates from other locations should be sequenced since all
178 isolates of *C. hoffmannseggii* were from the single municipal (Fig. 3).

179

180 **Discussion**

181 Well-known woodiness disease on passionfruit is caused by three distinct potyviruses PWV
182 (Sokhandan et al. 1997, Wylie and Jones 2011), CABMV (McKern et al. 1994; Sithole-Niang
183 et al. 1996; Nascimento et al. 2004, 2006; Barros et al. 2011) and EAPV (Adams et al. 2005;
184 Iwai et al. 2006a, 2006b). By the demarcation criteria of genus *Potyvirus* suggested by Adams
185 et al. (2005), threshold of 77% of nucleotide identities of CP gene to be considered the same
186 species. The comparison of sequence data of CABMV with PWV and SAPV available in
187 public database, confirmed that CABMV is distinct to PWV, but the same species to SAPV.
188 In Brazil, recent works have shown that the virus causing passionfruit woodiness disease is
189 CABMV (Nascimento et al. 2004, 2006, Barros et al. 2011). In this study, only CABMV
190 sequences were obtained though the RT-PCR procedure performed could recover many
191 potyvirus species (Chen et al., 2001).

192 By phylogenetic analysis, Brazilian CABMV genotype 1 consisted only of passionflower
193 isolates. This ramification did not represent totally the geographical grouping. The farthest
194 distance between isolate origins was around 1,600 km (between Pernambuco and Minas
195 Gerais states or Pernambuco and the Federal District). This clustering may happen due to
196 adaptation to passionflower plants in Brazil, forming host adapted virus strains.

197 Nine *C. hoffmannseggii* isolates were classified as genotype 2 and two isolates clustered
198 together with others fabaceous-infecting CABMV Brazilian isolates forming the genotype 5.
199 Interestingly, these isolates from *C. hoffmannseggii* and cowpea, including in genotypes 2 and
200 5, could not be mechanically transmitted to passionflower plants. Moreover, as formally
201 reported, the peanut isolate, here classified in genotype 5, was unable to infect passionflower
202 (Nascimento et al. 2004, 2006) and seem to be adapted between cowpea and peanut due to
203 intercropping of these two plants commonly used in Northeastern Brazil (Pio-Ribeiro et al.
204 2000).

205 The genotype 3 consists of two CABMV isolates obtained directly from passionflower and
206 three isolates from cucurbit (*Cucurbita pepo* L.) that has been artificially transferred from
207 passionflower (Gioria et al. 2004). These genotypes were grouped nearly genotype 4 cluster,
208 that includes isolates from São Paulo, Espírito Santo and Sergipe states. However, genotypes
209 3 and 4 most consist of isolates from São Paulo state.

210 Interestingly, these host adaptations seemed to occur independently inside Brazil, hence, all
211 smaller clusters belonged to a bigger Brazilian cluster. The African and American
212 passionflower or cowpea-infecting isolates formed totally different clusters (Zimbabwean and
213 US Cowpea cluster, South African and Kenyan passionflower cluster and Nigerian and
214 Moroccan Cowpea cluster). These results implied that the geographical isolation of CABMV
215 occurred at first and, then, the host adaptation was followed for their evolution independently
216 in each geographic region. The host adaptation was also discussed in a different potyvirus,

217 *Turnip mosaic virus* (TuMV) (Ohshima et al. 2002). They analyzed the P1 and CP genes of
218 TuMV.

219 Although isolates was grouped separately by host type, no consistent difference was found
220 in the amino acid sequences encoded in these genes. For host adaptation study of potyvirus,
221 the analysis of complete genome sequences is ideal, since the other genes were expected to be
222 more involved in host interaction. The recombination events, which is also an important factor
223 as host adaptation should be considered in whole-genome based analysis. And more directly,
224 the functional mechanism for host adaptation should be studied by reverse-genetics in future
225 study.

