

SILVIA LEÃO DE CARVALHO

**EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA
CAPSIDIAL DE *Cowpea mild mottle virus* E SUAS APLICAÇÕES NA
DETECCÃO VIRAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C331e
2012
Carvalho, Silvia Leão de, 1985-
Expressão, purificação e caracterização da proteína capsial
de *Cowpea mild mottle virus* e suas aplicações na detecção viral
/ Silvia Leão de Carvalho. – Viçosa, MG, 2012.
viii, 46f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Claudine Márcia Carvalho.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Cowpea mild mottle virus*. 2. Soja - Doenças e pragas.
3. Vírus de planta. 4. Fitopatologia. 5. Teste imunoenzimático.
6. Sorologia. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 579.25

SILVIA LEÃO DE CARVALHO

**EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA
CAPSIDIAL DE *Cowpea mild mottle virus* E SUAS APLICAÇÕES NA
DETECÇÃO VIRAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 10 de fevereiro de 2012.

Francisco Murilo Zerbini Júnior
(Coorientador)

Poliane Alfenas Zerbini

Claudine Márcia Carvalho
(Orientadora)

Aos meus pais Maria Helena e Roberto,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força e sabedoria;
Aos meus pais, Maria Helena e Roberto, pela direção, apoio, incentivo e amor;
Aos meus irmãos, Renata, Sandra e Roberto pelo carinho, companheirismo e ótimos conselhos;
Aos meus sobrinhos, Laura e Gabriel, pelo amor e momentos mágicos proporcionados;
À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia, pelas oportunidades;
Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos;
À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos;
À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro;
À Prof.^a Claudine Márcia Carvalho pela orientação, disponibilidade, apoio e motivação;
Ao Prof. Francisco Murilo Zerbini pela orientação e apoio durante a realização do Mestrado;
Ao Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol) pela disponibilização do espectrômetro de massas tipo MALDI TOF/TOF. Ao prof. Humberto Josué O. Ramos e ao técnico Edvaldo Barros pelo auxílio na utilização do aparelho e na análise dos dados;
Aos funcionários do departamento de Fitopatologia que participaram direta ou indiretamente dessa jornada;
Ao Fábio Nascimento da Silva pela orientação e apoio durante a realização dos experimentos;
À Larissa, Adriana, Jonas e Glória pela amizade e ajuda nos momentos de aflição;
A todos do LVVM pela amizade, convivência agradável e pelas ajudas nos experimentos;
Aos colegas de mestrado pelos momentos de estudo e pela convivência durante as disciplinas;
Ao Jonas Alberto Rios pelo companheirismo, amizade, paciência e incentivo;
A todos os amigos, que fizeram dessa caminhada uma experiência prazerosa;
Agradeço a todos que contribuíram direta e indiretamente para o alcance desta vitória.

BIOGRAFIA

SILVIA LEÃO DE CARVALHO, filha de Maria Helena Leão de Carvalho e Roberto de Carvalho, nasceu na cidade de Sete Lagoas-MG, no dia 18 de abril de 1985.

Cursou o ensino fundamental e ensino médio na mesma cidade.

No ano de 2004, ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em janeiro de 2010.

Em 2010, iniciou o Mestrado no Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em 10 de fevereiro de 2012.

No mesmo ano, ingressou no Doutorado em Fitopatologia, na mesma instituição.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. A cultura da Soja (<i>Glycine max</i>).....	3
2.2. Viroses da soja de ocorrência no Brasil.....	4
2.3. A família <i>Betaflexiviridae</i>	6
2.4. O gênero <i>Carlavirus</i>	8
2.5. <i>Cowpea mild mottle virus</i> (CpMMV).....	9
3. REFERÊNCIAS.....	13
Produção de antissoro policlonal a partir da proteína capsidial de <i>Cowpea mild mottle virus</i> e suas aplicações na detecção viral	20
Abstract	21
1. Introduction	22
2. Material and Methods	24
2.1. Virus sources.....	24
2.2. RT-PCR and cloning in expression vector	24
2.3. Sequence analyses.....	24
2.4. Expression and purification of recombinant CpMMV Coat Protein	25
2.5. Characterization of purified recombinant CP	25
2.6. Immunization of rabbits.....	26
2.7. Evaluation of antisera	26
3. Results and Discussion.....	27
3.1. Cloning of the CP gene in pRSET-A.....	27

3.2. Physicochemical properties of CpMMV coat protein from isolate CpMMV:BR:BA:09.....	28
3.3. Expression, purification and characterization of CpMMV-CP recombinant protein	28
3.4. Indirect ELISA.....	29
3.5. Western blot analysis	30
4. Conclusion	31
5. References	32
6. Tables and Figures	37

RESUMO

CARVALHO, Silvia Leão, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Expressão, purificação e caracterização da proteína capsial de *Cowpea mild mottle virus* e suas aplicações na detecção viral.** Orientadora: Claudine Márcia Carvalho. Coorientador: Francisco Murilo Zerbini Júnior.

O *Cowpea mild mottle virus* (CpMMV), agente causal da necrose da haste, tem chamado a atenção dos produtores de soja nos últimos anos devido às perdas de produtividade geradas nas principais regiões produtoras do Brasil. A doença foi relatada pela primeira vez na região Centro-Oeste do Brasil, na safra de 2000/01, e rapidamente se espalhou por todo o país nos anos seguintes. Além disso, tem sido relatada a ocorrência de cultivares de soja assintomáticas, o que dificulta a seleção de genótipos para programas de melhoramento. Os métodos sorológicos para a detecção viral requerem o uso de um antissoro de boa qualidade para alcançar especificidade e sensibilidade. A sequência completa da capa proteica de um isolado brasileiro de CpMMV (Bahia) foi clonado em um vetor de expressão bacteriano e transformado em *Escherichia coli* BL21: DE3 para expressão *in vitro*. A proteína capsial ligada a uma cauda de histidina foi purificada sob condições desnaturantes através de cromatografia de afinidade, utilizando uma resina Ni-NTA. Depois da renaturação, a integridade e a identidade da proteína recombinante purificada foi confirmada por SDS-PAGE e análise de espectrometria de massa (MALDI-ToF/ToF). Dois coelhos da raça Nova Zelândia foram imunizados com quantidades crescentes da proteína recombinante. A especificidade e sensibilidade do antissoro foram avaliadas por Western blot e ELISA indireto. O antissoro policlonal a partir da proteína recombinante da capa proteica provou ser uma ferramenta confiável e eficiente para a detecção CpMMV.

ABSTRACT

CARVALHO, Silvia Leão, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2012. **Expression, purification and characterization of the capsid protein of *Cowpea mild mottle virus* and its application in virus detection.** Adviser: Claudine Márcia Carvalho. Co-adviser: Francisco Murilo Zerbini Júnior.

Cowpea mild mottle virus (CpMMV), the causal agent of stem necrosis disease, has drawn attention of soybean producers in recent years due to productivity losses in the main producing regions of Brazil. The disease was first recorded in the Midwest region of Brazil in the 2000/01 soybean season and rapidly spread throughout the country in the following years. CpMMV is usually hard to diagnose due to its wide range of symptoms while the occurrence of asymptomatic soybean cultivars complicates genotypic selection in breeding programs. Serological methods for viral detection require the use of an antiserum of good quality to achieve specificity and sensitivity. The entire coat protein sequence of a Brazilian CpMMV isolate was cloned into a bacterial expression vector and transformed into *Escherichia coli* BL21::DE3 for *in vitro* expression. The coat protein, fused to a 6 His-tag, was purified under denaturing conditions by affinity chromatography using a Ni-NTA resin. After renaturation, the integrity and identity of purified recombinant protein was confirmed by SDS-Page and MALDI-ToF/ToF mass spectrometer analyses. New Zealand rabbits were immunized with increasing amounts of the recombinant protein. The specificity and sensitivity of the antisera was shown by Western blot and indirect ELISA assays. The polyclonal antisera raised against recombinant coat protein proved to be a reliable tool for CpMMV detection.

1. INTRODUÇÃO

A soja é a mais importante fonte de proteína e óleo vegetal no mundo, sendo utilizada como matéria-prima na alimentação humana e animal e biocombustíveis. O Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos. O mosaico comum da soja, a necrose da haste, a queima do broto, o mosaico cálico, o mosaico anão, o mosaico crespo e o mosaico dourado são as principais viroses de ocorrência no Brasil.

A produtividade da cultura da soja vem sendo afetada pela incidência de uma doença conhecida como necrose da haste, a qual é causada pelo *Cowpea mild mottle virus* (CpMMV). Plantas de soja infectadas apresentam uma diversidade de sintomas como necrose da folha e da haste, clareamento das nervuras, mosaico e bolhosidade do limbo foliar. No entanto, plantas assintomáticas também foram relatadas. O CpMMV, pertence ao gênero *Carlavirus* (família *Betaflexiviridae*), possui partículas alongadas flexuosas e um genoma composto por uma fita simples de RNA sentido positivo apresentando seis ORFs (*open reading frames*). O CpMMV apresenta algumas características que não são comuns em outras espécies do gênero *Carlavirus*, tais como transmissão pela mosca-branca (*Bemisia tabaci*) e ocorrência de inclusões “brush-like”. No entanto, sua organização genômica e estratégia de expressão são similares as de outros carlavírus já sequenciados.

A doença foi identificada em 2001 no estado de Goiás. Desde então já foi relatada nos principais estados produtores de soja no Brasil. Em 2007, no município de Sorriso, Mato Grosso, foram coletadas plantas de soja com sintomas conhecidos na região como “soja louca”. Estas plantas apresentavam retenção foliar, sem formação de vagens ou vagens contendo poucos grãos e inflorescências do tipo macho estéril. Plantas com estes sintomas foram analisadas e os resultados demonstraram a presença de CpMMV. Em outras regiões, como em Barreiras, Bahia, também foi observado a presença de CpMMV, porém causando sintomas mais leves, possivelmente devido a presença de isolados com diferentes graus de agressividade. A possibilidade de existir uma nova estirpe altamente agressiva tem grande importância para a agricultura brasileira.

Viroses são de difícil diagnose. Um problema em relação a essa virose, além da grande diversidade de sintomas, é a ocorrência de infecções assintomáticas, o que

dificulta a seleção de genótipos para seleção em programas de melhoramento visando seu controle. O desenvolvimento de estratégias de controle efetivas é dependente principalmente da disponibilidade de métodos confiáveis para a detecção e identificação. A detecção do CpMMV geralmente é feita através de RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain) e testes de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Métodos moleculares, tais como RT-PCR, são mais sensíveis em relação aos métodos biológicos e sorológicos, porém sua aplicação requer profissionais qualificados e uso de equipamentos e materiais caros para síntese do DNA complementar. Desta forma, os testes serológicos como ELISA são os mais indicados para o uso rotineiro e para análise de grandes quantidades de amostras. O uso de um antissoro de boa qualidade é importante para alcançar especificidade e sensibilidade. Um antissoro policlonal a partir da purificação de partículas virais foi desenvolvido para detectar o CpMMV, no entanto, esta ferramenta já não está mais disponível e não existe atualmente nenhuma alternativa para a detecção sorológica do vírus no Brasil.

Este estudo objetivou a produção de antissoro policlonal a partir da capa protéica do CpMMV, isolado CpMMV:BR:BA:09 (Bahia), como uma ferramenta de diagnose.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura da Soja (*Glycine max*)

A soja cultivada comercialmente, *Glycine max* (L) Merrill, é uma leguminosa de ciclo anual, originada de clima temperado com adaptação aos climas subtropicais e tropicais (Sediyama *et al.*, 2005). Pertence à ordem Fabales, família *Fabaceae* (*Leguminosae*) e gênero *Glycine* L. A espécie *Glycine max* foi domesticada a partir do tipo selvagem *Glycine soja*, com centro de origem no nordeste da China (Sediyama *et al.*, 2005; Chung and Singh, 2008), sendo disseminada para o Ocidente através de navegações (Freitas, 2011). No Brasil o grão chegou por volta de 1882, sendo o professor Gustavo Dutra o responsável pelos primeiros estudos com a cultura no país. No entanto relatos oficiais de plantio ocorreram no Rio Grande do Sul em 1914 (EMBRAPA, 2012). A expansão da soja no Brasil aconteceu nos anos 1960 e 1970, durante um período de rápido crescimento na demanda mundial (Schnepf *et al.*, 2001).

A soja é a mais importante fonte de proteína e óleo vegetal no mundo, sendo utilizada como fonte de matéria-prima para as indústrias de esmagamento, que geram o óleo bruto e farelo, e como combustível (Finoto, 2008).

A produção no Brasil tem aumentado nos últimos anos e se destaca como a principal cultura de exportação (CONAB, 2012). O Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo ficando atrás apenas dos Estados Unidos (USDA, 2012). Na safra 2010/11 a produção no Brasil foi de 75 milhões de toneladas, representando 28,6% da produção mundial (USDA, 2012). A área plantada com soja em 2011/12, estimada em 24,63 milhões de toneladas representa 1,9%, ou 453,7 mil hectares superiores à cultivada na safra anterior, com destaque para os estados do Mato Grosso e Paraná (CONAB, 2012; Freitas, 2011).

