

Caracterização da Região 5'-Terminal de um Isolado Brasileiro do *Southern bean mosaic virus**

Luciana M. Espinha^{1**}, José O. Gaspar^{1***}, Richard J. Ward², Roberto Ruller³ & Luis E. A. Camargo⁴

¹Departamento de Zoologia e Botânica, IBILCE-UNESP, CEP 15054-000, São José do Rio Preto, SP, e-mail: gaspar@dzib.ibilce.unesp.br; ²Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP, CEP 14049-900, Ribeirão Preto, SP; Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina/USP, CEP 14049-9000, Ribeirão Preto, SP; ⁴ESALQ-USP, Cx. Postal 9, CEP 13418-900, Piracicaba, SP

(Aceito para publicação em 01/12/2003)

Autor para correspondência: José Osmar Gaspar

ESPINHA, L.M., GASPAR, J.O., WARD, R.J., RULLER, R. & CARMARGO, L.E.A. Caracterização da região 5'-terminal de um isolado brasileiro do *Southern bean mosaic virus*. Fitopatologia Brasileira 29:328-331. 2004.

RESUMO

O presente trabalho caracteriza a região 5'-terminal de um isolado do *Southern bean mosaic virus* encontrado no Estado de São Paulo (SBMV-SP). O RNA foi extraído de partículas virais purificadas e submetido a RT-PCR usando oligonucleotídeos desenhados para amplificar cerca de 590 nt da região 5'-terminal do RNA viral. Foi obtido um fragmento de tamanho esperado que, após clonagem e seqüenciamento, mostrou a existência de uma região não codificadora com 92 nt e a primeira ORF, começando no primeiro AUG (posição 93) e terminando no códon UGA na posição 534. Na região não

codificadora foi detectado um segmento parcialmente complementar ao RNA ribossomal 18S. A ORF1 codifica uma proteína de 147 aminoácidos com massa molecular estimada de 17080 Da. A extremidade 3' da ORF1 sobrepõe a extremidade 5' da ORF2 em 34 nucleotídeos. Os resultados obtidos indicam que a região 5'-terminal do RNA do SBMV-SP é similar ao isolado Arkansas (SBMV-ARK) descrito na América do Norte.

Palavras-chave adicionais: feijoeiro comum, *Sobemovirus*, SBMV, seqüenciamento.

ABSTRACT

Characterization of the 5'-terminal region of a Brazilian isolate of *Southern bean mosaic virus*

We report the characterization of the 5'-terminal region of an isolate of *Southern bean mosaic virus* found in the São Paulo State, Brazil (SBMV-SP). The RNA was extracted from purified virus particles and subjected to RT-PCR using oligonucleotides designed to amplify about 590 nt of the 5'-terminal region of the viral RNA. A fragment with the expected size was obtained, which, after cloning and sequencing, showed the existence of a 5' non-coding region with

92 nt and the first ORF, starting at the first AUG (position 93) and ending at a UGA stop codon at position 534. A small site, partially complementary to the 3'-terminus of 18S ribosomal RNA was detected at the non-coding region. The ORF1 may encode a protein containing 147 amino acids with a deduced molecular weight of 17080 Da. The 3'-terminus of ORF1 overlaps the 5'-terminus of ORF2 in 34 nt. Our results indicate that the 5'-terminal region of SBMV-SP is similar to that of the Arkansas isolated (SBMV-ARK) described in the North America.

Entre as mais de dez viroses descritas em feijoeiros (*Phaseolus vulgaris* L.) (Costa *et al.*, 1972; Bianchini *et al.*, 1977), está a causada pelo *Southern bean mosaic virus* (SBMV), gênero *Sobemovirus* (van Regenmortel *et al.*, 2000). O SBMV possui partículas isométricas (28-30 nm) contendo RNA genômico de 4-4,5 Kb envolto por proteína capsidial com massa molecular de 29-39 kDa (Sehgal, 1981). Uma pequena proteína (VPg) é covalentemente ligada à extremidade 5' do RNA, enquanto a extremidade 3' é destituída de cauda Poli A (Ghosh *et al.*, 1979). Os genomas dos sobemovirus possuem quatro ORFs que se sobrepõem (Van Regenmortel *et al.*, 2000), com exceção para o SBMV que possui somente três ORFs não