226

227 **Acknowledgments**

228 Authors thank to CNPq for the DSc scholarship granted to the first author (140821/2008-2).

229 The 3rd, 5th and 7th authors were financially supported by CNPq as research fellows.

230

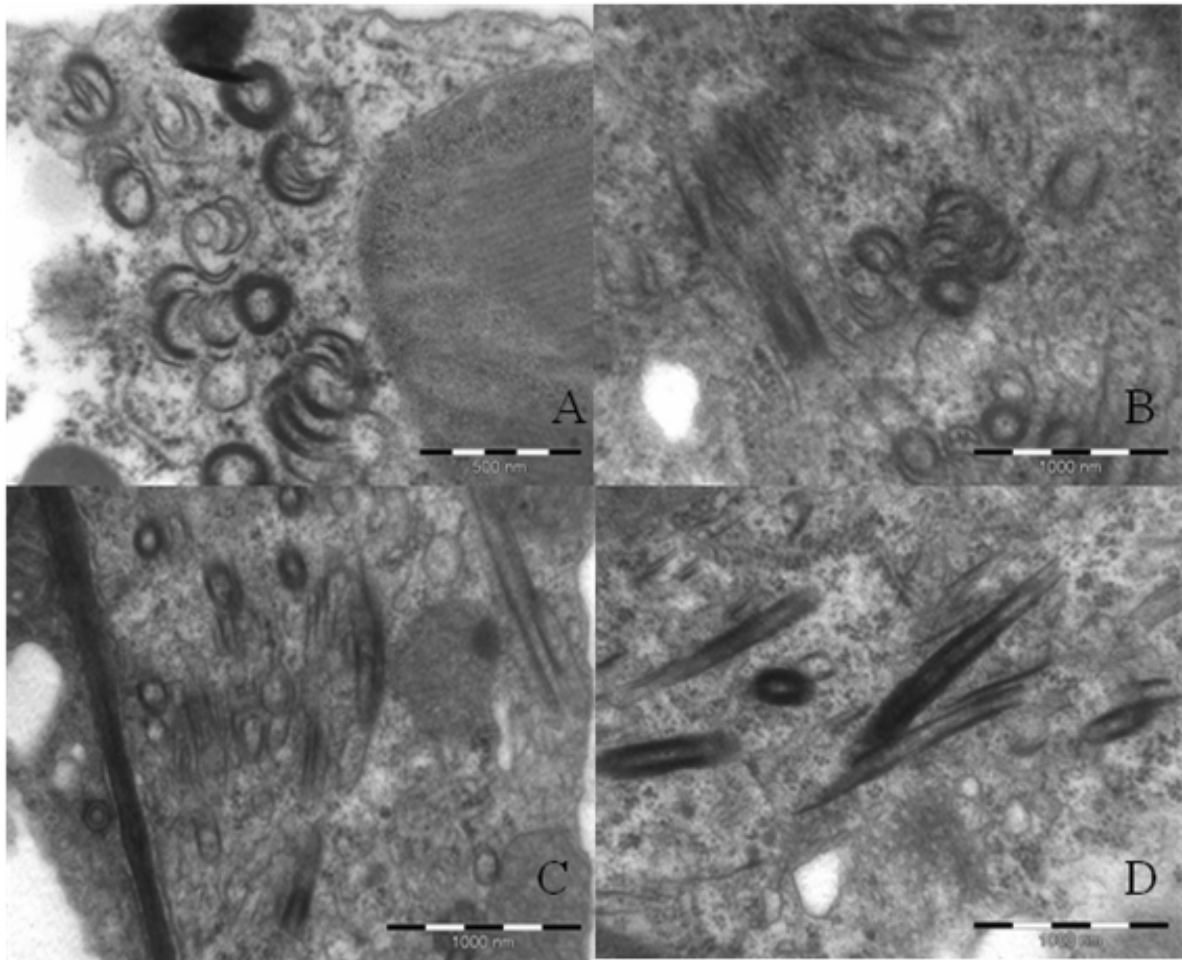
231

232 **References**

- 233 Adams MJ, Antoniw JF, Fauquet CM. (2005b) Molecular criteria for genus and species
234 discrimination within the family *Potyviridae*. *Arch Virol* **150**: 459-479.
- 235 Barros DR, Alfenas-Zerbini P, Beserra Jr JEA, Antunes TFS, Zerbini FM. (2011)
236 Comparative analysis of the genomes of two isolates of *Cowpea aphid-borne mosaic virus*
237 (CABMV) obtained from different hosts. *Arch Virol* **156**:1-7.
- 238 Bonfield JK, Smith KF, Staden R. (1995) A new DNA sequence assembly program. *Nucl*
239 *Acids Res* **23**: 4992-4999.
- 240 Chen J, Chen J, Adams MJ. (2001) A universal PCR primer to detect members of the
241 *Potyviridae* and its use to examine the taxonomic status of several members of the family.
242 *Arch Virol* **146**: 757-766.
- 243 Chung BYW, Miller WA, Atkins JF, Firth AE. (2008) An overlapping essential gene in the
244 *Potyviridae*. *Proc Nat Acad Sci USA* **105**: 5897-5902.
- 245 Edwardson JR, Christie RG, Ko NJ. (1984) Potyviral cylindrical inclusions – Subdivision-IV.
246 *Phytopathology* **74**: 1111-1114.
- 247 Edwardson JR, Christie RG. (1978) Use of virus-induced inclusions in classification and
248 diagnosis. *Annu Rev Phytopathol* **16**: 31-55.
- 249 Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. (2005) Virus Taxonomy:
250 Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Hong Kong,
251 Elsevier Academic Press.
- 252 Fischer IH, Rezende JAM. (2008) Diseases of Passion Flower (*Passiflora* spp.). *Pest Tech* **2**:
253 1-19.
- 254 Freitas DS, Maia IG, Arruda P, Vega J. (2002) Molecular characterization and evolutionary
255 relationships of a potyvirus infecting *Crotalaria* in Brazil. *Arch Virol* **147**: 411-417.
- 256 Gibbs, A, Ohshima, K (2010) Potyviruses and the Digital Revolution. *Annu Rev Phytopathol*
257 **48**:205–223.
- 258 Gioria R, Rezende JAM, Kitajima EW (2004) Caracterização biológica, sorológica e
259 molecular de uma estirpe do *Passion fruit woodiness virus* (PWV) causadora de mosqueado
260 em algumas cucurbitáceas. *Summa Phytopathol* **30**:256-264.

- 261 Iwai H, Terahara R, Yamashita Y, Ueda S, Nakamura M. (2006b) Complete nucleotide
262 sequence of the genomic RNA of an Amami-O-shima strain of East Asian *Passiflora*
263 potyvirus. *Arch Virol* **151**: 1457-1460.
- 264 Iwai H, Yamashita Y, Nishi N, Nakamura M. (2006a) The potyvirus associated with the
265 dappled fruit of *Passiflora edulis* in Kagoshima prefecture, Japan is the third strain of the
266 proposed new species *East Asian Passiflora virus* (EAPV) phylogenetically distinguished
267 from strains of *Passion fruit woodiness virus*. *Arch Virol* **151**: 811-818.
- 268 Kitajima EW, Alcântara BK, Madureira PM, Alfenas-Zerbini P, Rezende JAM, Zerbini FM.
269 (2008) A mosaic of beach bean (*Canavalia rosea*) caused by an isolate of *Cowpea aphid-*
270 *borne mosaic virus* (CABMV) in Brazil. *Arch Virol* **153**: 743-747.
- 271 Lucinda N, Inoue-Nagata AK, Kitajima EW, Nagata T. (2010) Complete genome sequence of
272 *Brugmansia suaveolens mottle virus*, a potyvirus from an ornamental shrub. *Arch Virol*
273 **155**: 1729-1732.
- 274 McKern NM, Strike PM, Barnett OW, Dijkstra J, Shukla DD, Ward CW. (1994) Cowpea
275 aphid borne mosaic virus-Morocco and South African *Passiflora* virus are strains of the
276 same potyvirus. *Arch Virol* **136**: 207-217.
- 277 Nascimento AVS, Santana EN, Braz ASK, Alfenas PF, Pio-Ribeiro G, Andrade GP, Carvalho
278 MG, Zerbini FM. (2006) *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) is widespread in
279 passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. *Arch Virol* **151**: 2102-
280 2102.
- 281 Nascimento AVS, Souza ARR, Alfenas PF, Andrade GP, Carvalho MG, Pio-Ribeiro G,
282 Zerbini FM. (2004) Análise filogenética de potyvirus causando endurecimento dos frutos
283 do maracujazeiro no Nordeste do Brazil. *Fitopatol Bras* **29**: 0-5.
- 284 Ohshima K, Yamaguchi Y, Hirota R, Hamamoto T, Tomimura K, Tan Z, Sano T, Azuhata F,
285 Walsh JA, Fletcher J, Chen J, Gera A, Gibbs A. (2002) Molecular evolution of *Turnip*
286 *mosaic virus*: evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread.
287 *J Gen Virol* **83**: 1511-1521.
- 288 Pio-Ribeiro G, Pappu SS, Pappu HR, Andrade GP, Reddy DVR. (2000) Occurrence of
289 *Cowpea aphid-borne mosaic virus* in Peanut in Brazil. *Plant Dis* **84**: 760-766.

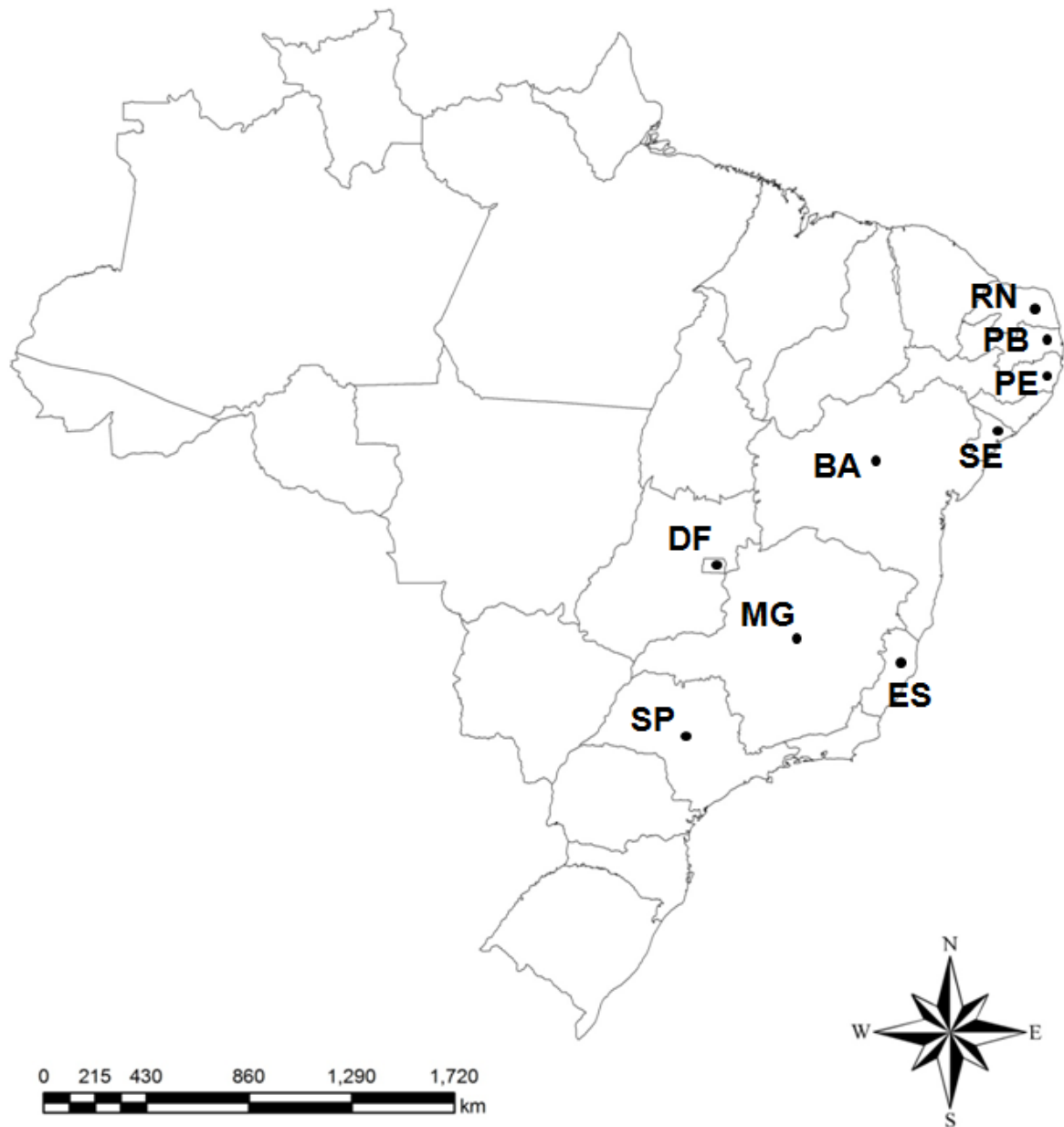
- 290 Singh BB, Mohan Raj DR, Dashiell KE, Jackai LEN (1997) Advances in cowpea Research.
291 Ibadan, JIRCAS/IITA
- 292 Sithole-Niang DD, Nyathi T, Maxwell DP, Candresse T. (1996) Sequence of the 3' terminal
293 of a Zimbabwe isolate of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). *Arch Virol* **141**:
294 935-943.
- 295 Souto ER, Kitajima EW. (1991) Propriedades biologicas de um Potyvirus isolado de "lava
296 pratos" (*Cassia hoffmannseggii*) procedentes de Pernambuco. *Fitopatol Bras* **16**: 256-259.
- 297 Souto ER, Kitajima EW. (1992) Purificação do Virus das Manchas Amarelas da Cassia,
298 Eletroforese de Proteínas e Sorologia. *Fitopatol Bras* **17**: 292-301.
- 299 Sokhandan N, Gillings MR, Bowyer JW (1997) Polimerase chain reaction detection and
300 assessment of genetic variation in New South Wales isolates of passionfruit woodiness
301 potyvirus. *Aust Plant Pathol* **26**: 155-164.
- 302 Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics
303 Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**: 1596-1599.
- 304 Wylie SJ, Jones MGK.(2011) The complete genome sequence of a *Passion fruit woodiness*
305 *virus* isolate from Australia determined using deep sequencing, and its relationship to other
306 potyviruses. *Arch Virol* **156**: 479-482.