Vários fatores podem afetar a produtividade da cultura, dentre os quais as doenças são um dos principais fatores limitantes da máxima produtividade. Aproximadamente 50 doenças causadas por diversos agentes já foram identificadas no Brasil (EMBRAPA, 2012). Este número continua aumentando com a expansão da soja em novas áreas, como consequência da monocultura e com a introdução de novos patógenos.

2.2. Víruses da soja de ocorrência no Brasil

No Brasil, diversas viroses já foram descritas na cultura da soja, ocasionando perdas variáveis de acordo com o agente e as condições edafoclimáticas (Almeida, 2008) (Tabela 1). As perdas devido a esses patógenos podem ocorrer de forma direta reduzindo o rendimento da planta, e/ou indiretamente reduzindo a qualidade das sementes colhidas (Almeida, 2000). Dentre as principais viroses destacam-se o mosaico comum, a necrose da haste, a queima do broto, o mosaico cálico, o mosaico anão, o mosaico crespo e o mosaico dourado.

Tabela 1. Vírus de maior ocorrência em soja no Brasil.

Vírus	Gênero	Referência
<i>Abutilon mosaic virus</i>	<i>Begomovirus</i>	Almeida (2008)
<i>Alfafa mosaic virus</i>	<i>Alfamovirus</i>	Almeida (2000)
<i>Bean golden mosaic virus</i>	<i>Begomovirus</i>	Fernandes (2009)
<i>Bean pod mottle virus</i>	<i>Comovirus</i>	Almeida (2008)
<i>Bean yellow mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	Almeida (2008)
<i>Cowpea mild mottle virus</i>	<i>Carlavirus</i>	Almeida <i>et al.</i> (2005)
<i>Cowpea severe mosaic virus</i>	<i>Comovirus</i>	Lin <i>et al.</i> (1981)
<i>Euphorbia mosaic virus</i>	<i>Begomovirus</i>	Almeida (2000)
<i>Soybean mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	Lourenção, Miranda <i>et al.</i> (1996)
<i>Bean rugose mosaic virus</i>	<i>Comovirus</i>	Almeida (2008)
<i>Tobacco mosaic virus</i>	<i>Tobamovirus</i>	Almeida (2008)
<i>Tomato spot wilt virus</i>	<i>Tospovirus</i>	Almeida (2008)
<i>Tobacco streak virus</i>	<i>Ilarvirus</i>	Lourenção, Costa <i>et al.</i> (1989)

O potyvirus *Soybean mosaic virus* (SMV), agente etiológico do mosaico comum da soja, induz sintomas de nanismo, redução do número de vagens, mosaico, distorção do limbo foliar e perda generalizada de vigor. Além disso, causa um sintoma típico que consiste no aparecimento da “mancha-café” ocasionada pela supressão do silenciamento pós-transcricional dos genes *CHS*, responsáveis pela regulação da pigmentação, levando a uma série de restrições à comercialização no mercado interno e externo (Lourenção *et al.*, 1996; Almeida, 2000; Senda *et al.*, 2004; Gagarinova *et al.*, 2008). O SMV é transmitido via sementes e através de afídeos durante as picadas de prova (Barros e

Silva, 1992; Almeida, 2008), sendo controlado através do uso de cultivares resistentes (Almeida, 2000; Chowda-Reddy *et al.*, 2011). Três genes *R* dominantes (*Rsv1*, *Rsv3* e *Rsv4*) foram identificados e utilizados para o desenvolvimento de linhagens de soja resistentes ao SMV (Chowda-Reddy *et al.*, 2011)..

De acordo com Lourenção *et al.* (1989), a queima do broto, causada pelo vírus *Tobacco streak virus* (TSV), foi identificada pela primeira vez no Brasil durante a década de 1950. O TSV pertence ao gênero *Ilarvirus* na família *Bromoviridae*, apresenta partículas isométricas de aproximadamente 25 a 35 nm de diâmetro e RNA genômico de fita simples sentido positivo (Codoñer e Elena, 2006). Apresenta ampla gama de hospedeiros, tendo sua ocorrência relatada em soja, fumo, algodão, alface, amendoim, girassol, tomate e algumas plantas daninhas (Almeida, 2000; Abtahi e Habibi, 2008; Sivaprasad *et al.*, 2010). O TSV é transmitido por tripes do gênero *Frankliniella* e também por sementes. Os brotos apresentam sintomas como curvatura, quebradiço e necrose. A medula da haste principal apresenta-se escura, sendo esta a característica principal para diagnose da doença. Os trifólios jovens tornam-se amarelo-castanho, com inúmeras lesões microscópicas e queda das folhas (Almeida, 2008). Em algumas regiões produtoras no estado do Paraná, os danos causados pela doença inviabilizaram o cultivo devido aos prejuízos gerados (Almeida, 2000). Como a população de tripes é reduzida pela ação das chuvas, como medida de controle recomenda-se semeaduras tardias, época em que a incidência da virose permanece inferior a 15% de plantas infectadas (Almeida, 2000).

O *Alfalfa mosaic virus* (AMV) do gênero *Alfamovirus* é o agente causal do mosaico cálico da soja (Moreira *et al.*, 2010). O AMV ocorre em todo o mundo, é transmitido por sementes e por afídeos de forma não persistente, e pode infectar sistemicamente diversas espécies de plantas (He *et al.*, 2010; Moreira *et al.*, 2010). Plantas infectadas geralmente apresentam sintomas como áreas amareladas nas folhas primárias, clorose internerval, clorose nas bordas do trifólio e apresentam uma capacidade de fixação de nitrogênio reduzida (Almeida, 2000; Panter *et al.*, 2011). O mosaico cálico é pouco detectado no campo, no entanto o modo de transmissão e a ocorrência de sinergismo em infecções mistas com SMV contribuem para o potencial de danos que a virose pode causar na cultura (Almeida, 2000; Malapi-Nelson *et al.*, 2009). O controle é feito pelo uso de sementes sadias e cultivares resistentes (Almeida, 2000).

Plantas de soja infectadas com o *Euphorbia mosaic virus* (EMV), causador da doença conhecida como mosaico anão, apresentam sintomas de nanismo e superbrotamento com redução e deformação do folíolo, sendo que a infecção somente é observada durante o estágio da floração (Almeida, 2000). O EMV pertence ao gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) contendo genoma bipartido composto de duas moléculas de ssDNA circulares, referidas como DNA-A e DNA-B (Almeida, 2000; Rodríguez-Pardina *et al.*, 2006; Collins *et al.*, 2009; Gregorio-Jorge *et al.*, 2010). Membros desse gênero são transmitidos pela mosca-branca *Bemisia tabaci* que possui ampla gama de dicotiledôneas hospedeiras (Gregorio-Jorge *et al.*, 2010). Nas últimas décadas as doenças viróticas causadas por begomovirus vêm se destacando como ameaça a produtividade da soja devido ao aumento da densidade populacional do inseto vetor, a expansão da monocultura e o transporte de materiais que permitem a introdução e disseminação do biótipo B de *B. tabaci* (Fernandes, 2009; Gregorio-Jorge *et al.*, 2010; Fernandes *et al.*, 2011). O *Sida micrantha mosaic virus* (agente causal do mosaico crespo), *Bean golden mosaic virus* (mosaico dourado do feijoeiro) e *Sida mottle virus* (SiMoV) são outros exemplos de begomoviroses relatados em soja (Rodríguez-Pardina *et al.*, 2006; Almeida, 2008; Fernandes *et al.*, 2009; Alabi *et al.*, 2010).

2.3. A família *Betaflexiviridae*

A família *Betaflexiviridae* agrupa vírus com genoma de RNA fita simples e sentido positivo e seus membros compartilham uma linhagem distinta de proteínas de replicação do supergrupo III (“alphavirus-like”) (van der Heijden e Bol, 2002; King *et al.*, 2011). A família inclui vírions alongados com morfologia flexuosa, característica esta que também é observada em outras famílias de vírus de plantas, como *Alphaflexiviridae* e *Potyviridae* (Adams *et al.*, 2004; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001; Martelli *et al.*, 2007).

As bases para delimitação na família são de acordo com análises filogenéticas das proteínas de replicação e capa protéica, além de características da organização e estratégias de expressão genômica (Adams *et al.*, 2004; Martelli *et al.*, 2007). De acordo com o 9º Relatório do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), a família *Betaflexiviridae* inclui os gêneros *Capillovirus*, *Carlavirus*, *Citriovirus*, *Foveavirus*, *Trichovirus* e *Vitivirus* (King *et al.*, 2011).

O capsídeo viral de todos os membros é composto de um único polipeptídeo que varia em tamanho de 18 a 44 kDa, envolvendo uma única molécula de RNA poliadenilada na extremidade 3' de aproximadamente 6 a 9 Kb (King *et al.*, 2011; Martelli *et al.*, 2007). O número de ORFs é variável entre os gêneros, às vezes no gênero, a primeira e maior ORF é sempre o gene da replicase (Martelli *et al.*, 2007). O produto da ORF 1 é uma proteína de 190-250 kDa que apresenta homologia com proteínas da polimerase do supergrupo “alphavirus-like”, onde contém os domínios conservados para atividade de Metiltransferase (MTR), Papain-like protease (P-Pro), Helicase (Hel) e RNA dependente de RNA polimerase (RdRp) (van der Heijden e Bol, 2002; Tavassoli *et al.*, 2009; King *et al.*, 2011). Seguindo a polimerase, os gêneros *Capillovirus*, *Citrivirus*, *Trichovirus* e *Vitivirus* possuem uma única proteína de movimento que é membro da superfamília “p30-like” (Martelli *et al.*, 2007). Para os demais gêneros e espécies virais, o movimento célula-a-célula via plasmodesmas fica ao encargo dos produtos gênicos de três ORFs parcialmente sobrepostas, o chamado Bloco Triplo de Genes (TGB), que são expressas a partir de RNAs subgenômicos (sgRNA) (Morozov e Solovyev, 2003). TGBp1 possui atividade de ligação a RNA, ATPase e helicase e acredita-se que ela seja responsável por aumentar o limite de exclusão dos plasmodesmas (Martelli *et al.*, 2007). Análises funcionais das proteínas codificadas pelo *Potato virus X* (PVX), família *Alphaflexiviridae*, revelam que a TGBp1 também apresenta forte atividade supressora de silenciamento (Senchu *et al.*, 2009). Atividade semelhante foi relatada para o *Potato virus M* (PVM), gênero *Carlavirus*, onde o TGBp1 é uma supressora que atua durante o movimento viral (Senchu *et al.*, 2009). Já as TGBp2 e TGBp3 contêm sequências hidrofóbicas que podem estar envolvidas na interação proteína-membrana (Martelli *et al.*, 2007; Meng e Li, 2010). Análises de mutação em clones infecciosos demonstram que as três proteínas do TGB são essenciais para o processo de movimento viral (Morozov e Solovyev, 2003). A ORF que codifica para proteína capsial (CP) é a última ou penúltima ORF do genoma, sendo expressa a partir de um abundante RNA monocistrônico (Martelli *et al.*, 2007). Nos gêneros *Vitivirus* e *Carlavirus*, uma ORF adicional (denominada ORF6) é encontrada e codifica uma proteína de função desconhecida, a qual apresenta um motivo dedo-de-zinco e a habilidade de se ligar a ácido nucléico (King *et al.*, 2011). Além disso, a ORF6 apresenta alta variabilidade de sequência entre as diferentes espécies, o que indica transmissão horizontal do gene (Martelli *et al.*, 2007; Tzanetakis *et al.*, 2007; King *et al.*, 2011). Em

alguns casos o produto da ORF 6 têm demonstrado atuar como supressora de silenciamento como, por exemplo, para o GVA e PVM (Zhou *et al.*, 2006; Senchu *et al.*, 2011).

2.4. O gênero *Carlavirus*

Os membros do gênero *Carlavirus* são conhecidos por apresentarem seis ORFs, incluindo o TGB, e modo de transmissão via inseto-vetor (King *et al.*, 2011). Plantas infectadas por carlavirus geralmente têm sintomas muito leves ou permanecem assintomáticas e, portanto, o termo "latente" aparece nos nomes de muitas espécies do gênero, incluindo a espécie tipo *Carnation latent virus* (Foster, 1992). Para demarcação de espécies no gênero são analisadas as sequências dos genes da capa protéica e replicase. Espécies distintas são prontamente diferenciadas por sorologia e apresentam identidade de sequência de nucleotídeos inferior a 72% com outras espécies e/ou inferior a 80% de identidade de aminoácidos (Mahy e Regenmortel, 2009).