sobrepostas (Othman & Hull, 1995). Ao SBMV falta a pequena ORF3 que é encontrada, entretanto, no isolado "Arkansas" do SBMV (SBMV-ARK; Lee & Anderson, 1998). Tem sido proposto, que as diferenças na organização do genoma do SBMV e SBMV-ARK resultariam de mutações ou erros no seqüenciamento de nucleotídeos do SBMV (Lee & Anderson, 1998). De qualquer maneira, os genomas dos isolados do SBMV codificam para uma possível proteína do movimento (ORF1), uma poliproteína com domínios de VPg, uma serino protease e RNA polimerase dependente de RNA (ORF2) e a proteína capsidial (ORF4) (Othman & Hull, 1995; Lee & Anderson, 1998). A função da proteína codificada pela ORF3 do SBMV-ARK, é desconhecida.

No Brasil, o SBMV foi detectado pela primeira vez em feijoeiros na região do Distrito Federal (SBMV-DF; Cupertino *et al.*, 1982) e, posteriormente, no Estado de São Paulo (SBMV-SP; A. S. Costa, Dados não publicados) e Paraná (SBMV-PR;

*Parte da Tese de Doutorado da primeira autora. Universidade Estadual Paulista (2003). Apoio financeiro da FAPESP e CAPES. Seqüência depositada no GenBank com o número de acesso AY340587.

**Bolsista da CAPES

***Bolsista do CNPq

Gasparin, 2002). Algumas propriedades moleculares foram determinadas para o isolado SBMV-SP por Moreira & Gaspar (2002): (a) as partículas virais apresentam diâmetro de 28-30 nm e a proteína capsidial possui massa molecular de 30 kDa, (b) das partículas virais foram extraídos RNA de vários tamanhos (4,2 Kb, 3,1 Kb, 2,6 Kb, 2,15 Kb, 1,64 Kb, 1,36 Kb e 1,0 Kb) sendo o de 4,2 Kb o RNA genômico e o de 1,0 Kb supostamente um RNA subgenômico que codifica a proteína capsidial, (c) ácidos ribonucleicos do mesmo tamanho foram também detectados *in vivo*, indicando estar associados à replicação viral e (d) somente duas espécies de RNA de fita dupla (dsRNA) foram detectadas *in vivo* (4,2 Kpb e 1,0 Kpb), correspondendo às formas replicativas (RFs) do RNA genômico e do RNA subgenômico para a proteína capsidial.

No presente trabalho descreve-se a caracterização da região 5'-terminal do genoma do isolado do SBMV encontrado no Estado de São Paulo (SBMV-SP).

O SBMV-SP foi doado, no final dos anos 80, pelo Dr. Álvaro Santos Costa (Instituto Agrônomo de Campinas), inoculado em feijoeiro comum cv. Rosinha e mantido em casa de vegetação. O vírus foi purificado como descrito por Moreira & Gaspar (2002). Após purificação, uma alíquota do vírus foi tratada com SDS 2,5% e NaCl 0,1 M com aquecimento por 3 min à 55 °C. Em seguida foi acrescentado igual volume de fenol (equilibrado com tampão citrato de sódio 0,1 M pH 4,3), agitada manualmente por 30 s e, então, centrifugada para a separação das fases. A fase aquosa foi novamente extraída com fenol e, após centrifugação, o ácido nucleico foi precipitado da fase aquosa pela adição de 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e três volumes de etanol por 1 hora à -70 °C. Em seguida, a mistura foi submetida à centrifugação a 12.000 g por 15 min e o "pellet" foi secado à 37 °C por 10 min e solubilizado em água tratada com DEPC.

Para a produção do DNA complementar (cDNA) ao RNA viral, foi utilizado um volume de reação de 20 µl consistindo de: 50 mM Tris.HCl (pH 8,3); 75 mM KCl; 10 mM DTT; 3 mM MgCl₂; 0,1 mM cada dGTP, dATP, dCTP; 0,065 mM dTTP; 10 µg/ml hexanucleotídeos ou oligonucleotídeo anti-senso (SBMV1, abaixo); duas unidades de inibidor de RNase; 1-3 µg RNA viral desnaturado à 95 °C por 5 min; 40 unidades de Transcriptase Reversa "Superscript" (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A reação permaneceu por 2 h a 42 °C.