307

308 **Figure 1.** Electron micrographs of CABMV infected plants, showing pinwheel inclusion
309 bodies. A. Cowpea isolate GSR2. B. Passionflower isolate I4-LP3. C. and D. *Cassia* isolates
310 LMN1 and PPL2, respectively.

311

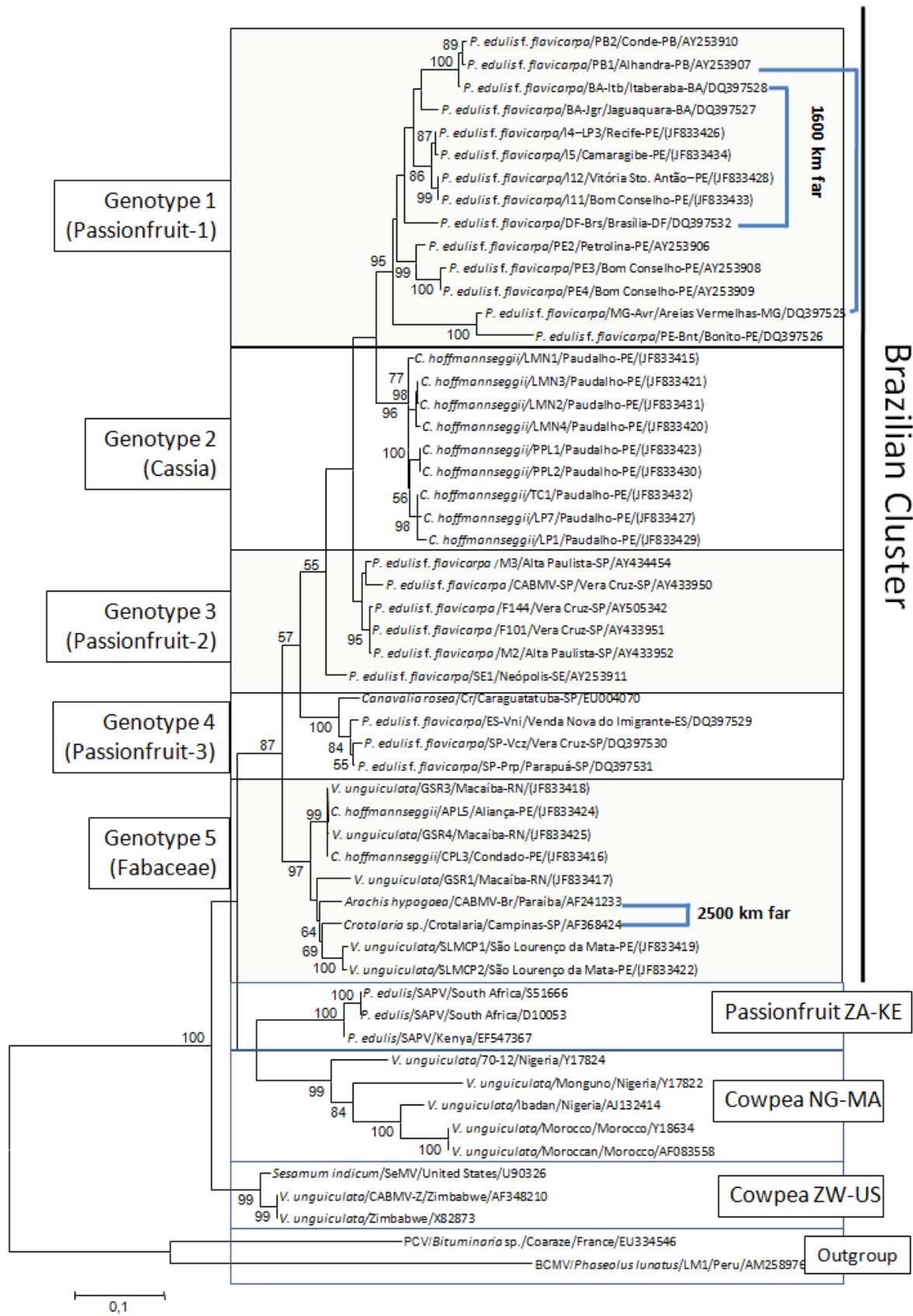


312

313

314 **Figure 2. Map of Brazil.** The states of original isolation location were indicated. RN = Rio
315 Grande do Norte state, PB = Paraíba state, PE = Pernambuco state , SE = Sergipe state, BA =
316 Bahia state, DF =The Federal District, MG =Minas Gerais state, ES = Espírito Santo state,
317 SP = São Paulo state.

318



319

320

321 **Figure 3. Phylogenetic tree based on CABMV CP genes generated by Maximum-**
322 **likelihood method.** The clusters were divided into genotypes. The main host species also
323 considered as parameter of genotyping and denoted below the genotypes. The bootstrap
324 values above 50 % were noted on the tree. The identification of the isolate shows by; original
325 host/isolate name/country name of isolation, if Brazilian, location of isolation and State
326 abbreviation/accession number (accession number with brackets were sequenced in this
327 study). BR=Brazilian isolate. The abbreviations of states were the same as above. US= United
328 States of America, ZW= Zimbabwe, KE= Kenya, ZA= South Africa, NG= Nigeria, MA=
329 Morocco, FR= France, PER= Peru. Passiflora chlorosis virus (PCV, unassigned) and *Bean*
330 *common mosaic virus* (BCMV) outgroups potyviruses more related with CABMV used in the
331 study.