De forma geral, a transmissão natural de carlavírus ocorre através de afídeos de forma não persistente, com exceção do CpMMV e do *Melon yellowing-associated virus* (MYaV), que são transmitidos pela mosca-branca (*Bemisia tabaci*) (Nagata *et al.*, 2005; Martelli *et al.*, 2007; King *et al.*, 2011; Menzel *et al.*, 2011). Embora sementes infectadas representem uma importante forma de disseminação, são poucos os exemplos de carlavírus em que a transmissão via semente possua impacto epidemiológico, sendo relatada para o *Hop mosaic virus* (HpMV), *Potato virus M* (PVM), *Pea streak virus* (PeSV), *Red clover vein mosaic virus* (RCVMV) e para alguns isolados de *Cowpea mild mottle virus* (CpMMV) (Martelli *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2010).

A estrutura e organização do genoma são conservadas entre os carlavírus e por meio do sequenciamento, parcial ou completo, de várias espécies do gênero foi possível a sua determinação (Martelli *et al.*, 2007). A ORF 1 codifica um polipeptídeo de aproximadamente 223 kDa que constitui a replicase viral. A ORF 2 (aproximadamente 25kDa), ORF 3 (aproximadamente 12kDa) e ORF 4 (aproximadamente 7kDa) formam o TGB envolvido no movimento intercelular do vírus (Bratney *et al.*, 2002; Martelli *et al.*, 2007; Dinesen *et al.*, 2009). A ORF 5 codifica a capa proteica (31–36kDa) e levemente sobrepõe a ORF 6, a qual codifica uma proteína (11-16kDa) de função não determinada (Zavriev *et al.*, 1991; Spiegel *et al.*, 2007; Poke, 2008).

As partículas virais do gênero *Carlavirus* são altamente imunogênicas, enquanto que dos demais gêneros da família *Betaflexiviridae* são considerados como imunógenos medianos a pobres (King *et al.*, 2011). Determinadas moléculas possuem, em sua estrutura, regiões capazes de induzir a formação de anticorpos, tais regiões são denominadas como determinantes antigênicos ou epitopos (Almeida, 2001). Partindo do princípio de que essas regiões antigênicas sejam hidrofílicas, uma vez que precisam estar expostas na superfície da proteína para serem reconhecidas pelos anticorpos, Parker *et al.* (1986) propuseram uma escala de hidrofiliidade para análise de sítios antigênicos. Em um estudo das relações antigênicas entre as subunidades da capa proteica e dos vírons intactos de *Lily symptomless virus* (LSV), concluiu-se que a proteína capsidial após renaturação conservava a especificidade e antigenicidade da partícula em sua forma nativa (Wang *et al.*, 2010). Através do software ANTHEPROT, utilizando o método descrito por Parker *et al.*, verificou-se que as regiões antigênicas se concentravam na região N-terminal e C-terminal (Wang *et al.*, 2010). O software ANTHEPROT baseia-se nas metodologias descritas por Parker *et al.* (1986) e Welling *et al.* (1985). O método de Parker, conforme citado anteriormente, leva em consideração as propriedades hidrofílicas dos epitopos (Parker *et al.*, 1986). Já o método de Welling baseia-se na comparação da sequência de aminoácidos com aminoácidos presente em determinantes antigênicos conhecidos de proteínas homólogas (Welling *et al.*, 1985).

2.5. Cowpea mild mottle virus (CpMMV)

O *Cowpea mild mottle virus* (CpMMV) foi descrito pela primeira vez infectando caupi (*Vigna unguiculata* L.) em Ghana [Brunt and Kenten (1973) citado por Menzel *et al.* (2010)], e desde então sua ocorrência tem sido relatada em diversos hospedeiros em diferentes regiões geográficas (Iwaki *et al.*, 1982; Naidu *et al.*, 1998; Laguna *et al.*, 2006; Tavassoli *et al.*, 2009; Menzel *et al.*, 2010). O CpMMV apresenta algumas características que não são comuns em outras espécies do gênero *Carlavirus*, tais como transmissão pela mosca-branca e ocorrência de inclusões “brush-like” (Martelli *et al.*, 2007). Apesar dessas diferenças, a organização genômica e o tamanho das prováveis proteínas são similares aos de outros carlavírus bem caracterizados (Zavriev *et al.*, 1991; Naidu *et al.*, 1998; Bratney *et al.*, 2002; Poke, 2008; Dinesen *et al.*, 2009; Menzel *et al.*, 2010). Seu genoma é composto por uma fita simples de RNA, sentido positivo, de

6,48 a 8,6 kb, incluindo seis ORFs, Cap (7 metil guanosina) na extremidade 5' e cauda poli(A) na extremidade 3' (Naidu *et al.*, 1998; Almeida *et al.*, 2003; Rodríguez-Pardina *et al.*, 2004; Menzel *et al.*, 2010).

Em contraste com a maioria dos carlavírus, que são transmitidos por afídeos, o CpMMV é transmitido pelo aleirodídeo *Bemisia tabaci* de forma não-persistente (Naidu *et al.*, 1998; Almeida *et al.*, 2005; Marubayashi *et al.*, 2010). Há relatos de transmissão através de sementes para algumas leguminosas como feijão e soja (Horn *et al.*, 1991; Naidu *et al.*, 1998; Almeida *et al.*, 2003; Tavassoli *et al.*, 2008). Devido à replicação ocorrer em células do mesófilo do hospedeiro, o vírus é facilmente transmitido de forma mecânica para hospedeiros experimentais (Almeida *et al.*, 2003; Martelli *et al.*, 2007). Hospedeiros naturais do CpMMV são mais restritos à família *Fabaceae*, e a gama de hospedeiros experimentais inclui plantas de diferentes famílias botânicas, destacando-se as espécies leguminosas (Almeida *et al.*, 2005; Marubayashi, 2006). Os sintomas variam de acordo com o hospedeiro e a época do ano, em geral se apresentam como mosaico, mosqueado, clorose, anéis cloróticos, clareamento de nervuras, nanismo e distorção foliar (Rodríguez-Pardina *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2005; Laguna *et al.*, 2006; Tavassoli *et al.*, 2009; Menzel *et al.*, 2010; Zanardo, 2010). Em plantas de soja, sintomas mais severos como necrose da haste, dos pecíolos e brotos, redução do porte e até morte de plantas também foram relatados (Mituti, 2006).

O primeiro relato de CpMMV no Brasil ocorreu em 1979 como uma nova virose do feijoeiro. Devido aos sintomas apresentados na cultivar Jalo, como lesões cloróticas e mosaico angular amarelo, o CpMMV foi inicialmente descrito como *Bean angular mosaic virus* (BAMV) (Costa *et al.*, 1983; Rodríguez-Pardina *et al.*, 2004). No entanto, através de análises sorológicas e microscopia eletrônica concluiu-se que BAMV se tratava de uma estirpe do CpMMV (Fernandes, 2009).

No estado de Goiás durante a safra de 2000/01 os produtores de soja se depararam com uma nova doença denominada necrose da haste. Foram observadas plantas de soja com sintomas de nanismo e necrose na haste. Devido à severidade dos sintomas acreditou-se, inicialmente, ser uma doença de etiologia fúngica, mas as tentativas de isolamento foram mal sucedidas (Almeida *et al.*, 2005). Com a ocorrência de novos surtos em diferentes regiões, amostras de plantas infectadas foram coletadas e levadas para observação onde foi possível verificar a ocorrência de sintomas como mosaico e queima do broto, o que sugeriu uma etiologia viral (Almeida *et al.*, 2005).

Esses sintomas podem ser causados por diferentes vírus como *Soybean mosaic virus*-SMV (*Potyvirus*), *Tobacco ringspot virus*-TRSV (*Nepovirus*), *Tobacco streak virus*-TSV (*Ilarvirus*). Através de ensaios de transmissão, microscopia eletrônica, estudos moleculares e sorológicos, o agente causal foi determinado como *Cowpea mild mottle virus* (CpMMV), apresentando 84,8% de identidade com sequências de CpMMV disponíveis no genbank (Almeida *et al.*, 2005). Nos anos seguintes, severas ocorrências foram relatadas nos estados do Mato Grosso, Bahia, Maranhão e Minas Gerais, limitando a produção de soja (Almeida *et al.*, 2005; Laurindo *et al.*, 2008; Zanardo, 2010). A ocorrência do CpMMV também tem sido relatada na Ásia, Índia, leste da África e Argentina, alguns dos maiores produtores mundiais de soja (Laguna *et al.*, 2006; USDA, 2012).

Embora outras viroses sejam descritas em soja, nenhuma causou tantas perdas quanto à necrose da haste, principalmente pela agressividade e pela distribuição generalizada no país. De acordo com Marubayashi *et al.* (2010), a população da mosca-branca é diretamente proporcional a taxa de transmissão viral, sendo essencial um controle eficiente do vetor para reduzir a incidência do CpMMV em cultivares de soja suscetíveis. No entanto, o controle químico da mosca-branca é economicamente inviável devido ao tipo de relacionamento vírus-vetor existente. Além disso, sua ampla gama de hospedeiros combinado com os hospedeiros do CpMMV restringe as opções para uma rotação de culturas (Naidu *et al.*, 1998; Gregorio-Jorge *et al.*, 2010; Marubayashi *et al.*, 2010). Dessa forma, o uso de uma cultivar resistente como medida de controle se torna uma alternativa para reduzir ou impedir as perdas dos produtores.

Com observações de campo foi possível constatar algumas cultivares de soja que não apresentavam sintomas, sendo, portanto, consideradas resistentes e adequadas como progenitores em programas de melhoramento genético (Almeida *et al.*, 2003). No entanto, após a purificação do vírus e disponibilização de antissoro constatou-se que os genótipos assintomáticos estavam infectados, sendo então considerados tolerantes (Mituti, 2006). A partir do cruzamento entre as cultivares de soja BRS133 (resistente) e CD206 (suscetível) foi possível mapear um gene de resistência denominado *Rssn* (*Resistance to soybean stem necrosis*) (Oliveira *et al.*, 2008). O mapeamento detalhado desta região genômica poderá identificar marcadores a serem utilizados em programas de seleção assistida por marcadores moleculares, no melhoramento genético da soja

(Oliveira *et al.*, 2008). Recentemente uma nova cultivar de soja foi lançada no estado de Minas Gerais, a UFUS Riqueza, resistente à necrose da haste (Hamawaki *et al.*, 2011).

3. REFERÊNCIAS

- Abtahi, F. S. e Habibi, M. K. (2008). Host range and some characterization of *Tobacco streak virus* isolated from lettuce in Iran. African Journal of Biotechnology, v.7, n.23, p.4260-4264.
- Adams, M. J.; Antoniw, J. F.; Bar-Joseph, M.; Brunt, A. A.; Candresse, T.; Foster, G. D.; Martelli, G. P.; Milne, R. G.; Fauquet, C. M. (2004). The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. Archives of Virology, v.149, p.1045-1060.
- Alabi, O. J.; Kumar, P. L.; Mgbечи-Ezeri, J. U.; Naidu, R. A. (2010). Two new 'legumoviruses' (genus *Begomovirus*) naturally infecting soybean in Nigeria. Archives of Virology, v.155, n.5, May, p.643-56. 2010.
- Almeida, A. M. R. (2000). Vírus de Soja. Cultivar, p. 26-32.
- Almeida, A. M. R. (2008). Virose da Soja no Brasil: Sintomas, Etiologia, Controle. Embrapa Série Documentos 306
- Almeida, A. M. R. e Lima, J. A. A. (Eds) (2001). Princípios e Técnicas de Diagnose Aplicados em Fitopatologia. Londrinaed.
- Almeida, A. M. R.; Piuga, F. F.; Kitajima, E. W.; Gaspar, J. O.; Valentin, N.; Benato, L. C.; Marin, S. R. R.; Bineck, E.; Belintani, P.; Nunes-Junior, J.; Hoffmann, L.; Meyer, M. C. (2003). Necrose da Haste da Soja. Embrapa Série Documentos 221
- Almeida, A. M. R.; Piuga, F. F.; Marin, S. R. R.; Kitajima, E. W.; Gaspar, J. O.; Oliveira, T. G.; Moraes, T.G. (2005). Detection and partial characterization of a carlavirus causing stem necrosis of soybean in Brazil. . Fitopatologia Brasileira v.30, p.191-194.
- Barros, A. S. D. R. e W. R. D. Silva. (1992). Transmissibilidade do vírus do mosaico comum da soja (VMCS) por intermédio das sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Scientia Agricola, v.49, n.1, p.155-158.
- Bratney, C.; Badge, J. L.; Burns, R.; Foster, G. D.; George, E.; Goodfellow, H. A.; Mulholland, V.; McDonald, J. G.; Jeffries, C. J. (2002). Potato latent virus: a proposed new species in the genus *Carlavirus*. Plant Pathology. v.51, p.495-505.
- Chowda-Reddy, R. V.; Sun, H.; Hill, J. H.; Poysa, V.; Wang, A. (2011). Simultaneous mutations in multi-viral proteins are required for *Soybean mosaic virus* to gain virulence on soybean genotypes carrying different *R* genes. PLoS ONE, v.6, n.11, p.e28342.