Os oligonucleotídeos foram desenhados utilizando-se os programas Primer-3 e Oligo-4 baseando-se na sequência de nucleotídeos do SBMV-ARK (Lee & Anderson, 1998). O par de oligonucleotídeos flanqueia uma sequência de 591 nucleotídeos, correspondendo a região inicial não codificadora e a ORF1 que codifica a possível proteína do movimento. A sequência do par de oligonucleotídeos é a seguinte: senso (Ea39): 5'-CACAAAATATAAGAAGGAAAGCTGG-3' e anti-senso (SBMV1): 5'-ACGCTGCAGCCGTATGGATGTCGAA-3'.

O volume da reação de PCR foi de 50 µl consistindo de tampão (Tris-HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM); 5 mM de MgCl₂; 0,2 mM cada dCTP, dGTP, dATP e dTTP; 10 µg/ml de cada primer (senso e anti-senso); 1 µl da mistura da reação de cDNA e duas unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad,

CA, USA). O ciclo da PCR, realizado em um termociclador "MiniCycler" (MJ Research, San Francisco, CA, USA), envolveu uma desnaturação inicial de 94 °C por 4 min e 30 ciclos com 1 min de desnaturação à 94 °C, 1 min de anelamento à 45 °C e 1 min de extensão à 72 °C. Após 30 ciclos, foi feita uma extensão final por 10 min à 72 °C. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados, sob luz ultravioleta, em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

A clonagem do fragmento obtido na reação de PCR foi feita utilizando-se o kit "SureClone™ Ligation" (Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, USA) e a extração do plasmídeo recombinante realizada com o kit "Concert Rapid Plasmid Miniprep System" (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), segundo instruções dos fabricantes. Após clonagem em vetor pUC18, bactérias *Escherichia coli* linhagem DH5 ∞ foram transformadas e cinco clones selecionados. Após a extração do DNA plasmidial das células selecionadas, foram feitas digestões com enzimas de restrição (*EcoRI* e *BamHI*) para a comprovação da formação do recombinante. Os DNAs plasmidiais purificados foram seqüenciados pela técnica de reação de terminação em cadeia, utilizando-se o seqüenciador automático "ABI Prism 377 DNA Sequencer" (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) e o kit "DNA sequencing Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction" (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA), seguindo-se as recomendações do fabricante. O seqüenciamento de cinco clones foi realizado nos dois sentidos de leitura utilizando-se os oligonucleotídeos universais M13. O alinhamento das seqüências obtidas foi feito com o auxílio do programa CLUSTAL W (<http://www.ch.embnet.org/software/clustalW.html>) e as comparações com as seqüências existentes no banco de dados GenBank, feitas através do algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Após seqüenciamento, a análise da região 5' não codificadora do SBMV-SP evidenciou a presença de 92 nucleotídeos precedendo o códon de iniciação da ORF1 (Figura 1A). Nessa região, o RNA do SBMV-SP tem um conteúdo relativamente baixo de G + C (38%) semelhante às regiões 5' não codificadoras de outros sobemovirus (SBMV-ARK, 39%; SBMV, 37%; SCPMV, 33% e SeMV, 38%) e de outros genomas virais (Alquist *et al.*, 1981). Dentro da região 5' não codificadora há um segmento parcialmente complementar ao RNA ribossomal 18S (Figura 1B), sugerindo um possível papel na ligação do ribossomo (Hagenbüchle *et al.*, 1978). Este possível sítio de ligação ao ribossomo está localizado a distâncias variáveis do código de iniciação da ORF1 sendo 52 nt para o SBMV-SP, SBMV-ARK e SBMV, 36 nt para o SeMV e 5 nt para o SCPMV (Wu *et al.*, 1987; Othman & Hull, 1995; Lee & Anderson, 1998; Lokesh *et al.*, 2001).