332

CAPÍTULO III

A distinct tymovirus infecting *Cassia hoffmannseggii* in Brazil

1 **A distinct tymovirus infecting *Cassia hoffmannseggii* in Brazil**

2 Cícero Nicolini¹, Tatsuya Nagata², Genira Pereira de Andrade¹, Virgínia Carla de
3 Oliveira², Fernando Lucas Melo², Renato de Oliveira Resende², Elliot Watanabe
4 Kitajima³, Jorge Alberto Marques Rezende⁴ and Gilvan Pio-Ribeiro¹

5
6 *Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade, Universidade Federal Rural de*
7 *Pernambuco, Recife, PE, Brazil*

8
9 Authors' addresses:

10 ¹ Laboratório de Fitovirologia, Departamento de Agronomia, Universidade Federal
11 Rural de Pernambuco, Recife, PE, CEP 52171-900;

12 ² Laboratório de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia Celular,
13 Universidade de Brasília, Brasília, DF, CEP 70910-900;

14 ³ Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura,
15 Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura, Piracicaba, SP, CEP
16 13418-900;

17 ⁴ Laboratório de Fitovirologia, Departamento de Fitopatologia e Nematologia,
18 Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura, Piracicaba, SP, CEP
19 13418-900

20 (Correspondence to Tatsuya Nagata. E-mail: tatsuya@unb.br)

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30 **Palavras-chave:** Cassia yellow mosaic-associated virus (CYMaV), capa protéica,
31 tymobox, *Tymoviridae*

32

33 **Resumo**

34 *Cassia hoffmannseggii* é uma fabacea nativa da Mata Atlântica e foi encontrada
35 no Estado de Pernambuco - Brasil apresentando sintomas intensos de mosaico nas
36 folhas. Ao analisar em microscopia eletrônica de transmissão, dois tipos de partículas de
37 vírus foram encontrados, uma de potyvírus, que foi identificado como *Cowpea aphid-*
38 *borne mosaic virus* (CABMV), e outra isométrica, presentes em alta concentração. A
39 presença de vesículas na periferia de cloroplastos sugeriu uma infecção de tymovírus,
40 que foi confirmada por ensaios subseqüentes. Tentativas de transmissão mecânica para
41 plantas indicadoras diversas, incluindo solanáceas e fabáceas, não obtiveram sucesso.
42 Testes ELISA usando antissoros contra várias espécies de tymovírus resultou em reação
43 positiva contra *Passion fruit yellow mosaic virus* (PFYMV). Por outro lado, RT-PCR
44 usando oligonucleotídeos degenerados para tymovírus, tendo como alvo a região
45 conservada do gene RdRp produziu fragmentos amplificados de cDNA que foram
46 seqüenciados. Com base nesta seqüência, um oligonucleotídeo específico foi desenhado
47 para amplificar extremidade 3' do genoma usando protocolo 3 'RACE. O cDNA
48 amplificado foi seqüenciado com sucesso revelando a seqüência parcial do gene RdRp e
49 capa protéica (CP) completa. A CP deduzida foi de 188 aminoácidos (aa) de
50 comprimento e a maior identidade de aa obtida foi de 61% com *Kennedya yellow*
51 *mosaic virus*. Pelo critério de demarcação de espécies, este isolado foi considerado
52 como um tymovírus distinto e provisoriamente nomeado de Cassia yellow mosaic-
53 associated virus (CYMaV). A análise filogenética da CP e a seqüência da região
54 tymobox de CYMaV também foram discutidas neste estudo.

55

56 **Keywords:** Cassia yellow mosaic-associated virus (CYMaV), coat protein, tymobox,
57 *Tymoviridae*

58

59 **Abstract**

60 *Cassia hoffmannseggii* plants, a wild fabaceous species in the Atlantic Forest, with
61 severe mosaic symptoms in leaves were found in the Pernambuco State, Brazil. By
62 transmission electron microscopy, two types of virus particles were found; one was
63 recognized as particles of a potyvirus, which was later identified as *Cowpea aphid-*
64 *borne mosaic virus* (CABMV), and another isometric, present in high concentration.
65 The presence of vesicles at the periphery of chloroplasts suggested a tymovirus
66 infection, which was confirmed by subsequent assays. Mechanical transmission
67 attempts to several indicator plants, including solanaeaceous and fabaceous, failed so
68 far. A screening ELISA against several tymovirus antisera resulted in positive reaction
69 against *Passion fruit yellow mosaic virus* (PFYMV). By RT-PCR using degenerated
70 primers for tymovirus, cDNA fragments of approximately 1000bp were amplified
71 targeting the conserved region of RdRp gene, then sequenced. Based on this sequence, a
72 specific forward primer was designed for 3' RACE protocol to amplify 3' genomic end.
73 The successfully amplified cDNA was sequenced revealing the partial RdRp and
74 complete coat protein (CP) genes sequence. The deduced CP was 188 amino acid (aa)
75 long and the highest CP aa identity was observed with *Kennedya yellow mosaic virus*
76 (61%). By the demarcation criterion, this isolate was considered as a distinct tymovirus
77 and tentatively named as Cassia yellow mosaic-associated virus (CYMaV). The
78 phylogenetic analysis of CP and the peculiar sequence of tymobox region of CYMaV
79 were also discussed in this study.

80

81

82

83

84

85 Introduction

86 *Tymoviridae* contains three established genera *Tymovirus*, *Maculavirus* and
87 *Marafivirus* and includes important vegetable pathogens (Martelli et al. 2002a; Fauquet
88 et al. 2005). The genus *Tymovirus* has *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) as a type
89 species and counts more 23 confirmed species (Martelli et al. 2002a; Martelli et al.
90 2002b, ICTVdb, 2011). The virus particle of this genus is approximately 30 nm in
91 diameter, not enveloped and its genome consists of non-segmented single strand RNA
92 with positive polarity (ssRNA+). *Tymovirus* genome shows tRNA like structure (TLS)
93 in the 3' untranslated region (UTR), while some viruses (not all) belong to *Maculavirus*
94 and *Marafivirus* possess poly-A tail in 3' UTR (Martelli et al. 2002a; Martelli et al.
95 2002b; Fauquet et al. 2005; Haenni and Dreher 2008). TLS provided a major
96 contribution to the ability of the 3' UTR to enhance the translation in protoplasts of
97 reporter mRNAs (Dreher, 2004).

98 The genome of *Tymovirus* genus show three open reading frames (ORFs); ORF1
99 encodes polyprotein with methyltransferase, papain-like proteinase, helicase and RNA
100 polymerase (RdRp), ORF2 is considered as the cell-to-cell movement protein which is
101 located almost within the ORF1 region in different reading frame, and ORF3 which is
102 downstream to ORF1 encodes coat protein (cp) gene. The ORF3 was translated from
103 subgenomic RNA produced by viral RdRp from tymobox promoter (Martelli et al.
104 2002a; Martelli et al. 2002b; Fauquet et al. 2005; Haenni and Dreher 2008).

105 In Brazil, few species in the family *Tymoviridae* were reported to date. They are:
106 Tomato white necrosis virus (TWNV) (Barradas et al. 1992; Tanaka et al. 2000),
107 *Passion fruit yellow mosaic virus* (PFYM) (Crestani et al. 1986), *Eggplant mosaic virus*
108 (EMV) (Ribeiro et al. 1996) and *Petunia vein banding virus* (PetVBV) (Alexandre et
109 al., 2000).

110 *Cassia hoffmannseggii* Mart. (syn. *Senna latifolia* (G. Mey.) H. S. Irwin & Barneby)
111 (Irwin and Barneby, 1982) is a wild fabaceous plant in Atlantic Forest in Brazil and
112 firstly reported as natural host of a potyvirus in Pernambuco State, Brazil (Paguio and
113 Kitajima 1981; Souto and Kitajima 1991; 1992) recently identified as *Cowpea aphid-*
114 *borne mosaic virus* (CABMV) which usually causes a mosaic symptom. Curiously,
115 plants of this species growing in this region are normally infected by CABMV. In 2008,
116 a sample of *C. hoffmannseggii* showing severe yellow mosaic was collected at
117 Paudalho, State of Pernambuco. Examination of leaf extracts from this plant by

118 transmission electron microscopy revealed the presence of high concentration of
119 isometric particles in high amount besides CABMV particles. Preliminary
120 ultrastructural studies showed the presence of presumed isometric particles in the
121 cytoplasm and chloroplasts with vesicles at the periphery, a cytopathic effect typical for
122 tymoviruses, raising the hypothesis that the isometric particles present in this particular
123 sample of *C. hoffmannseggii* would be of a tymovirus. Preliminary ELISA assay
124 screening several tymovirus antibodies resulted in a positive reaction for *Passion fruit*
125 *yellow mosaic virus* (PFYMV) antiserum.