- Chung, G. e Singh, R. J. (2008). Broadening the Genetic Base of Soybean: A Multidisciplinary Approach. Critical Reviews in Plant Sciences, v.27, p.295-341.
- Codoñer, F. M. e Elena, S. F. (2006). Evolutionary relationships among members of the *Bromoviridae* deduced from whole proteome analysis. Archives of Virology, v.151, p.299-307.
- Collins, A. M.; Brown, J. K.; Mujaddad-Rehman, M.; Roye, M. E. (2009). Complete nucleotide sequence of an isolate of *Euphorbia mosaic virus* that infects *Euphorbia heterophylla* and *Wissadula amplissima* in Jamaica. Archives of Virology, v.154, p.1859-60.
- CONAB. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, quarto levantamento. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_01_10_10_53_02_boletim_graos_4o_levantamento.pdf . Acessado em 20 jan 2012.
- Costa, A. S., J.; Gaspar, J. O.; Veja, J. (1983). Mosaico angular do feijoeiro Jalo causado por um 'carlavirus' transmitido pela mosca branca *Bemisia tabaci*. Fitopatologia Brasileira, v.8, p.325-337.
- Cupertino, F. P.; Costa, L. C.; Kitajima, E. W. (1991). Infecção natural da soja pelo vírus do mosaico em desenho do feijoeiro no Distrito Federal. Fitopatologia Brasileira, v.16, p.246-250.
- Dinesen, M.; Lundmark, M.; Albrechtsen, M. (2009). Complete genome sequences of two isolates of Kalanchoë latent virus. Archives of Virology, v.154, p.1173-1175. 2009.
- EMBRAPA. Embrapa Soja. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/>. Acessado em 06 jan 2012.
- Fernandes, F. R. Caracterização molecular e biológica de begomovírus de soja (*Glycine max*) e leiteiro (*Euphorbia heterophylla*) e resistência a vírus mediada por RNA interferente em plantas transgênicas de soja. Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009. 131 p.
- Fernandes, F. R.; Albuquerque, L. C.; de Oliveira, C. L.; Cruz, A. R.; da Rocha, W. B.; Pereira, T. G.; Naito, F. Y.; Dias Nde, M.; Nagata, T.; Faria, J. C.; Zerbini, F. M.; Aragao, F. J.; Inoue-Nagata, A. K. (2011). Molecular and biological characterization of a new Brazilian begomovirus, euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV), infecting *Euphorbia heterophylla* plants. Archives of Virology, v.156, p.2063-9.
- Fernandes, F. R.; Cruz, A. R. R.; Faria, J. C.; Zerbini, F. M.; Aragão, F. J. L. (2009). Three distinct begomoviruses associated with soybean in central Brazil. Archives of Virology, v.154, p.1567-1570.

- Finoto, E. L. Variabilidade fenotípica dos teores de óleo e proteína de cultivares de soja em diferentes ambientes. 2008. 130p. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Departamento de Fitotecnia. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.
- Foster, G. D. (1992). The structure and expression of the genome of carlaviruses. Res Virol, v.143, p.103-12.
- Freitas, M. C. M. A cultura da soja no Brasil: o crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. Goiânia. Centro Científico Conhecer. 2011. 12 p.
- Gagarinova, A. G.; Babu, M.; Poysa, V.; Hill, J. H.; Wang, A. (2008). Identification and molecular characterization of two naturally occurring *Soybean mosaic virus* isolates that are closely related but differ in their ability to overcome Rsv4 resistance. Virus Research, v.138, p.50-56.
- Gregorio-Jorge, J., Bernal-Alcocer, A.; Banuelos-Hernandez, B.; Alpuche-Solis, A. G.; Hernandez-Zepeda, C.; Moreno-Valenzuela, O.; Frias-Trevino, G.; Arguello-Astorga, G. R. (2010). Analysis of a new strain of *Euphorbia mosaic virus* with distinct replication specificity unveils a lineage of begomoviruses with short Rep sequences in the DNA-B intergenic region. Virology Journal, v.7, p.275.
- Hamawaki, O. T.; Sousa, L. B.; Rezende, D. F.; Cavalcante, A. K.; dos Santos, M. A.; Hamawaki, C. D. L. (2011). UFUS Riqueza: a new soybean cultivar for the state of Minas Gerais. Crop Breeding and Applied Biotechnology, v.11, p.94-96.
- He, B.; Fajolu, O. L.; Wen, R. H.; Hajimorad, M. R. (2010). Seed transmissibility of *Alfalfa mosaic virus* in soybean. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2010-1227-01-BR.
- Horn, N. M.; Saleh, N.; Baliadi, Y. (1991). Cowpea mild mottle virus could not be detected by ELISA in soybean and groundnut seeds in Indonesia. European Journal of Plant Pathology, v.97, n.2, p.125-127.
- Iwaki, M.; Thongmeearkom, P.; Honda, Y.; Hibi, T. (1982). Whitefly transmission and some properties of *Cowpea mild mottle virus* of soybean in Thailand. Plant Disease, v.66, n.5, p.365-368.
- King, A. M. Q.; Adams, M. J.; Carstens, E. B.; Lefkowitz, E. J. (Eds). Virus Taxonomy: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, San Diego, CA: Elsevier Academic Press 2011. 1338 p.
- Laguna, I. G.; Arneodo, J. D.; Rodríguez-Pardina, P.; Fiorona, M. (2006). Cowpea mild mottle virus infecting soybean crops in northwestern Argentina. Fitopatologia Brasileira, v.31, p.317-317.
- Laurindo, D. G.; Soldera, M. C. A.; Balestri, M. R. D.; Hoffman, L. L.; Meyer, M. C.; Almeida, A. M. R. Identificação do *Cowpea mild mottle virus* em Soja no

- Município de Sorriso, Mato Grosso. In: III Jornada Acadêmica Embrapa Soja. 2008, Londrina, resumo expandido, p 26-29.
- Lin, M. T.; Anjos, J. R. N.; Rios, G. P. (1981). Serological Grouping of *Cowpea severe mosaic virus* Isolates from Central Brazil. Phytopathology, v.71, p.435-438.
- Lourenção, A. L.; Costa, A. S.; de Miranda, M. A. C. (1989). Resistência de campo ao vírus da queima-do-broto em genótipos de soja resistentes a insetos. Bragantia, v.48, p.209-214.
- Lourenção, A. L.; de Miranda, M. A. C.; Costa, A. S. (1996). "Mancha-café" em soja: seleção para resistência e interação entre genótipos e épocas de inoculação. Bragantia, v.55, p.105-116.
- Mahy, B. W. J. e Regenmortel, M. H. V. V. Desk encyclopedia of plant and fungal virology. San Diego, CA: Elsevier Academic Press. 2009
- Malapi-Nelson, M.; Wen, R. H.; Ownley, B. H.; Hajimorad, M. R. (2009). Co-infection of soybean with *Soybean mosaic virus* and *Alfalfa mosaic virus* results in disease synergism and alteration in accumulation level of both viruses. Plant Disease, v.93, p.1259-1264.
- Martelli, G. P.; Adams, M. J.; Kreuze, J. F.; Dolja, V. V. (2007). Family Flexiviridae: a case study in virion and genome plasticity. Annual Review of Phytopathology, v.45, p.73-100.
- Marubayashi, J. M. Cowpea mild mottle virus: transmissão, círculo de hospedeiras e resposta à infecção de cultivares IAC de feijão e soja. Agricultura Tropical e Subtropical, Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2006. 42 p.
- Marubayashi, J. M.; Yuki, V. A.; Wutke, E. B. (2010). Transmissão do *Cowpea mild mottle virus* pela mosca branca *Bemisia tabaci* biótipo B para plantas de feijão e soja. Summa Phytopathologica, v.36, p.158-160.
- Meng, B. e Li, C. (2010). The capsid protein of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus contains a typical nuclear localization signal and targets to the nucleus. Virus Research, v.153, p.212-217.
- Menzel, W.; Abang, M. M.; Winter, S. (2011). Characterization of cucumber vein-clearing virus, a whitefly (*Bemisia tabaci* G.)-transmitted carlavirus. Archives of Virology, v.156, p.2309-11.
- Menzel, W.; Winter, S.; Vetten, H. J. (2010). Complete nucleotide sequence of the type isolate of *Cowpea mild mottle virus* from Ghana. Archives of Virology, v.155, p.2069-2073.
- Mituti, T. e Almeida, A. M. R. Tolerância ao *Cowpea mild mottle virus* e sua concentração relativa em soja. In: II Jornada Técnica da Embrapa Soja. v.1, 2006, Londrina, resumo expandido, p.168-170.

- Moreira, A. G.; Kitajima, E. W.; Rezende, J. A. M. (2010). Identification and partial characterization of a *Carica papaya*-infecting isolate of *Alfalfa mosaic virus* in Brazil. Journal of General Plant Pathology, v.76, p.172-175.
- Morozov, S. Y. e Solovyev, A. G. (2003). Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. Journal of General Virology, v.84, p.1351-66.
- Nagata, T.; Alves, D. M.; Inoue-Nagata, A. K.; Tian, T. Y.; Kitajima, E. W.; Cardoso, J. E.; de Avila, A. C. (2005). A novel melon flexivirus transmitted by whitefly. Archives of Virology, v.150, p.379-87.
- Naidu, R. A.; Gowda, S.; Satyanarayana, T.; Boyko, V.; Reddy, A. S.; Dawson, W. O. Reddy, D. V. R. (1998). Evidence that whitefly-transmitted *Cowpea mild mottle virus* belongs to the genus *Carlavirus*. Archives of Virology, v.143, p.769-780.
- Oliveira, M. A. R.; Pipolo, V. C.; Nora, T. D.; Mioranza, F.; Rocha, M.; Pellizzaro, K.; Calgaro, L. C.; Vieira, E. S. N.; Dellagostin, M.; Vicente, D.; Schuster, I. Mapeamento genético da resistência da soja à necrose da haste da soja. In: 54^o Congresso Brasileiro de Genética. Salvador, 2008, resumo, p 85.
- Parker, J. M., Guo, D.; Hodges, R. S. (1986). New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. Biochemistry, v.25, p.5425-32.
- Poke, F. S. (2008). *Hop mosaic virus*: complete nucleotide sequence and relationship to other carlaviruses. Archives of Virology, v.153, p.1615-1619.
- Rodríguez-Pardina, P. E.; Arneodo, J. D.; Truol, G. A.; Herrera, P. S.; Laguna, I. G. (2004). First record of *Cowpea mild mottle virus* in bean crops in Argentina. Australasian Plant Pathology, v.33, p.129-130.
- Rodríguez-Pardina, P. E.; Zerbini, F. M.; Ducasse, D. A. (2006). Genetic diversity of begomoviruses infecting soybean, bean and associated weeds in Northeastern Argentina. Fitopatologia Brasileira, v.31, p.342-348.
- Santos, D. F. D. Reação de cultivares de soja a *Meloidogyne morocciensis*. 2011. 50 p. Monografia (Graduação em Agronomia). Universidade de Brasília, Brasília, 2011.
- Schnepf, R. D.; Dohlman, E.; Bolling, C (Eds). Soybeans, Agriculture, and Policy in Brazil. In: Agriculture in Brazil and Argentina: Agriculture and Trade Report, 2001. Soybeans, Agriculture, and Policy in Brazil, p.85
- Sediyama, T.; Teixeira, R. C.; Reis, M. S. Melhoramento da Soja. In: A. Borém (Ed.). Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: Editora UFV, 2005. Melhoramento da Soja, 969p.