A ORF1 do RNA do SBMV-SP tem início no nucleotídeo 93 (códon AUG) e termina na posição 534 (códon UGA) (Figura 1A). A sequência dos 441 nucleotídeos e a sequência deduzida de aminoácidos apresentam 79% de identidade com o SBMV-ARK. Em relação a outras espécies do gênero *Sobemovirus*, há pouca identidade de nucleotídeos e aminoácidos dentro da ORF1 (Tabela 1). A função da proteína codificada pela ORF1 é ainda desconhecida, mas tem sido

A

```

001CACAAAAUUAAGAAGGAAAGCUGGAUUUCCUACCUUUGU
041GUUUCCAUGUCGAAGCAUUGGUCAAUACUUAUCAAUUGG
081UGCAUUGUUCGCAUGAGCUACCGAUUCUAGUAGUCAAAAG
      M S Y R F L V V K A
121CCGUUGGUUUUCUUGGUUUCCAUCAGACGCUCACUCGCAU
      V G F L G F H S D A T R I
161UCUGUCAGAGACUGAGAUUCGUAGACGUUCCUUCGUCCAUU
      L S E T E I V D V E S S I
201GAUUUCGUCGGUGAAACCGAGUUACGCCUAGAAAACGCUU
      D F V G E T E L R L E N A W
241GGCCCCAAGGUGGAGAGAUACACUAUCCUACCUAGGUU
      P Q G G E R Y T I L P R F
281CAACGUUCAGAUUGACUUCACGUACCAUCCAGUGCGUGUC
      N V Q I D F T Y H P V R V
321GAGAUCAUCUGUAGGGUUUGUGCUACUCCUACUGUUG
      E I I C R V C A T S L T V V
361UCUUUAGCAAGUGGAACUCCAUGCGAAAGGAAGGCCA
      F S K W N F H C E R K G H
401UUUUGUGCCAGUAGACCAGAACGGGAUCUGUUUAGGGUU
      F V P V D Q N G N L F R F
441GGAACGCUCGGGAGACGGGAGAGAAUACUUCUACUUCU
      G T L R E T G E K Y F Y F C
481GUGAGAAAUCUACUGCAGACAUUGUAUCCAGCCGC
      E K S I C R Q C I I Q A A
      ORF2- M Y H P G R
521UCACCAUCAUCCUGA
      H H H S *
      S P S F L .....

```

B

```

18S rRNA      3'-UUACUA GGAAGGCGUCC
SBMV-SP      5'-GAUUU - CCUACCUUUGU
SBMV-ARK     5'-GAUUU - CCUACCUUUGU
SeMV         5'-GAUUU - CCUACCUUUGU
SBMV         5'-GAUUU - CCUACCUUUGU
SCPMV        5'-GAUUUU CCUACCUUUGU

```

FIG. 1 - (A) Sequência de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos da região 5' terminal do *Southern bean mosaic virus* - isolado de SP (SBMV-SP). Os primeiros 92 nucleotídeos representam a região não codificadora. Os códons de iniciação (AUG) e de terminação (UGA) estão sublinhados. O códon de iniciação da ORF2 (sobrepõe na ORF1) está duplamente sublinhado. (B) Pareamento de bases da região 5' não codificadora de alguns sobemovirus mostrando o consenso (pontos) complementar com a sequência da região 3' terminal do RNA ribossomal de outros organismos.

proposta sua participação no movimento viral entre células (Othman & Hull, 1995). A baixa identidade na ORF1 entre diferentes espécies de *Sobemovirus* corrobora resultados anteriores para outros gêneros de vírus, onde as proteínas relacionadas com o movimento viral mostram pouca identidade, porém apresentam funções biológicas semelhantes (Melcher, 1990). A ORF1 do SBMV-SP codifica uma proteína contendo 147 aminoácidos com massa molecular deduzida de 17080 Da. Isto constitui uma diferença de um códon de nucleotídeos e um aminoácido a menos do que o isolado SBMV-ARK. Se esta diferença é significativa ainda está por ser determinado mas, levando-se em conta que esta proteína está relacionada com o movimento do vírus de célula-à-célula (Othman & Hull, 1995; Sivakumaran et al., 1998) e os dois isolados provocam infecção sistêmica, a perda deste aminoácido não deve ser responsável

TABELA 1 - Porcentagem de identidade de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) entre o *Southern bean mosaic virus* - isolado de SP (SBMV-SP) e outros sobemovirus

Isolado comparado	Região 5' não codificadora	ORF1	
		nt	aa
SBMV-ARK	88	79	79
SBMV	88	53	24
SeMV	76	43	34
SCPMV	43	21	12

por mudança na função da proteína.