126 In this report, we describe the characterization of a tymovirus found in *C.*
127 *hoffmannseggii* plants co-infected by CABMV. By the sequence of coat protein gene,
128 this virus was considered as distinct tymovirus and tentatively denominated as Cassia
129 yellow mosaic-associated virus (CYMaV).

130

131 **Material and Methods**

132 *Virus isolate*

133 *C. hoffmannseggii* shootings showing yellow mosaic symptoms were collected in
134 Paudalho, Pernambuco State, Brazil. Two plants were transplanted and maintained in a
135 green house of the laboratory of Phytovirology at the Universidade Federal Rural de
136 Pernambuco.

137 *Electron Microscopy*

138 Leaf-dip of crude sap and purified virus preparations were negative-stained with 1 %
139 uranyl acetate or 1% sodium silicotungstate. For cytopathologic study, leaf fragments of
140 symptomatic *C. hoffmannseggii* plants were fixed in a mixture of 2% paraformaldehyde
141 and 2.5% of glutaraldehyde in 0.05 M, pH 7.2 cacodylate buffer, post-fixed in 1%
142 osmium tetroxide, dehydrated in acetone and embedded in the low viscosity Spurr
143 epoxy resin. Blocks were sectioned in a Leica Ultracut microtome equipped with
144 diamond knife. Sections were stained with 3% uranyl acetate and Reynold's lead citrate
145 (Kitajima and Nome, 1999). A Zeiss EM 900 transmission electron microscope was
146 used to examine the samples.

147 *Mechanical inoculation assays*

148 The experimental host range studies were carried out by mechanical inoculation to
149 the following species: *Nicotiana benthamiana* Domin., *Vigna unguiculata* (L.) Walp.,

150 *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg., *Macroptilium lathyroides* (L.) Urb., *Datura*
151 *stramonium* L., *Phaseolus vulgaris* L. and *Vicia faba* L. The inoculum was prepared by
152 grinding leaf tissues of infected *C. hoffmannseggii* in a mortar in the presence of 0,01 M
153 phosphate buffer pH 7.0 with sodium sulfite (0,1%) supplemented with celite (1%).

154 *Virus Purification*

155 Fresh infected tissues of *C. hoffmannseggii* were ground at 1.5:4 (w/v) in 100 mM
156 Na₂HPO₄ buffer pH 7.0 with 1 mM of EDTA. After filtered, 0.25 volume of (1:1)
157 chloroform:*n*-butanol solution was added and mixed thoroughly to clarify the plant sap.
158 The emulsion was centrifuged at 5000g for 20 min and collected the aqueous top layer.
159 Virion was concentrated by differential centrifugation at 100,000g for 3 h and 5000g for
160 10 min using 50 mM phosphate buffer, pH 7,0 for pellet resuspension. Concentrated
161 virion solution was obtained by centrifuging in 10-40% sucrose gradients in TE buffer
162 at 113,000g for 2h. The purified preparation was stored at 4°C. This protocol was
163 adapted from Gibbs and Mackenzie (1998).

164 *Polyclonal antibody production*

165 Purified virus preparations were injected to rabbit for polyclonal antibody
166 production, using protocol adapted from Bratney and Burns (1998). Complete Freund's
167 adjuvant was used in the first injection and incomplete adjuvant in the following ones.
168 A total of 12 mg of purified virus was injected till 5th boost with 7-days intervals. The
169 antiserum was collected 8 days after the last injection and the reactivity was evaluated
170 by DAC-ELISA (Direct Antigen Coating Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
171 according to Hobbs et al. (1987). The reactivity of antiserum raised with CYMaV was
172 tested against *C. hoffmannseggii* infected samples. The sample dilution in coating buffer
173 was 1:20 and antisera dilutions were 1:2000. Absorbance readings (*A*_{405 nm}) were
174 taken with a BioTek ELx800 Absorbance Microplate Reader.

175 Also, crude extracts or purified preparations of the isometric virus from *C.*
176 *hoffmannseggii* were tested against antisera of three known tymoviruses: *Desmodium*
177 *yellow mottle virus* (DYMov) and EMV, kindly provided by Dr. R. Koedning (Institute
178 for Pflanzenvirusforschung, Braunschweig, Germany) and PFYMV (Crestani et al.
179 1986).

180 *Sequencing of partial genome and sequence analysis*

181 Total RNA was extracted from 100 mg of infected leaves using RNA Plant Reagent
182 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacture's instruction. Viral
183 cDNA was synthesized using reverse transcriptase M-MLV (Invitrogen) and a
184 degenerated tymovirus reverse primer, Tymo5620 Rev (5'-ARR AGD GAA GCA ATT
185 CAG ACT-3'). PCR was performed using LongAmp *Taq* DNA polymerase (New
186 England Biolabs, Beverly, MA, USA) with Tymo4547 For (5'- GNT CYG AYC CNG
187 ACT GGC G -3') and Tymo5620 Rev primer pair. The estimated amplified cDNA had
188 approximately 1.1 Kb targeting a conserved region of the RdRp gene. cDNA fragments
189 were inserted into pGEM-T Easy plasmid vector (Promega, Madison, WI, USA) and
190 cloned in *Escherichia coli* DH5 α . Recombinant plasmids were purified by illustra
191 plasmidPrep Mini Spin kit (GE Healthcare UK, Buckinghamshire, UK) and sequenced
192 at Macrogen Inc. (Seoul, South Korea).

193 To recover 3' genomic end of the virus, 3' RACE protocol was used. The genomic
194 RNA was extracted from purified virus preparations using Trizol LS solution
195 (Invitrogen). The poly-adenosine tail was added at 3' genomic end using poly(A)
196 polymerase (New England Biolabs), then cDNA was synthesized using oligo(dT)
197 primer with anchor sequence, M10PacIT₅₀VN (5'- AAG CAG TGT TAT CAA CGC
198 AGA TTA ATT AAT₅₀ VN-3'). PCR was performed using this cDNA with 3' RACE
199 Specific forward primer (5'- CAT CTT CCG CAA ATC TCA GT -3') and anchor
200 reverse primer M10 (5'-AAG CAG TGT TAT CAA CGC AGA-3'). Amplified cDNA
201 fragments of approximately 700 pb was sequenced either using cloned inserts and
202 directly using RT-PCR products.

203 The Staden package program version 5.1 (Bonfield, Smith and Staden, 1995) was
204 used to filter out non-objective sequences and assemble contigs of cDNA sequences. To
205 confirm the identity of the nucleotide sequence, obtained sequences were analysed by
206 BlastN and BlastX (www.ncbi.nlm.nih.gov). Twenty seven coat protein sequences were
207 aligned (205 aa) using the software EXPRESSO (3DCoffee) (Armougom, et al. 2006),
208 which uses structural information to perform multiple alignment. Phylogenetic analyses
209 were performed using maximum-likelihood (ML) criterion implemented in RAxML
210 (Stamatakis et al. 2008), using the RAxML BlackBox web-server at CIPRES
211 (<http://www.phylo.org/>) (Miller et al. 2010). The most appropriate model of protein
212 evolution (RtREV+I+ Γ +F) was selected with the software ProTest (Abascal et al.,
213 2005). Node support was determined using bootstrap resampling. The tree was inferred.

214 The reference sequences of tymovirus used in this study was listed in Supplementary
215 table 1.

216 Tymobox sequence and adjacent region of CYMaV was analyzed by multiple
217 alignments comparing with more related tymovirus species.

218 **Results**

219 *Mechanical inoculation*

220 The virus indicator plants *N. benthamiana*, *V. unguiculata*, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *M.*
221 *lathyroides*, *D. stramonium*, *P. vulgaris*, *V. faba* inoculated with buffered sap of
222 infected original *C. hoffmannseggii* plant did not show symptoms and tested negative to
223 CYMaV antiserum by DAC-ELISA. Due to lack of virus-free *C. hoffmannseggii* plants,
224 the back-inoculation to this plant species was not performed.