- Senda, M.; Masuta, C.; Ohnishi, S.; Goto, K.; Kasai, A.; Sano, T.; Hong, J. S.; MacFarlane, S. (2004). Patterning of virus-infected *Glycine max* seed coat is associated with suppression of endogenous silencing of chalcone synthase genes. Plant Cell, v. 16, p. 807-18.
- Senshu, H.; Ozeki, J.; Komatsu, K.; Hashimoto, M.; Hatada, K.; Aoyama, M.; Kagiwada, S.; Yamaji, Y.; Namba, S. (2009). Variability in the level of RNA silencing suppression caused by triple gene block protein 1 (TGBp1) from various potexviruses during infection. Journal of General Virology, v.90, p.1014-24.
- Senshu, H.; Yamaji, Y.; Minato, N.; Shiraishi, T.; Maejima, K.; Hashimoto, M.; Miura, C.; Neriya, Y.; Namba, S. (2011). A dual strategy for the suppression of host antiviral silencing: two distinct suppressors for viral replication and viral movement encoded by potato virus M. Journal of Virology, v.85, p.10269-78.
- Sivaprasad, Y.; Reddy, B. V. B.; Rani, K. R.; Reddy, K. R.; Gopal, D. V. R. S. (2010). First report of *Tobacco streak ilarvirus* infecting onion (*Allium cepa*). New Disease Reports, v.22, p.17.
- Spiegel, S.; Zeidan, M.; Sobolev, I.; Beckelman, Y.; Holdengreber, V.; Tam, Y.; Bar Joseph, M.; Lipsker, Z.; Gera, A. (2007). The complete nucleotide sequence of *Passiflora latent virus* and its phylogenetic relationship to other carlaviruses. Archives of Virology, v.152, p.181-9.
- Tavassoli, M.; Shahraeen, N.; Ghorbani, S. (2008). Detection and Some Properties of *Cowpea mild mottle virus* Isolated from Soybean in Iran. Pakistan Journal of Biological Sciences, v.11, p.2624-8.
- Tavassoli, M.; Shahraeen, N.; Ghorbani, S. (2009). Serological and RT-PCR detection of *cowpea mild mottle* carlavirus infecting soybean. Journal of General and Molecular Virology, v.1, p.007-011.
- Tzanetakakis, I. E.; Postman, J. D.; Martin, R. R. (2007). Identification, detection and transmission of a new vitivirus from Mentha. Archives of Virology, v.152, p.2027-33.
- Urcuqui-Inchima, S.; Haenni, A. L.; Bernardi, F. (2001). Potyvirus proteins: a wealth of functions. Virus Research, v.74, p.157-75.
- USDA. World Agricultural Supply and Demand Estimates. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/wap/circular/2012/Jan/productionfull01-12.pdf>. Acessado em 20 jan 2012.
- Van Der Heijden, M. W. e Bol, J. F. (2002). Composition of alphavirus-like replication complexes: involvement of virus and host encoded proteins. Archives of Virology, v.147, p.875-98.

- Wang, R.; Wang, G.; Zhao, Q.; Zhang, Y.; An, L.; Wang, Y. (2010). Expression, purification and characterization of the Lily symptomless virus coat protein from Lanzhou Isolate. Virology Journal, v.7, p.34.
- Welling, G. W.; Weijer, W. J.; van der Zee, R.; Welling-Wester, S. (1985). Prediction of sequential antigenic regions in proteins. FEBS Letters, v.188, p.215-8.
- Xu, H.; D'Aubin, J.; Nie, J. (2010). Genomic variability in *Potato virus M* and the development of RT-PCR and RFLP procedures for the detection of this virus in seed potatoes. Virology Journal, v.7, p. 25.
- Zanardo, L. G. Caracterização e análise da diversidade genética de carlavírus em soja. 2010. 48p. Monografia (Graduação em Bioquímica). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.
- Zavriev, S. K.; Kanyuka, K. V.; Levay, E. (1991). The genome organization of potato virus M RNA. Journal of General Virology, v.72, p.9-14.
- Zhou, Z. S.; Dell'Orco, M.; Saldarelli, P. ; Turturo, C.; Minafra A.; Martelli, G. P. (2006). Identification of an RNA-silencing suppressor in the genome of Grapevine virus A. Journal of General Virology, v.87, p.2387–2395.

Produção de antissoro policlonal a partir da proteína capsidial de *Cowpea mild mottle virus* e suas aplicações na detecção viral

Carvalho, S. L.; Silva, F. N.; Zanardo, L. G.; Zerbini, F. M. and Carvalho, C. M. 2012. Production of Polyclonal Antiserum against *Cowpea mild mottle virus* Coat Protein and its Application in Virus Detection. Tropical Plant Pathology (in preparation).

Production of Polyclonal Antiserum against *Cowpea mild mottle virus* Coat Protein and its Application in Virus Detection

Silvia L. Carvalho¹, Fábio N. Silva¹, Larissa G. Zanardo², Francisco M. Zerbini¹ and Claudine M. Carvalho^{1*}

¹ Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H. Rolfs, s/ nº Campus Universitário. 36570-000 Viçosa, MG, Brasil.

² Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H. Rolfs, s/ nº Campus Universitário. 36570-000 Viçosa, MG, Brasil.

*Corresponding author: Claudine M. Carvalho

Phone: (+55-31) 3899-1087; Fax: (+55-31) 3899-2240; Email: claudine.carvalho@ufv.br.

Abstract

Cowpea mild mottle virus (CpMMV), the causal agent of stem necrosis disease, has drawn attention of soybean producers in recent years due to yield losses in the main producing regions of Brazil. Serological methods for viral detection require the use of an antiserum of good quality to achieve specificity and sensitivity. The entire coat protein gene of a Brazilian CpMMV isolate was cloned into a bacterial expression vector and transformed into *Escherichia coli* BL21::DE3 for *in vitro* expression. The coat protein, fused to a 6 His-tag, was purified under denaturing conditions by affinity chromatography using a Ni-NTA resin. After renaturation, the integrity and identity of purified recombinant protein was confirmed by SDS-Page and MALDI-ToF/ToF mass spectrometer analyses. Two New Zealand rabbits were immunized with increasing amounts of the recombinant tagged protein. The specificity and sensitivity of the antisera were demonstrated by Western blot and indirect ELISA assays. The polyclonal antisera raised against recombinant coat protein proved to be a reliable tool for CpMMV detection.

Key words: *Cowpea mild mottle virus* (CpMMV); Recombinant coat protein; Polyclonal antiserum; Indirect ELISA; Western blot.

1. Introduction

Soybean (*Glycine max*) production in Brazil has increased in latest years and it stands out as the main export crop for export (CONAB, 2012). Brazil is the second largest soybean producer in the world; in the 2010/11 season, production was 75 million tons, representing 28.6% of world production (USDA, 2012). Diseases are one of the major factors limiting the maximization of productivity.

Stem necrosis disease has drawn the attention of soybean producers in recent years due to reduction in productivity in the main producing regions of Brazil (Almeida, 2008). The disease was first recorded in the Midwest region of Brazil in the 2000/01 soybean season and rapidly spread throughout the country in the following years (Almeida, 2005; Mituti, 2006). *Cowpea mild mottle virus* (CpMMV), the causal agent of stem necrosis disease, has also been reported in Asia, West Africa, and Argentina, some of the world's principal soybean producing regions (Laguna *et al.*, 2006; USDA, 2012).

CpMMV belongs to the genus *Carlavirus* of the family *Betaflexiviridae*, which includes viruses with flexuous particles of 610-700 nm in length and 12-15 nm in diameter (Iwaki *et al.*, 1982; Martelli *et al.*, 2007). However, CpMMV shows some characteristics that are not usually seen in others species of the genus, such as the occurrence of brush-like inclusions in infected plants and transmission in a non-persistent manner by whiteflies (*Bemisia tabaci*). Despite these differences, the genome organization and sizes of putative protein products are similar to those of well-characterized species of the genus *Carlavirus* (King *et al.*, 2011). The *Carlavirus* genome consists of a single-stranded positive sense RNA, 6.48-8.6 kb, including six ORFs (*Open Reading Frames*), a 5' cap and a 3' poly (A) tail (Almeida *et al.*, 2003; Poke, 2008; Dinesen *et al.*, 2009). ORF 1 is the largest, encoding the putative proteins: methyltransferase (Mt), papain-like protease (P-Pro), helicase (Hel) and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) (Menzel *et al.*, 2010).. The triple gene block encodes movement proteins and consists of three overlapping ORFs (ORFs 2, 3 and 4) (Morozov and Solovyev, 2003). ORF 5 encodes a coat protein and the product of ORF 6 possesses nucleic acid-binding activity (Menzel *et al.*, 2010).

CpMMV was first detected in cowpea (*Vigna unguiculata*) in Ghana [Brunt and Kenten (1973) cited by Menzel *et al.* (2010)] and since then its occurrence has been reported in several hosts in different geographic regions (Iwaki *et al.*, 1982; Naidu *et*

al., 1998; Laguna *et al.*, 2006; Tavassoli *et al.*, 2009; Menzel *et al.*, 2010). Symptoms vary with the host, viral isolate and time of year but are generally seen as local chlorotic lesions, mosaic, necrosis, necrotic lesions, chlorotic rings, dwarfing and leaf distortion (Almeida *et al.*, 2005; Zanardo, 2010). In soybean plants severe symptoms such as stem necrosis, necrosis of the petiole, curvature and necrosis of the shoot, and plant death have been reported, although infected but asymptomatic soybean cultivars have also been found (Mituti, 2006).

Generally, CpMMV detection is undertaken by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) methods (Almeida, 2005; Laguna *et al.*, 2006; Gaspar *et al.*, 2008; Tavassoli *et al.*, 2009; Menzel *et al.*, 2010). Molecular methods such as RT-PCR are more sensitive, but their application requires the use of expensive reagents and equipment to synthesize the complementary DNA, and they are relatively complex to execute, increasing costs when indexing large numbers of samples. ELISA is more suitable for routine use and a good qualitative antibody is important to achieve specificity and sensitivity. The purity and structural integrity of the antigen should always be considered to avoid nonspecific reactions, which may compromise the interpretation of results (Almeida, 2001). The use of purified virus preparation is usually a time-consuming procedure and presents problems with regard to purity and the obtention of satisfactory concentrations of the final preparation. Meanwhile, recombinant proteins expressed in prokaryotic systems (*Escherichia coli*) are frequently used in research, being stable, abundant and easily purified (Vaira, 1996; Hull, 2002; Webster *et al.*, 2005; Hartley, 2006; Alkowni *et al.*, 2011).

Almeida *et al.* (2003) developed a polyclonal antiserum from the purification of viral particles to detect CpMMV but this tool is no longer available and there is currently no alternative to serological detection of the virus in Brazil. Here, we cloned, expressed and purified a complete coat protein of CpMMV, report the physicochemical properties of the recombinant protein and the production of a polyclonal antiserum against CpMMV coat protein, and demonstrate its use for detecting the virus by Western blot and indirect ELISA.

2. Material and Methods

2.1. Virus sources

The CpMMV isolates used in this work belong to the collection of Laboratório de Virologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Brazil. They were collected from infected soybean plants in different states of Brazil (Table 1). All isolates were maintained on soybean plants cv CD206, in a greenhouse, under controlled conditions.

2.2. RT-PCR and cloning in expression vector

Specific primers were designed to amplify the coat protein (CP) coding region based on the sequence of CpMMV isolate CpMMV:BR:BA:09 (Bahia). The CP gene of isolate CpMMV:BR:BA:09 (Bahia) was amplified by RT-PCR using the forward primer 5'ACGTCTCGAGCTGGAGTCAGTGTTTG 3' (XhoI site underlined) and the reverse primer 5'ACGTGAAATTCTTACTTCTTAGCGTG 3' (EcoRI site underlined). Approximately 500 ng of total RNA, extracted from soybean plants cv CD206 infected with the isolate CpMMV:BR:BA:09 (Bahia), using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), was reverse transcribed with SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The target cDNA was amplified using Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) for 40 cycles, denatured at 94°C for 1 minute, annealed at 65°C for 1 minute, and extended at 72°C for 1 minute. The amplicon was purified, using Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE-Healthcare), digested with enzymes EcoRI and XhoI, and ligated into the pRSET-A expression vector (Invitrogen) previously digested with the same enzymes. *Escherichia coli* DH5α cells were transformed using the heat shock method (Sambrook and Russel, 2001). The clones were confirmed by PCR using the primers described above and a single clone was selected for expression studies. Sequence analysis was performed by Macrogen Inc. (Seul, South Korea).

2.3. Sequence analyses

Sequences of CpMMV and other related carlaviruses were aligned using ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) (Table 2 and Figure 1). Percent nucleotide and amino acid identities for ORF 5 (coat protein) were calculated in EMBOSS (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/index.html>), using the EMBOSS needle (Global) with default settings (Supplementary Figure 1). For the analysis of

physicochemical properties based on primary structure of CP (isolate CpMMV:BR:BA:09) the software ANTHEPROT was used (Deleage *et al.*, 1988).

2.4. Expression and purification of recombinant CpMMV Coat Protein

For expression of the CP, the recombinant plasmid pRSET-A/CP-CpMMV was transferred into the expression host *E. coli* strain BL21::DE3 by a heat shock procedure. A single colony was grown at 37 °C, 250 rpm in LB medium containing ampicillin 100 ng, until it reached an OD₆₀₀ of approximately 0.5, followed by the addition of IPTG into the medium to a final concentration of 1mM. Approximately 8 hours post-IPTG induction, the bacterial cells were harvested by centrifugation (5000 g/10 min) and stored at -80° C. The total protein extracts were obtained by resuspension in lysis buffer (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 2 mM, pH 8.0), lysozyme treatment (0.5 ml, 25mM) for 30 minutes at room temperature, and sonication (45 seconds, 2 cycles with 1 minute interval). The resulting pellet was resuspended in 1 ml of NaHCO₃ 100 mM, pH 9.0, with 0.3% SDS, and affinity purified using a Ni-NTA column (Qiagen) under denaturing conditions, according to the manufacturer's instructions. Fractions were analysed by SDS-polyacrilamide gel electrophoresis and visualized by Coomassie blue R250 staining (Bio-Rad) to verify expressed protein localization. The fractions containing the CP were collected into a dialysis membrane and dialyzed against increasing amounts of renaturation buffer (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 100mM, EDTA 1 mM, glycerol 10%, DTT 1 mM, PMSF 1 mM). After dialysis the protein integrity was analyzed by SDS-PAGE and quantification was performed by Bradford's method using Dc Protein Assay kit (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions.