A extremidade 3'-terminal da ORF1 do SBMV-SP sobrepõe a extremidade 5'-terminal da ORF2 em 34 nucleotídeos (Figura 1A), sendo semelhante ao SBMV-ARK. Assim, a organização genômica dos dois isolados, nessa região, se dispõe igualmente, o que reforça a proposta de Lee & Anderson (1998), de que deve ter ocorrido erro no seqüenciamento feito para o outro isolado americano do SBMV (Othman & Hull, 1995), o qual apresenta somente 3 ORFs que não se sobrepõem.

Os resultados aqui obtidos indicam que o SBMV-SP é similar, na organização da região 5'-terminal do genoma, ao isolado Arkansas (SBMV-ARK) descrito na América do Norte. O seqüenciamento da região 3'-terminal, que inclui a proteína capsidial, poderá oferecer maiores detalhes da identidade entre esses dois isolados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLQUIST, P., LUCKOW, V. & KAESBERG, P. Complete nucleotide sequence of Brome mosaic virus RNA3. *Journal Molecular Biology* 153:23-28. 1981.
- BIANCHINI, A., MARINGONI, A.C. & CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro. In: Kimati, H., Amorin, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L.E.A. & Resende, J.A.M. (Eds.) *Manual de Fitopatologia*, 3rd ed., Agronômica Ceres, 1977. pp.376-399.
- COSTA, A.S., KITAJIMA, E.W., MIYASAKA, S. & ALMEIDA, L.D. Moléstias de feijoeiros causadas por vírus. *Anais, I Simpósio Brasileiro do Feijão*, Viçosa, MG. 1972. pp.342-384.
- CUPERTINO, F.P., LIN, M.T., KITAJIMA, E.W. & COSTA, C.L. Occurrence of southern bean mosaic virus in central Brazil. *Plant Disease* 66:742-743. 1982.
- GASPARIN, M.D.G. Detecção e caracterização parcial de um isolado do *Southern bean mosaic virus*, no Paraná. (Dissertação de Mestrado). Maringá. Universidade Estadual de Maringá. 2002.
- GHOSH, A., DASGUPTA, R., SALERNO-RIFE, T., RUTGERS, T. & KAESBERG, P. Southern bean mosaic virus has a 5'-linked protein but lacks 3' terminal poly (A). *Nucleic Acid Research* 7:2137-2146. 1979.
- HAGENBÜCHLE, O., SANTER, M., STEITZ, J.A. & MANS, R.J. Conservation of the primary structure at the 3' end of 18 S rRNA from eucaryotic cells. *Cell* 13:551-563. 1978.
- LEE, L. & ANDERSON, J. Nucleotide sequence of a resistance breaking mutant of southern bean mosaic virus. *Archives of Virology* 143:2189-2201. 1998.

- LOKESH G.L., GOPINATH K., SATHESHKUMAR P.S. & SAVITHRI H.S. Complete nucleotide sequence of Sesbania mosaic virus: a new virus species of the genus Sobemovirus. *Archives of Virology* 146:209-223. 2001.
- MELCHER, U. Similarities between putative transport proteins of plant viruses. *Journal of General Virology* 71:1009-1018. 1990.
- MOREIRA, A.E. & GASPAR, J.O. Propriedades moleculares de um isolado brasileiro do *Southern bean mosaic virus*. *Fitopatologia Brasileira* 27:292-297. 2002.
- OTHMAN, Y. & HULL, R. Nucleotide sequence of the bean strain of southern bean mosaic virus. *Virology* 206:287-297. 1995.
- SEHGAL, O.P. Southern Bean Mosaic Virus Group. In: Kurstak, P. (Ed.) *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis*. Elsevier/North Holland. 1981. pp.91-121.
- SIVAKUMARAN, K., BENJAMIN, C.F. & HACKER, D.L. Identification of viral genes required for cell-to-cell movement of southern bean mosaic virus. *Virology* 252:376-386. 1998.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V., FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., CARSTENS, E.B., ESTES, M.H., LEMON, S.M., MANILOFF, J., MAYO, M.A., MCGEOCH, D.J., PRINGLE, C.R. & WICKNER, R.B. *Virus Taxonomy: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press. 2000.
- WU, S., RINEHART, C.A. & KAESBERG, P. Sequence and organization of southern bean mosaic virus genomic RNA. *Virology* 161:73-80. 1987.