225 *Purification*

226 The purified virion was examined in electron microscopy and preparations revealed
227 that they consist essentially of isometric particles (Fig. 1D). Empty particles penetrated
228 by negative stain were observed.

229 *Polyclonal antiserum production*

230 Antiserum against CYMaV was raised and tested by ELISA. Antibody was reacted
231 specifically to the plant infected with the same virus. Other antiserum against-DYMoV,
232 EMV and PFYMV were also used for CYMaV. Only antiserum against PFYMV
233 showed positive reaction to plant samples infected with CYMaV. Thus, this virus was
234 thought to be serologically related to PFYMV. Performing DAC-ELISA using 1:2000
235 antiserum dilutions, after addition of *p*-nitrophenyl phosphatase substrate at 0.25
236 mg.ml⁻¹ the substrate incubation time were 1 h. The absorbance values for four positive
237 samples were determined by equation (Positive Sample = 3. \bar{X} negative control)(Sutula
238 et al. 1986). The absorbance values of positive samples were 2.03 - 2.87 (CYMaV) and
239 1.14 - 1.64 (PFYMV) the negative control absorbances were 0.3 - 0.42 and 0.20 - 0.22
240 for CYMaV and PFYMV, respectively.

241 *Electron Microscopy*

242 Confirming the preliminary evidence for the presence of high concentration of
243 isometric particles besides the typical potyviral particles of CABMV in the extracts
244 from leaves from *C. hoffmannseggii* with severe yellow mosaic, examination of thin

245 sections of these tissues showed isometric particles packed in the cytoplasm and
246 vacuoles (Fig. 1A). Another characteristic feature was the presence of small vacuoles
247 with double membrane at the periphery of many chloroplasts (Figs. 1 B and C). Many
248 mitochondria also appeared vesiculated (Fig. 1B). Particles found in purified
249 preparations were uniform, similar to those found in leaf extracts, and had morphology
250 essentially similar to the previously described tymoviruses (Fig. 1 D).

251 *Obtained sequences*

252 The first RT-PCR resulted in the amplification of RdRp region and then complete cp
253 genes was recovered by 3' RACE protocol and sequenced. Total of 1656 nt was
254 revealed, consisting RdRp partial gene (1073 bp), intergenic region of six nt and the
255 complete cp gene (567 nt, 188 aa). This gene organization showed the typical tymovirus
256 one. The CP aa sequence of CYMaV was compared with other related tymoviruses. The
257 highest identity to CYMaV was obtained with *Kennedya yellow mosaic virus* (KYMV)
258 (61%). By the demarcation criterion, this isolate was considered as a distinct tymovirus.

259

260 *Phylogenetic analysis*

261 The complete cp gene of the tymovirus found in *C. hoffmannseggii* associated to the
262 severe yellow mosaic was sequenced. The deduced amino acid (aa) was 188 aa long and
263 used for construction of the phylogenetic tree (Fig. 2). By the phylogenetic study, two
264 clusters were observed; the first cluster I is more adapted to solanaceous and
265 cucurbitaceous hosts, and the second cluster consists of viruses that infect mainly
266 Cruciferous, Malvaceous and Fabaceous plants. Phylogenetic analysis using coat
267 protein sequences revealed that CYMaV is classified in Cluster II tymovirus (Fig. 2).
268 Interestingly, despite being clustered together with CYMaV, the PFYMV is not the
269 most similar one (48% aa identity). This result is consistent with variation in the
270 substitution rate among lineages, generating the observed terminal branch length
271 difference between CYMaV and PFYMV (Fig. 2).

272 *Tymobox sequence comparison*

273 *Tymovirus* possesses much conserved subgenomic promoter, tymobox. To compare
274 the tymobox sequence of CYMaV and other related tymoviruses, the sequences of this
275 region was aligned. For this purpose, the tymobox sequences of cluster II in
276 phylogenetic tree (Fig. 2) were chosen. Tymobox of CYMaV has 16 nucleotide-long

277 and the sequence was the standard one as TYMV, a type species of genus *Tymovirus*
278 and more four tymoviruses out of six sequences compared (Fig. 3). However, the
279 initiation box, CAAU which is the initiation site of subgenomic RNA was absent in the
280 tymovirus from *C. hoffmannseggii* sequence (Fig. 3) confirmed by six cloned inserts
281 and RT-PCR direct sequencing. The first AUG just posterior to tymobox (Fig. 3,
282 underlined) was not considered as start codon since the next one is an opal stop codon
283 of ORF1.

284 *3' UTR sequence*

285 Seven cloned inserts and direct sequences of RT-PCR products by 3' RACE protocol
286 did show very short 3' UTR as AUU residues after the stop codon of cp gene and prior
287 to poly(A) tail which was artificially added. However, only one clone showed the
288 adenosine-rich tract of 30 nt with 3 G residues inside the stretch, then continued the
289 artificial polyA tail. This implied that the real 3'UTR was not recovered by the
290 methodology used in this study due to the annealing of oligo-dT reverse primer to this
291 adenosine-rich region but not in artificial polyA tail used for 3'RACE protocol.

292

293 **Discussion**

294 The initial suspicion that the isometric particles found in the leaf extracts of the *C.*
295 *hoffmannseggii*, showing severe yellow mosaic found at Paudalho, PE, was a tymovirus,
296 based on particle morphology and preliminary serological and ultrastructural
297 observations was confirmed by subsequent molecular works. A very important, beside
298 the morphology of the particles was the presence of characteristic vesicularization at the
299 periphery of chloroplasts, a unique feature induced by all members of the genus
300 *Tymovirus* (Martelli et al., 2002a). Because of the initial results of ELISA in which this
301 sample from *C. hoffmannseggii* reacted with antiserum against PFYMV (Crestani et al.,
302 1986), it was considered as a possible isolate of this virus. Mechanical transmission
303 assays, however, failed to transmit it to any of the tested plants, including passion
304 flower and *C. hoffmannseggii*. Further works, including attempts of beetle transmission,
305 are required to overcome this difficulty. It should be mentioned that members of the
306 genus *Tymovirus* usually has a very narrow host range (Martelli et al., 2002a).

307 The tymoviral nature of this isometric virus from *C. hoffmannseggii* was
308 unequivocally demonstrated by the molecular analysis. RT-PCR using degenerated
309 primers for tymovirus managed to amplify part of its genome, and subsequent works
310 permitted to obtain part of the sequences of the cp and RdRp genes. The aa sequence
311 alignment of cp gene of the tymovirus from *C. hoffmannseggii* with those of other
312 tymoviruses, found in the public DNA databases, showed the identities from 61 to 33%.
313 The highest identity was obtained with KYMV. Since, according to the established rule,
314 that when cp aa sequence identity of two viruses is less than 90%, they should be
315 considered distinct (Fauquet et al. 2005; Haenni and Dreher 2008), this tymovirus from
316 *C. hoffmannseggii* is different from other known tymoviruses. The phylogenetic tree
317 based on cp aa sequences showed that the tymovirus from *C. hoffmannseggii* belongs to
318 the cluster II (Fig. 2) with fabaceous and malvaceous infecting tymoviruses and
319 PFYMV and AsAV. Morales et al. (2002) were found the same clustering in their
320 PFYMV analysis.

321 Altogether based on molecular approaches, the virus found in *C. hoffmannseggii* in
322 Pernambuco State, Brazil is suggested to be a novel tymovirus species and we proposed
323 the name of Cassia yellow mosaic-associated virus (CYMaV). The CYMaV partial
324 RdRp gene and complete cp gene sequences are available at GenBank (JN545837).

325

326 **Acknowledgments**

327 Authors thank to CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
328 Tecnológico) for the DSc scholarship granted to the first author (140821/2008-2). The
329 5th, 6th, 7th and 8th authors were financially supported by CNPq as research fellows.