2.5. Characterization of purified recombinant CP

For MALDI-ToF/ToF mass spectrometer analyses, the Coomassie blue-stained recombinant CP band (isolate CpMMV:BR:BA:09) was recovered from the gel pieces and destained overnight with a solution of acetonitrile 50% and ammonium bicarbonate (25mM, pH 8.8). The tryptic digestion was performed according to Shevchenko *et al.* (2006). An additional step to remove salts and contaminants was performed using Zip Tip C18 pipette tips (Millipore), according to the manufacturer's instructions. Peptide mass mapping was performed on an UltraFlex III MALDI-ToF/ToF mass spectrometer

(Burker Daltonics, USA). The peptide map was acquired in reflection positive-ion mode with delayed extraction at a mass range of 500-5000 Da. Peptide mass fingerprint (PMF) obtained was submitted to a search using the Mascot Search Engine against the NCBI database.

2.6. Immunization of rabbits

Two New Zealand white rabbits (named CP1 and CP2) of approximately 2 months old were used for immunization. Preimmune serum from each rabbit was collected and they were then immunized for the first time. For this, the purified 6xHis-CP protein was emulsified with an equal amount of Freund's incomplete adjuvant (Sigma-Aldrich) for the injections. A total of five intramuscular injections were given at weekly intervals with concentrations of 100, 200, 200, 400 and 400 µg for CP1 and 200, 400, 400, 800 and 800 µg for CP2. Rabbits were bled two weeks after the final injection and an additional bleeding was made two weeks later. The blood samples collected were incubated at 42°C for 1 hour and 4°C overnight to coagulate and then centrifuged at 5000 rpm for 10 minutes. The antisera were aliquoted and stored at -20°C. The sensitivity and specificity of the antisera obtained were analyzed by Western blot and indirect ELISA.

2.7. Evaluation of antisera

A preliminary assay to analyze the specificity of the antisera was done by Western blot using the purified CP and the purified begomovirus *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) AC5 protein as a negative control. Protein samples (1:10, 1:100 and 1:1000 v/v) were separated on 5 to 12% SDS-polyacrilamide gel and electroblotted onto a nylon transfer membrane (GE-Healthcare) at 30 mA for 8 hours. The membranes were blocked with 5% skimmed milk powder in PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂PO₄, 2mM KH₂PO₄, 0.02% NaN₃, pH 7.4) for 1 hour at room temperature, followed by incubation with the crude antiserum (1:1000 v/v) for 1.5 hours at room temperature with gentle shaking. After two washes with PBS-T (0,3% Tween 20) for 15 minutes, the membranes were incubated with goat anti-rabbit IgG-AP conjugate (1:2000 in PBS; Bio-Rad) also for 1.5 hours at room temperature with gentle shaking. After three washes with PBS-T for 10 minutes the reactions were revealed using AP conjugate substrate kit (Bio-Rad).

Western blot experiments were also performed on total protein extracted from infected soybean plants. Healthy plants were used as negative control. Two hundred and fifty mg of infected soybean leaves were ground to a fine powder in liquid nitrogen and homogenized in 1.5 ml of extraction buffer (Tris-HCl 0.15 M, pH 6.8, glycerol 10%, β -mercaptoethanol 5%, SDS 2%). The extracts were transferred to a microfuge tube, boiled for 3 minutes, and centrifuged for 5 minutes. The remaining steps were carried out as described above.

The polyclonal antisera were tested by indirect ELISA in order to determine their sensitivity and the optimal concentration to be used. Indirect ELISA was according to Clark et al. (1986) with antisera serially diluted from 1:250 to 1:10000 and tested against soybean leaves with symptoms from the isolate CPMMV:BR:MG:09:2. Samples were considered infected when absorbance at 405 nm gave an Infected/Healthy ratio (I/H) of at least 2 (Gillett *et al.*, 1986). To confirm the antiserum specificity an additional indirect ELISA was carried out including six CpMMV isolates (CPMMV:BR:BA:09, CpMMV:GO:09:1, CpMMV:BR:MT:09:1, CPMMV:BR:MG:09:2, CPMMV:BR:MG:09:3, CPMMV:BR:GO:10:5), *Potato virus S* (PVS) kindly supplied by Prof. Antônia dos Reis Figueira from Universidade Federal de Lavras, MG, and *Potato virus Y* (PVY) from our collection.

3. Results and Discussion

3.1. Cloning of the CP gene in pRSET-A

The CP gene was amplified by RT-PCR of total RNA extracted from infected plants, using the specific primers. The PCR product, a fragment of 867 bp encompassing the CP gene, was purified, digested and inserted into the expression vector pRSET-A to produce the recombinant plasmid pRSET-A/CP-CpMMV. Sequence analysis confirmed the integrity of the recombinant vector (data not shown). The resultant vector was transformed into *E. coli* strain BL21::DE3 cells.

3.2. Physicochemical properties of CpMMV coat protein from isolate

CpMMV:BR:BA:09

The antigenicity of CpMMV-CP was assessed using the software ANTHEROT (Deleage *et al.*, 1988), using the scales described by Parker *et al.* (1986) and Welling *et al.* (1985). The pattern of antigenicity in the two methods used presented some differences in the predicted antigenic sites (Figure 2). While in the method of Parker *et al.* (1986), stronger epitopes are concentrated at the N-terminus and the C-terminus; in the method of Welling *et al.* (1985), weak epitopes are distributed along the CP sequence. Parker's method takes into account the hydrophilic properties of the epitopes, since they need to be exposed on the surface of the protein to be recognized by antibodies (Parker *et al.*, 1986). Welling's method is based on the comparison of the amino acid sequence with known sequences of antigenic regions of homologous proteins (Welling *et al.*, 1985). According to Van Regenmortel and Daney de Marcillac (1988), methods based on a hydrophilicity scale, such as Parker's, and a segmental mobility scale give the highest level of correct predictions. Comparing the results of antigenicity analyses and the alignment of sequences, we can see that the antigenic regions of the CpMMV:BR:BA:09 isolate is conserved between CpMMV isolates, while low sequence identity with other carlaviruses can be seen, especially at the N-terminus, indicating probable antiserum specificity and the absence of a serological relationship between them.

The analyses derived by Parker's method showed epitopes in dense regions at peptides 7-29; 35-42; 48-60; 67-80; 95-108; 137-151; 153-158; 167-174; 193-198; 205-209; 233-248; 251-260; 266-274; 279-283 (Figures 1 and 2). A prediction of the secondary structure of CpMMV-CP performed using the software ANTHEROT, with the algorithm described by Deleage and Roux (1987), gave an estimation of 39% α -Helix, 5% β -Sheet, 4% β -Turn and 52% Coil structures.

3.3. Expression, purification and characterization of CpMMV-CP recombinant protein

After induction with IPTG, the recombinant protein migrated in SDS-PAGE resulting in a prominent band with a molecular weight of approximately 33 kDa (the expected size of CP plus 6-His fused to the N-terminal of the protein). The band corresponding to the fusion protein was absent in the sample transformed with an empty

vector (Figure 3A). The recombinant protein was successfully extracted in a denaturant manner and purified by Ni-NTA affinity column chromatography. After refolding by dialysis, the integrity of the protein was confirmed by SDS-PAGE (Figure 3B) and the Coomassie blue-stained 33 kDa band was recovered from the gel pieces to be used in spectrophotometric analysis. The yield of CpMMV-CP fusion protein was estimated at 1.49 mg/ml.

The MALDI-ToF/ToF mass spectrum was obtained of a tryptic digest of recombinant fusion CP protein (Supplementary Figure 2). The achieved peptide masses were screened against all entries contained in the NCBI nr database, with peptide mass tolerance of ± 0.5 Da. With 38% sequence coverage, the first two protein candidates were coat proteins of different CpMMV isolates (accession numbers [GU191840](#) and [DQ444266](#)), with scores of 103 and 102 respectively where only scores above 85 are considered significant.

3.4. Indirect ELISA.

In order to determine the antisera titer, crude AsCP were tested against plant sap from young infected soybean leaves by indirect ELISA. Healthy soybean leaves were used as a negative control. The result indicates that dilutions of 1:500, 1:1000, and 1:2000 were suitable (Table 3).

An additional indirect ELISA was carried out using the dilution of 1:1000 v/v. The result showed that the antiserum raised against recombinant CP is CpMMV-specific in its detection. Cross-reaction with samples infected with PVS and PVY was not observed (Figure 4). It would be interesting to perform an ELISA test also using an antiserum produced from purified particles for comparison. However, as mentioned above, such antisera are no longer available in Brazil, which reinforces the need to produce a new tool.

Preparation of antiserum in a conventional way, consists of serial injections in rabbits of viral particles purified from infected leaves following propagation in a greenhouse (Hull, 2002). The use of purified viral particles as antigens can result in the occurrence of cross-reactions with extracts of healthy plants. The presence of antibodies to elements of the plant in the antiserum is due to contamination with plant components during the purification process (Almeida, 2001; Wu *et al.*, 2011). Mixed infections and viral complexes are also factors that generate cross-reaction and a dubious antiserum

(Meng *et al.*, 2003; Alves-Junior *et al.*, 2008; Radaelli *et al.*, 2008). Another factor to consider is that some viral particles are very fragile or are at low concentration in the plant resulting in a final purified of low titer and quality (Helias *et al.*, 2003; Gulati-Sakhuja *et al.*, 2009; Alves-Junior *et al.*, 2008; Alkowni *et al.*, 2011).

To circumvent these problems, recombinant fusion proteins expressed in prokaryotic systems (*Escherichia coli*) are frequently used. The recombinant protein used in this study was stable, could easily be purified and was abundant. The production of specific antisera against recombinant fusion proteins has been successfully achieved for different pathosystems (Helias *et al.*, 2003; Carra *et al.*, 2005; Fajardo, 2007; Radaelli *et al.*, 2008; Gulati-Sakhuja *et al.*, 2009; Matic *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011). Another advantage of this system is that the clones with the gene of interest can be stored indefinitely at -80 ° C, without the need to maintain the virus in plants in the greenhouse.

3.5. Western blot analysis

The antisera obtained (AsCP) were able to detect the purified CP at 1:10, 1:100 and 1:100 (v/v) dilutions in the Western blot, but not with the unrelated bacterial expressed protein used as negative control (Figure 5A). The preimmune sera from each rabbit were unable to recognize the CP in any dilution (data not shown).

The next step was to evaluate whether the antisera are capable of recognizing the native CP from a total protein extract of infected plants. The total protein extract from soybean samples infected with CpMMV were used in Western blot test. The analyses showed that AsCP efficiently recognized CpMMV-CP from infected soybean plants and did not react with plant proteins (Figure 5B). After the renaturation process, tertiary structure conformation of the recombinant protein should be similar to that of a native one; as a consequence, it will keep most of its antigenic determinants (Wang *et al.*, 2010). Our study has shown that recombinant CpMMV-CP kept most the epitopes of the intact virus, since in Western blot analyses from total protein extracts of plants, the antiserum was able to detect the virus with a high degree of specificity (Figure 5B). Similar results were shown with *Little cherry virus 1* (LChV-1) (Matic *et al.*, 2009).

During the purification process, besides the overexpressed CpMMV-CP, some proteins constitutively expressed in *E. coli* strain BL21::DE3 are brought together. The Western blot assay against the purified CP shows the reaction of the antiserum with

some non-specific protein (Figure 5A) that might be bacterial proteins. Since *E. coli* does not possess protein antigens serologically related with the plant, no reaction was observed when tested against plant extracts in Western blot (Figure 5B), as expected. Similar results have been observed with antiserum prepared from recombinant proteins of other viruses (Park *et al.*, 2007; Gulati-Sakhuja *et al.*, 2009).

4. Conclusion

The results presented here show that antiserum raised against CP recognizes CpMMV specifically, in both Western blots and indirect ELISA systems, with a strong reaction against plant extract infected by CpMMV, and did not react with healthy plant extract or with other viral species.