330

331

332

333

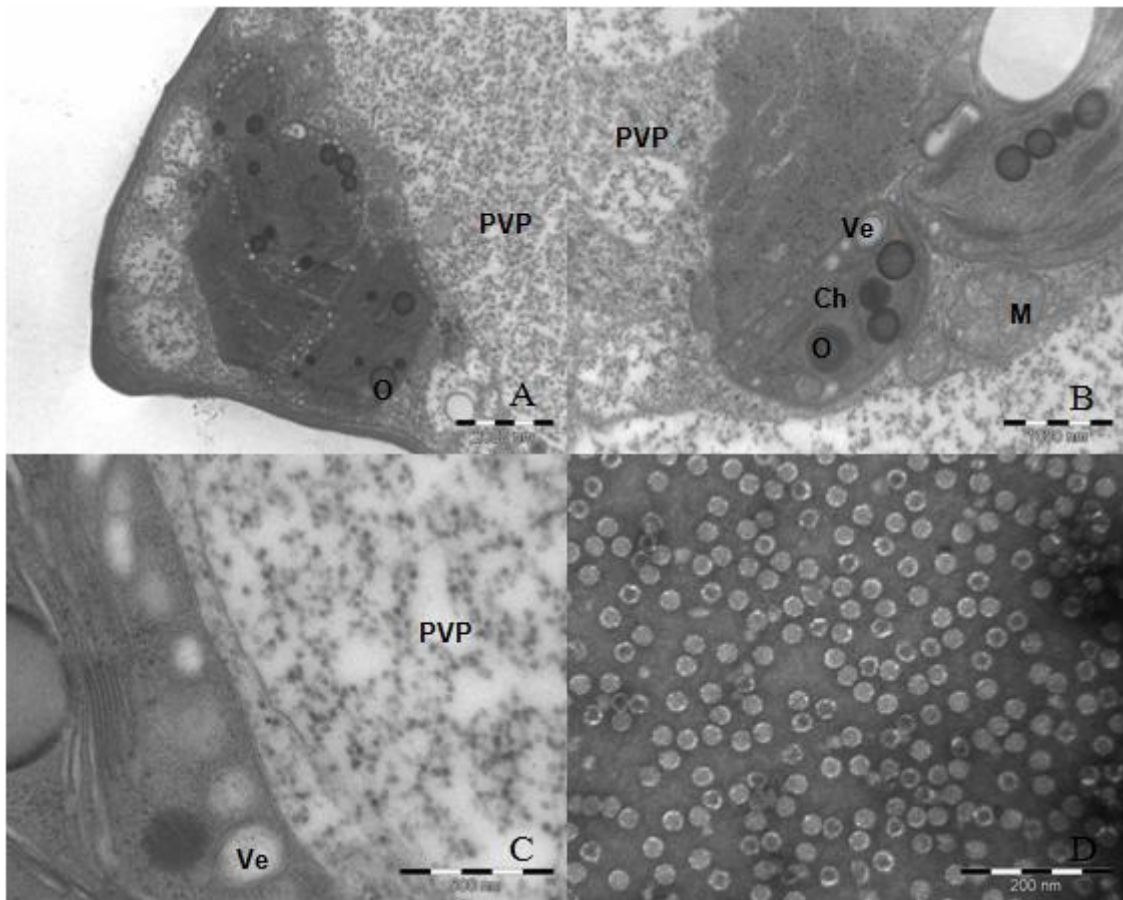
334 **References**

- 335 Abascal F, Zardoya R, Posada, D. (2005). ProtTest: Selection of best-fit models of
336 protein evolution. *Bioinformatics*, 21, 2104-2105.
- 337 Alexandre, M. A. V., Duarte, L. M. L., Rivas, E. B., Chagas, C. M. & Barradas, M. M.
338 (2000). *Petunia vein banding virus*: Characterization of a new tymovirus from *Petunia x*
339 *hybrida*. *Plant Disease*, 84, 739-742.
- 340 Armougom, F., Moretti, S., Poirot, O., Audic, S., Dumas, P., Schaeli, B., Keduas V.,
341 Notredame, C. (2006) Espresso: automatic incorporation of structural information in
342 multiple sequence alignments using 3D-Coffee. *Nucleic Acids Research*, 34, 604–608.
- 343 Barradas, M. M., Salas, F. J. S., Buitron, I. P. G. (1992) Manutenção da infectividade de
344 Tymovírus em extratos de plantas. *Acta Botanica Brasilica*, 6, 15-26.
- 345 Bonfield, J. K., Smith, K. F. & Staden, R. (1995). A new DNA sequence assembly
346 program. *Nucleic Acids Research*, 23, 4992-4999.
- 347 Bratney, C. & Burns, R. (1998). Antibody production. (In G. D. Foster & S. C. Taylor,
348 (Eds.), *Plant virology protocols. From virus isolation to transgenic resistance* (pp. 279-
349 286). Totowa: Humana Press).
- 350 Crestani, O. A., Kitajima, E. W., Lin, M. T. & Marinho, V. L. (1986). A. *Passion fruit*
351 *yellow mosaic virus*, a new tymovirus found in Brazil. *Phytopathology*. 78, 951-955.
- 352 Dreher, T. W. (2004). *Turnip yellow mosaic virus*: transfer RNA mimicry, chloroplasts
353 and a C-rich genome. *Molecular Plant Pathology*, 5, 367-375.
- 354 Fauquet, C. M., Mayo M. A., Maniloff, J., Desselberger, U. & Ball, L. A. (Eds.) (2005).
355 *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of*
356 *Viruses*. (Hong Kong: Elsevier Academic Press).
- 357 Gibbs, A., & Mackenzie, A. M. (1998). Tymovirus isolation and genomic RNA
358 extraction. (In G. D. Foster & S. C. Taylor (Eds.), *Plant virology protocols: From virus*
359 *isolation to transgenic resistance*. (pp. 219–224). Totowa: Humana Press)

- 360 Haenni, A-L & Dreher, T. W. (2008). Timoviruses. (In B. W. J. Mahy & M. H. V. Van
361 Regenmortel (Eds.), *Encyclopedia of Virology 3rded.* (pp. 199-207). San Diego:
362 Academic Press).
- 363 Hobbs, H. A., Reddy D. V. R., Rajeshwari R. & Reddy, A. S. (1987). Use of direct
364 antigen coating and protein A coating ELISA procedures for detection of three peanut
365 viruses. *Plant disease*, 71, 747-749.
- 366 ICTVdb (2011) International Committee on Taxonomy of Viruses database:
367 Tymoviridae: Taxonomic Structure of the Family. Retrieved September 09, 2011, from
368 http://www.ictvdb.org/Ictv/fs_tymov.htm#Genus1.
- 369 Irwin, H. S., R. C. Barneby. (1982) The American Cassiinae: a synoptical revision of
370 Leguminosae tribe Cassieae subtribe Cassiinae in the New World. *Memoirs of New*
371 *York Botanic Garden*, 35, 143-145.
- 372 Kitajima, E. W., Nome, C. F. (1999) Microscopia eletrônica em virologia vegetal. (In:
373 D. M. Docampo, S. L. Lenardón (Eds.) *Métodos para detectar patógenos sistémicos*
374 (pp.59-87). Córdoba: IFFIVE/INTA-JICA)
- 375 Martelli, G. P., Sabanadzovic, S., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Edwards, M. C. &
376 DREHER T. (2002a). The family Tymoviridae. *Archives of Virology*, 147, 1837-1846.
- 377 Martelli, G. P., Sabanadzovic, S., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N. & Saldarelli, P.
378 (2002b). Maculavirus, a new genus of plant viruses. *Archives of Virology*, 147, 1847-
379 1853.
- 380 Miller, M. A., Pfeiffer, W., Schwartz, T. (2010, November). Creating the CIPRES
381 Science Gateway for inference of large phylogenetic trees (Paper presented at the
382 Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), New Orleans)
- 383 Morales, F. J., Lozano, I., Castaño, M., Arroyave, J., Velasco, A. C. & Varon, F.
384 (2002). Partial Characterization of a tymovirus infecting passion fruit in Colombia,
385 South America. *Journal of Phytopathology*, 150, 292–296.
- 386 Paguio, O. & Kitajima, E. W. (1981). Isolamento de um potyvirus de *Cassia*
387 *hoffmannseggii*. *Fitopatologia Brasileira*, 6, 187-191.

- 388 Ribeiro, S. G., Kitajima, E. W., Oliveira, C. R. B. & Koenig, R. (1996). A strain of
389 *Eggplant mosaic virus* isolated from naturally infected tobacco plants in Brazil. *Plant*
390 *Disease*, 80, 446-449.
- 391 Souto, E. R. & Kitajima, E. W. (1991). Propriedades biológicas de um potyvirus isolado
392 de "lava pratos" (*Cassia hoffmannseggii*) procedente de Pernambuco. *Fitopatologia*
393 *Brasileira*, 16, 256-259.
- 394 Souto, E. R. & Kitajima, E. W. (1992). Purificação do vírus das manchas amarelas da
395 *Cassia*, eletroforese de proteínas e sorologia. *Fitopatologia Brasileira*, 17, 292-301.
- 396 Stamatakis, A., Hoover, P., Rougemont, J. (2008) A rapid bootstrap algorithm for the
397 RAxML web servers. *Systematic Biology*, 57, 758–771.
- 398 Sutula, C. L., Gillett, J. M., Morrissey, S. M., Ramsdell, D. C. (1986) Interpreting
399 ELISA data and establishing positive-negative threshold. *Plant Disease*, 70, 722-726.
- 400 Tanaka, F. A. O., Machado, S. R. & Barradas, M. M. (2000). Análise ultra-estrutural de
401 folhas de três espécies de solanáceas após inoculação com o vírus da necrose branca do
402 tomateiro (VNBT) – *Tymovirus*). *Revista Brasileira de Botânica*, 23, 161–167.
- 403
- 404
- 405
- 406
- 407

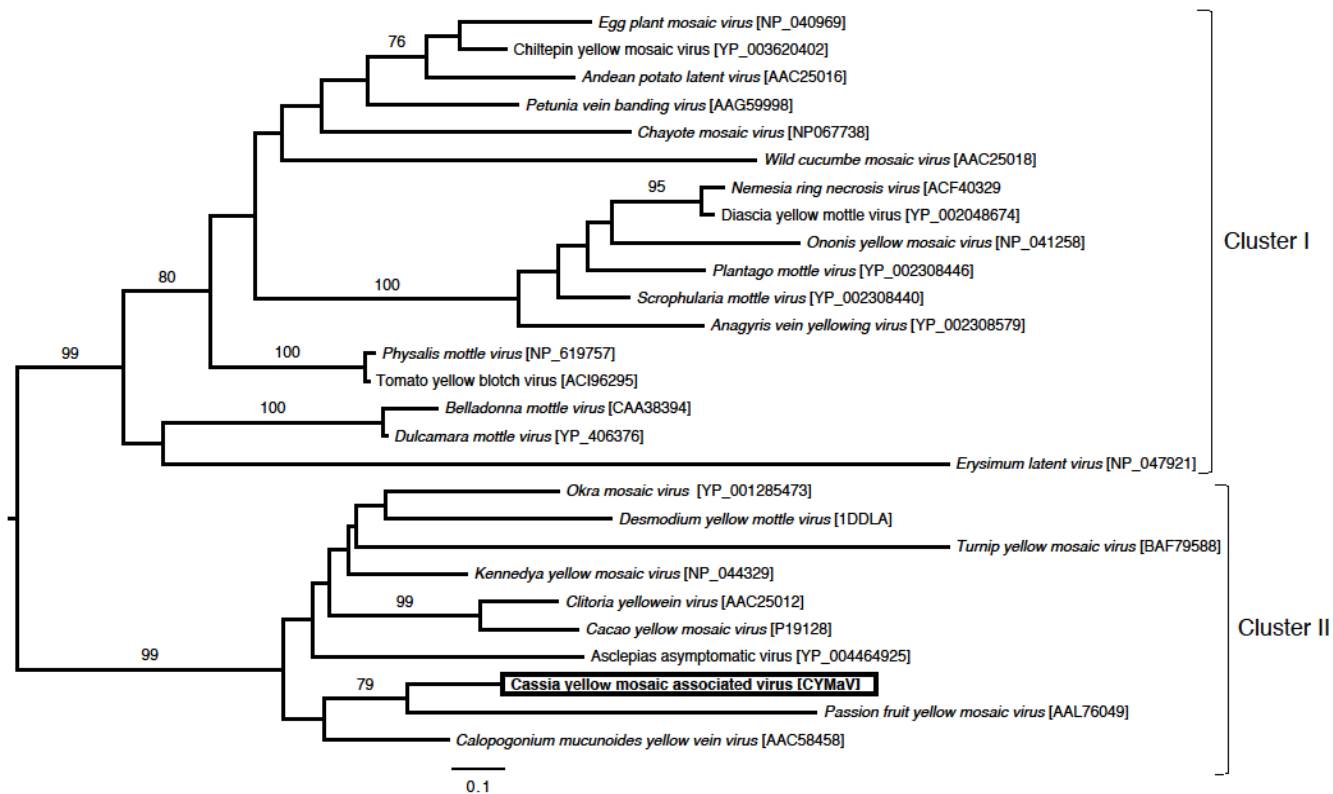
408



409

410 **Figure 1.** Transmission electron micrographies showing possible virus particles. **A.**
 411 High quantities of possible virus particles in vacuols; **B and C.** Formation of vesicles of
 412 in chloroplasts; **D.** Purified particles of CYMaV. Ch = chloroplast, M = mitochondria,
 413 PVP = putative virus particles, O = osmiophilic globules, Ve = vesicles.

414



415

416 **Figure 2.** Maximum-likelihood tree based on amino acid sequences from tymovirus
 417 coat protein sequences. The tree is mid-point root for clarity only. Bootstrap values are
 418 only shown for nodes with large than 70% support.

419

KYMV	5688	GAGU <u>U</u> GAAUUGCUUC AAUCCUUUCAAUUCUAG <u>AUG</u>
OkMV	5541	GAG <u>G</u> CUGAAUUGCUUCACUCCUUCAAU <u>AUG</u>
TYMV	5601	GAGUCUGAAUUGCUUCACUACGUCCAAUAGCAAUCAGCCCCGAC <u>AUG</u>
AsAV	5477	GAGUCUGAAUUGCUUCACAAUUUUCAAUAGACA <u>AUG</u>
DYMoV	?	GAGUCUGAAUUGCUUCACUCUUUUCAAUGAGAG <u>AUG</u>
PfYMV	?	GAGUCUGAAUUGCUUCACUCAUUUCAAUGAGCC <u>AUG</u>
CYMaV	?	GAGUCUGAAUUGCUUCACACCAUGUGAAGU <u>AUG</u>

420 **Tymobox** **Initiation box** **Start codon**

421 **Figure 3.** Tymobox and flanking regions of CYMaV and six most related tymoviruses.

422 The positions of these sequences in their genomic RNAs are shown next to the virus

423 name of which complete genomic sequences have been determined. The conserved

424 tymobox (16nt) was highlighted by dark background. The two conserved sequences,

425 Initiation box (CAAU) and CP start codon (AUG) are underlined. The start codon of the

426 CP gene is boldfaced.

427

428

CONCLUSÕES GERAIS



CONCLUSÕES GERAIS

- O vírus da mancha amarela do lava-pratos (*C. hoffmannseggii*), segundo critérios de identificação moleculares, é o *Cowpea aphid-borne mosaic virus*;

- Há diferenças genéticas na capa protéica dos isolados de CABMV obtidos de maracujazeiro, feijão-caupi e lava-pratos o que permite separação em grupos distintos;

- Ocorre adaptação hospedeira do CABMV a plantas das famílias Fabaceae e Passifloraceae distinguindo-se estirpes deste vírus;

- Para alguns isolados de CABMV a distância geográfica não foi o fator mais forte para agrupamento genético;

- Os isolados brasileiros de CABMV formam um grande grupo distinto de isolados de outros países;

- O vírus com partículas isométricas encontrado em lava-pratos associado a mancha-amarela é uma nova espécie do gênero *Tymovirus*.