5. References

- Alkowni, R.; Zhang, Y. P.; Rowhani, A.; Uyemoto, J. K.; Minafra, A. (2011). Biological, molecular, and serological studies of a novel strain of grapevine leafroll-associated virus 2. Virus Genes, v. 43, p. 102-10.
- Almeida, A. M. R. (2008). Virose da Soja no Brasil: Sintomas, Etiologia, Controle. Embrapa Série Documentos 306.
- Almeida, A. M. R. e Lima, J. A. A. (Eds) (2001). Princípios e Técnicas de Diagnóstico Aplicados em Fitopatologia. Londrinaed.
- Almeida, A. M. R.; Piuga, F. F.; Kitajima, E. W.; Gaspar, J. O.; Valentin, N.; Benato, L. C.; Marin, S. R. R.; Bineck, E.; Belintani, P.; Nunes-Junior, J.; Hoffmann, L.; Meyer, M. C. (2003). Necrose da Haste da Soja. Embrapa Série Documentos 221.
- Almeida, A. M. R.; Piuga, F. F.; Marin, S. R. R.; Kitajima, E. W.; Gaspar, J. O.; Oliveira, T. G.; Moraes, T.G. (2005). Detection and partial characterization of a carlavirus causing stem necrosis of soybean in Brazil. . Fitopatologia Brasileira v.30, p.191-4.
- Alves-Junior, M.; Marraccini, F. M.; Melo-Filho, A. P.; Dusi, A. N.; Pio-Ribeiro, G.; Ribeiro, B. M. (2008). Recombinant expression of *Garlic virus C* (GARV-C) capsid protein in insect cells and its potential for the production of specific antibodies. Microbiological Research, v. 163, p. 354-61.
- Bratney, C.; Badge, J. L.; Burns, R.; Foster, G. D.; George, E.; Goodfellow, H. A.; Mulholland, V.; McDonald, J. G.; Jeffries, C. J. (2002). Potato latent virus: a proposed new species in the genus Carlavirus. Plant Pathology. v.51, p.495-505.
- Carra, A.; Brocchi, E.; Simone, F. D; Luisoni, E. (2005). Improved serological diagnosis of *Poplar mosaic virus* with monoclonal antibodies. Journal of Virological Methods, v. 125, p. 173-9.
- Clark, M. F.; Lister, R. M.; Bar-Joseph, M.. (1986). ELISA techniques. Methods in Enzymology v. 118, p. 742-66.
- CONAB. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, quarto levantamento. Available at:em:http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_01_10_10_53_02_boletim_graos_4o_levantamento.pdf . Accessed January 20, 2012.
- Deleage, G.; Clerc, F. F.; Roux, B.; Gautheron, D. C. (1988). ANTHEPROT: a package for protein sequence analysis using a microcomputer. Comput Appl Biosci, v. 4, p. 351-6.
- Deleage, G. and Roux, B. (1987). An algorithm for protein secondary structure prediction based on class prediction. Protein Eng v. 1, p. 289-94.

- Dinesen, M.; Lundmark, M.; Albrechtsen, M. (2009). Complete genome sequences of two isolates of Kalanchoë latent virus. Archives of Virology, v.154, p.1173-1175. 2009.
- Fajardo, T. V. M. (2007). Expression of *Grapevine leafroll-associated virus 3* Coat Protein Gene in *Escherichia coli* and Production of Polyclonal Antibodies. Fitopatologia Brasileira v. 32, p. 496-500.
- Gaspar, J. O.; Belintani, P.; Almeida, A. M. R.; Kitajima, E. W. (2008). A degenerate primer allows amplification of part of the 3'-terminus of three distinct carlavirus species. Journal of Virological Methods v. 148, p. 283-5.
- Gillett, J. M.; Morrissey, S. M; Ramsdell, D. C. (1986). Interpreting ELISA Data and Establishing the Positive-Negative Threshold. Plant Disease v. 70, p. 722-6.
- Gulati-Sakhuja, A.; Sears, J. L.; Nunez, A.; Liu, H. Y. (2009). Production of polyclonal antibodies against Pelargonium zonate spot virus coat protein expressed in *Escherichia coli* and application for immunodiagnosis. Journal of Virological Methods v. 160, p. 29-37.
- Hartley, J. L. (2006). Cloning technologies for protein expression and purification. Current Opinion in Biotechnology v. 17, p. 359-66.
- Helias, V.; Jacquot, E.; Guillet, M.; Le Hingrat, Y.; Giblot-Ducray, D. (2003). Production of recombinant *Potato mop-top virus* coat protein in *Escherichia coli* and generation of antisera recognising native virus protein. Journal of Virological Methods v. 110, p. 91-7.
- Hull, R. Matthews' Plant Virology. Great Britain, Academic Press, 2002. 1001p.
- Iwaki, M.; Thongmeearkom, P.; Honda, Y.; Hibi, T. (1982). Whitefly transmission and some properties of *Cowpea mild mottle virus* of soybean in Thailand. Plant Disease, v.66, n.5, p.365-368.
- Jain, R. K.; Pandey, A. N.; Krishnareddy, M; Mandal, B. (2005). Immunodiagnosis of groundnut and watermelon bud necrosis viruses using polyclonal antiserum to recombinant nucleocapsid protein of *Groundnut bud necrosis virus*. Journal of Virological Methods v.130, p. 162-4.
- King, A. M. Q.; Adams, M. J.; Carstens, E. B.; Lefkowitz, E. J. (Eds). Virus Taxonomy: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, San Diego, CA: Elsevier Academic Press 2011. 1338 p.
- Laguna, I. G.; Arneodo, J. D.; Rodríguez-Pardina, P.; Fiorona, M. (2006). Cowpea mild mottle virus infecting soybean crops in northwestern Argentina. Fitopatologia Brasileira, v.31, p.317-317.
- Liu, Q.; Ku, Z.; Cai, Y.; Sun, B.; Leng, Q.; Huang, Z. (2011). Detection, characterization and quantification of Coxsackievirus A16 using polyclonal

antibodies against recombinant capsid subunit proteins. Journal of Virological Methods v. 173, p. 115-20.

- Martelli, G. P.; Adams, M. J.; Kreuze, J. F.; Dolja, V. V. (2007). Family Flexiviridae: a case study in virion and genome plasticity. Annual Review of Phytopathology, v.45, p.73-100.
- Matic, S.; Minafra, A.; Boscia, D.; da Cunha, A. T.; Martelli, G. P. (2009). Production of antibodies to *Little cherry virus 1* coat protein by DNA prime and protein boost immunization. Journal of Virological Methods v. 155, p. 72-6.
- Meng, B. e Li, C. (2010). The capsid protein of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus contains a typical nuclear localization signal and targets to the nucleus. Virus Research, v.153, p.212-217.
- Meng, B.; Credi, R.; Petrovic, N.; Tomazic, I.; Gonsalves, D. (2003). Antiserum to Recombinant Virus Coat Protein Detects *Rupestris stem pitting associated virus* in Grapevines. Plant Disease v. 87, p. 515-22.
- Menzel, W.; Winter, S.; Vetten, H. J. (2010). Complete nucleotide sequence of the type isolate of *Cowpea mild mottle virus* from Ghana. Archives of Virology, v.155, p.2069-2073.
- Mituti, T. e Almeida, A. M. R. Tolerância ao Cowpea mild mottle virus e sua concentração relativa em soja. In: II Jornada Técnica da Embrapa Soja. v.1, 2006, Londrina, resumo expandido, p.168-170.
- Morozov, S. Y. e Solovyev, A. G. (2003). Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. Journal of General Virology, v.84, p.1351-66.
- Naidu, R. A.; Gowda, S.; Satyanarayana, T.; Boyko, V.; Reddy, A. S.; Dawson, W. O. Reddy, D. V. R. (1998). Evidence that whitefly-transmitted *Cowpea mild mottle virus* belongs to the genus *Carlavirus*. Archives of Virology, v.143, p.769-780.
- Park, J. S.; Choi, B. K.; Vijayachandran, L. S.; Ayyappan, V.; Chong, C. K.; Lee, K. S.; Kim, S. C.; Choi, C. W. (2007). Immunodetection of Canine parvovirus (CPV) in clinical samples by polyclonal antisera against CPV-VP2 protein expressed in *Esherichia coli* as an antigen. Journal of Virological Methods v. 146, p. 281-7.
- Parker, J. M., Guo, D.; Hodges, R. S. (1986). New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. Biochemistry, v.25, p.5425-32.
- Poke, F. S. (2008). *Hop mosaic virus*: complete nucleotide sequence and relationship to other carlaviruses. Archives of Virology, v.153, p.1615-1619.
- Radaelli, P.; Fajardo, T. V. M.; Nickel, O.; Eiras, M.; Pio-Ribeiro, G. (2008). Production of polyclonal antisera using recombinant coat proteins of *Grapevine*

- leafroll-associated virus 2* and grapevine virus B. Pesq. agropec. bras. v. 43, p. 1405-11.
- Sambrook, J. and Russel, D., 2001. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (3^a ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Senshu, H.; Yamaji, Y.; Minato, N.; Shiraishi, T.; Maejima, K.; Hashimoto, M.; Miura, C.; Neriya, Y.; Namba, S. (2011). A dual strategy for the suppression of host antiviral silencing: two distinct suppressors for viral replication and viral movement encoded by potato virus M. Journal of Virology, v.85, p.10269-78.
- Shevchenko, A.; Tomas, H.; Havlis, J.; Olsen, J. V.; Mann, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. Nature protocols v. 1, p. 2856-60.
- Takaichi, M.; Nagakubo, T; Oeda, K. (2001). Mixed virus infections of garlic determined by a multivalent polyclonal antiserum and virus effects on disease symptoms. Plant Disease v. 85, p. 71-5.
- Tavassoli, M.; Shahraeen, N.; Ghorbani, S. (2009). Serological and RT-PCR detection of *cowpea mild mottle* carlavirus infecting soybean. Journal of General and Molecular Virology, v.1, p.007-011.
- USDA. World Agricultural Supply and Demand Estimates. Available at:<http://www.fas.usda.gov/wap/circular/2012/Jan/productionfull01-12.pdf>. Accessed January 20, 2012.
- Vaira, A. M. V.; Masenga, V.; Accotto, G. P. (1996). A polyclonal antiserum against a recombinant viral protein combines specificity with versatility. Journal of Virological Methods v. 56, p. 209-19.
- Van Regenmortel, M. H. and Marcillac, G. D. (1988). An assessment of prediction methods for locating continuous epitopes in proteins. Immunology Letters v. 17, p. 95-107.
- Wang, R.; Wang, G.; Zhao, Q.; Zhang, Y.; An, L.; Wang, Y. (2010). Expression, purification and characterization of the Lily symptomless virus coat protein from Lanzhou Isolate. Virology Journal, v.7, p.34.
- Webster, D. E.; Beck, D. L.; Rabenstein, F.; Forster, R. L; Guy, P. L. (2005). An improved polyclonal antiserum for detecting *Ryegrass mosaic rymovirus*. Archives of Virology v. 150, p. 1921-6.
- Welling, G. W.; Weijer, W. J.; van der Zee, R.; Welling-Wester, S. (1985). Prediction of sequential antigenic regions in proteins. FEBS Letters, v.188, p.215-8.
- Wu, J.; Meng, C.; Shang, H.; Rong, S.; Zhang, C.; Hong, J.; Zhou, X. (2011). Monoclonal antibody-based triple antibody sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay and immunocapture reverse transcription-polymerase

chain reaction for *Odontoglossum ringspot virus* detection. Journal of Virological Methods v. 171, p. 40-5.

Zanardo, L. G. Caracterização e análise da diversidade genética de carlavírus em soja. 2010. 48p. Monografia (Graduação em Bioquímica). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

Zavriev, S. K.; Kanyuka, K. V.; Levay, E. (1991). The genome organization of potato virus M RNA. Journal of General Virology, v.72, p.9-14.

6. Tables and Figures

Table 1. Origin of the viral isolates used in this study.

Code	Origin	Year	Isolate
CpMMV_Bahia	Barreiras, BA	2009	CpMMV:BR:BA:09
CpMMV_Goiatuba	Goiatuba, GO	2009	CpMMV:BR:GO:09:1
CpMMV_Sorriso	Sorriso, MT	2009	CpMMV:BR:MT:09:1
CpMMV_4562-1	Capinópolis, MG	2009	CpMMV:BR:MG:09:2
CpMMV_4562-7	Tupaciguara, MG	2009	CpMMV:BR:MG:09:3
CpMMV_101107	Cristalina, GO	2010	CpMMV:BR:GO:10:5
PVY	Lavras, MG	2004	PVY ^N -BR
PVS	Lavras, MG	2011	PVS

Table 2. Viral isolates used for sequence comparisons.

Code	Virus name	Isolate	Country	Acc. No
CpMMV_Bahia	<i>Cowpea mild mottle virus</i>	CpMMV:BR:BA:09	Brazil	Nd*
CpMMV_Goiatuba	<i>Cowpea mild mottle virus</i>	CpMMV:BR:GO:09:1	Brazil	Nd
CpMMV_Sorriso	<i>Cowpea mild mottle virus</i>	CpMMV:BR:MT:09:1	Brazil	Nd
CpMMV_101107	<i>Cowpea mild mottle virus</i>	CpMMV:BR:GO:10:5	Brazil	Nd
CpMMV_4562-1	<i>Cowpea mild mottle virus</i>	CpMMV:BR:MG:09:2	Brazil	Nd
CpMMV_4562-7	<i>Cowpea mild mottle virus</i>	CpMMV:BR:MG:09:3	Brazil	Nd
CpMMV_DQ444266-1	<i>Cowpea mild mottle virus</i>		Brazil	DQ444266
CpMMV_NC014730-1	<i>Cowpea mild mottle virus</i>		Ghana	NC014730
PLV_DQ455582-1	<i>Passiflora latent virus</i>		Israel	DQ455582
LSV_AJ516059-1	<i>Lily symptomless virus</i>		South Korea	AJ516059-1
PVS_FJ813513-1	<i>Potato virus S</i>		USA	FJ813513-1
CVB_S60150-1	<i>Chrysanthemum virus B</i>		Russia	S60150
BLSCV_L25658-1	<i>Blueberry scorch virus</i>		USA	L25658-1
PHVS_EF492068-1	<i>Phlox virus S</i>		USA	EF492068

* sequence not deposited in GenBank

Table 3. Titration of CpMMV-CP polyclonal antiserum by indirect ELISA. Healthy and CpMMV-infected (isolate CpMMV:BR:MG:09:2) soybean leaves were tested. Goat-anti rabbit AP-conjugate was used as secondary antibody (1:2000 v/v).

Sample	Antiserum dilution					
	1:250	1:500	1:1000	1:2000	1:5000	1:10000
Soybean cv. CD206						
Infected	0.734	0.599	0.507	0.438	0.329	0.306
Healthy	0.313	0.235	0.208	0.213	0.213	0.210
I/H*	2.34	2.55	2.44	2.06	1.54	1.46

* I/H ratio represents the absorbance value of sample infected OD₄₀₅/ control OD₄₀₅. A reaction was considered positive when I/H ratio were above 2.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120
CPMMV_45621  -MESVFDLNKLLD-----SEMA DKTKTGVP-----KAADGTALPDIDAE-----LQKRLDDLRAFLRKTQSASEITNPGFELGRPALKESTFNNSDK
CPMMV_45627  -MESVFDLNKLLD-----SEMA DKTKTGVP-----KAADGTALPDIDAE-----LQKRLDDLRAFLRKTQSASEITNPGFELGRPALKESTFNNSDK
CPMMV_101107 -MESVFDLNKLLD-----SEMA DKTKTGVP-----KAADGTALPDIDAE-----LQKRLDDLRAFLRKTQSASEITNPGFELGRPALKESTFNNSDK
CPMMV_BAHIA  -MESVFDLNKLLD-----SEMA DKTKTGVP-----KAADGTALPDIDAE-----LQKRLDDLRAFLRKTQSASEITNPGFELGRPALKESTFNNSDK
CPMMV_SORRISO -MESVFDLNKLLD-----SEMA DKTKTGVP-----KAADGTALPDIDAE-----LQKRLDDLRAFLRKTQSASEITNPGFELGRPALKESTFNNSDK
CPMMV_DQ444266.1 -MESVFDLNKLLD-----SEMA DKTKTGVP-----KAADGTALPDIDAE-----LQKRLDDLRAFLRKTQSASEITNPGFELGRPALKESTFNNSDK
CPMMV_GOIATUBA -MESVFDLNKLLD-----SEMA DKTKTGVP-----KAADGTALPDIDAE-----LQKRLDDLRAFLRKTQSASEITNPGFELGRPALKESTFNNSDK
CPMMV_NC014730.1 -MESVFDLNKLLD-----SEMA DKTKTGVP-----KAADGTALPDIDAE-----LQKRLDDLRAFLRKTQSASEITNPGFELGRPALKESTFNNSDK
BLSCV_L25658.1 -MPPKEAPQSSSEGNIVAKEAGEVPPRVAPAAPHVPPQAPPLQ-----PIIQPAGAVAA--NLVPE-----OLEQRLMNLIEVLKIPORHNSSLKNVAFELGRPALEPVPTMRRN
PLV_DQ455582.1 -MPPKEAPEV-----VPPVPPPEL-----PMKEKEASSSS--EPNDE-----LRQRLLKLEIELQAQNHNSNKNVSEFELGRPSLERPAMRRD
LSV_AJ516059.1 -MQSRPAQESGS-----ASETPARGRPTP-----SDAPRDEPTNY--NNAES-----LLEQRLTRLIEKLNAEKHNSNDRNVAFELGRPSLEPTSAMRRN
PVS_FJ813513.1 -MPPKDPPTSSGE-----TPQTVPLAPPR-----NVEEHRVGLNQGHCNEA-----LLEQRLIRLIELMASKRHNSTLSNISEFELGRPSLEPTPEMRRN
CVB_S60150.1 -MPPKPAQDNEGNASG-----STPTPPPPPARTAAEARLRLAEMEREREQELLEEMNSNTPAEDARNISRLTQIAALLRREQINVHVITNMALELGRPALQPPPNMRGD
PHVS_EF492068.1 MAPPKDPD-TLENSVTG-----EQKQPIQLPFR-----PTVDVDAVAEEVLLGVD-----RDLOELVKLEELMRKKQRGVVVITNAGFETGRPELKPSEAMRVD

```

```

      130     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240
CPMMV_45621  HTHIYGKWSIDQLSRIVPKKISNNMATAEEMAKVQITLEGLGVPTHEHVAEVLQVAIYCKDVSSSFMDSSTGTFDWKGGSIILSDSVIAALRKDDNTLRRVCRLYAPITWNFMLTHKAPPS
CPMMV_45627  HTHIYGKWSIDQLSRIVPKKISNNMATAEEMAKVQITLEGLGVPTHEHVAEVLQVAIYCKDVSSSFMDSSTGTFDWKGGSIILSDSVIAALRKDDNTLRRVCRLYAPITWNFMLTHKAPPS
CPMMV_101107 HTHIYGKWSIDQLSRIVPKKISNNMATAEEMAKVQITLEGLGVPTHEHVAEVLQVAIYCKDVSSSFMDSSTGTFDWKGGSIILSDSVIAALRKDDNTLRRVCRLYAPITWNFMLTHKAPPS
CPMMV_BAHIA  HTHIYGKWSIDQLSRIVPKKISNNMATAEEMAKVQITLEGLGVPTHEHVAEVLQVAIYCKDVSSSFMDSSTGTFDWKGGSIILSDSVIAALRKDDNTLRRVCRLYAPITWNFMLTHKAPPS
CPMMV_SORRISO HTHIYGKWSIDQLSRIVPKKISNNMATAEEMAKVQITLEGLGVPTHEHVAEVLQVAIYCKDVSSSFMDSSTGTFDWKGGSIILSDSVIAALRKDDNTLRRVCRLYAPITWNFMLTHKAPPS
CPMMV_DQ444266.1 HTHIYGKWSIDQLSRIVPKKISNNMATAEEMAKVQITLEGLGVPTHEHVAEVLQVAIYCKDVSSSFMDSSTGTFDWKGGSIILSDSVIAALRKDDNTLRRVCRLYAPITWNFMLTHKAPPS
CPMMV_GOIATUBA HTHIYGKWSIDQLSRIVPKKISNNMATAEEMAKVQITLEGLGVPTHEHVAEVLQVAIYCKDVSSSFMDSSTGTFDWKGGSIILSDSVIAALRKDDNTLRRVCRLYAPITWNFMLTHKAPPS
CPMMV_NC014730.1 HTHIYGKWSIDQLSRIVPKKISNNMATAEEMAKVQITLEGLGVPTHEHVAEVLQVAIYCKDVSSSFMDSSTGTFDWKGGSIILSDSVIAALRKDDNTLRRVCRLYAPITWNFMLTHKAPPS
BLSCV_L25658.1 PANPYGRFSIDELFKMRYVQVVSNNMATTEQMAKISSAIFAGLVPTQVADVILKVMVVCASVSSVYLDPDGSETEFDGGAVPVDSIAAIMKKEAG-LRQVCRLYAPVWVNVMLVNRQPPS
PLV_DQ455582.1 PGNPYGRFSIDELFKMRYVQVVSNNMATTEQMANIMADHAGLVPTHEHVTSCILKVMVVCASVSSAYLDPDGSVEFEGGAVPVDSIAAIMKKEAG-LRQVCRLYAPVWVNSMLVNRQPPS
LSV_AJ516059.1 PANPYGRFSIDELFKMRYVQVVSNNMATTEQMAKISSAIFAGLVPTHEHVASVILQVMVVCACVSSAFDPEGSIEFENGAVPVDSIAAIMKKEAG-LRQVCRLYAPVWVNSMLVNRQPPA
PVS_FJ813513.1 PENPYSRFSIDELFKMRYVQVVSNNMATTEQMAKISSAIFAGLVPTHEHVASVILKVMVVCASVSSVYLDPAGTVEFPTGAVPLDSIAAIMKKEAG-LRQVCRLYAPVWVNYMLVNRQPPS
CVB_S60150.1 PTNMYSQVSSDFLWKIKPQRESNNMATSBDMVKIQVALEGLGVPTESVKEVITRLVLCANTSSSVYQDPKGVLEWDDGGAITADDVVGVTIKHST-LRQVCRLYAPVWVNYMHLQQTTPS
PHVS_EF492068.1 PTNIYSRPSSTDFLWVVKPQFVSNNMATAEDMVKIKARLEGLGVPTESVTSVLLQLAIECAHTSSSYQNPQSGVITWDDGAIMKDDVILGVVQEIAG-LRQVCRLYAPVWVNYMHIHKTPPA

```

```

      250     260     270     280     290     300     310     320     330
CPMMV_45621  DWAAMGFKYSDRFAAFDCFEYVENPAAIQPAEGLIRKPTPSEKIAHNTYKRLALDRSNRNELYANLNTTEVTGGTLGPEISRNFNHAKK---
CPMMV_45627  DWAAMGFKYSDRFAAFDCFEYVENPAAIQPAEGLIRKPTPSEKIAHNTYKRLALDRSNRNELYANLNTTEVTGGTLGPEISRNFNHAKK---
CPMMV_101107 DWAAMGFKYSDRFAAFDCFEYVENPAAIQPAEGLIRKPTPSEKIAHNTYKRLALDRSNRNELYANLNTTEVTGGTLGPEISRNFNHAKK---
CPMMV_BAHIA  DWAAMGFKYSDRFAAFDCFEYVENPAAIQPAEGLIRKPTPSEKIAHNTYKRLALDRSNRNELYANLNTTEVTGGTLGPEISRNFNHAKK---
CPMMV_SORRISO DWAAMGFKYSDRFAAFDCFEYVENPAAIQPAEGLIRKPTPSEKIAHNTYKRLALDRSNRNELYANLNTTEVTGGTLGPEISRNFNHAKK---
CPMMV_DQ444266.1 DWAAMGFKYSDRFAAFDCFEYVENPAAIQPAEGLIRKPTPSEKIAHNTYKRLALDRSNRNELYANLNTTEVTGGTLGPEISRNFNHAKK---
CPMMV_GOIATUBA DWAAMGFKYSDRFAAFDCFEYVENPAAIQPAEGLIRKPTPSEKIAHNTYKRLALDRSNRNELYANLNTTEVTGGTLGPEISRNFNHAKK---
CPMMV_NC014730.1 DWAAMGFKYSDRFAAFDCFEYVENPAAIQPAEGLIRKPTPSEKIAHNTYKRLALDRSNRNELYANLNTTEVTGGTLGPEISRNFNHAKK---
BLSCV_L25658.1 DWQAMGYPKARFAAFDFDYVTNGAAIQVEGLIRGPTPAECIAHNAKRRHALDRSNRNEKYGNLETEYTGGLQGAETVRNHRNAGNSA
PLV_DQ455582.1 DWQAMGFYNNARFAAFDFDYVTNTAAIQVEGHIRRPTAEVIAHNAKRRHALDRSNRNEKFGNLETEYTGGLQGAETVRNHRNANNGS
LSV_AJ516059.1 DWQAMRFQYNTFRFAAFDFDYVTNQAAIQVEGHIRRPTSAEVIAHNAKQLALDRSNRNERLGSQETEYTGGVQGAETVRNHRNANNGS
PVS_FJ813513.1 DWQAMGFQYNTFRFAAFDFDYVTNGAAIQVEGLIRGPTPEETIAHNAKSMALDKSNRNERLANTNVEYTGGMGLGAETVRNHRNAINQ
CVB_S60150.1 DWSAMGFHFNKYAAAFDFDYVENGAAIRPSSGIVPKPTRAEYVAYNTYKMLALNKNANNDFGNDSEATGGRQGPATHNLNANNKNTL
PHVS_EF492068.1 DWSAMGFANTRYAAAFDFDYVENGAAIRPSSGIVPKPTRAEYVAYNTYKRTALDKSNNATFANLNTTEVTGGTLGPEIERNFNNANNKRO

```

Figure 1. Alignment of amino acid sequences of coat protein of CpMMV isolates and other related carlaviruses. Antigenicity regions of CpMMV_Bahia are boxed. Gray shading indicates that the amino acid sequences were identical to the isolate CpMMV:BR:BA:09 (CpMMV_Bahia), whereas black shading indicates that the amino acid sequences belong to the same group of CpMMV:BR:BA:09 amino acids.

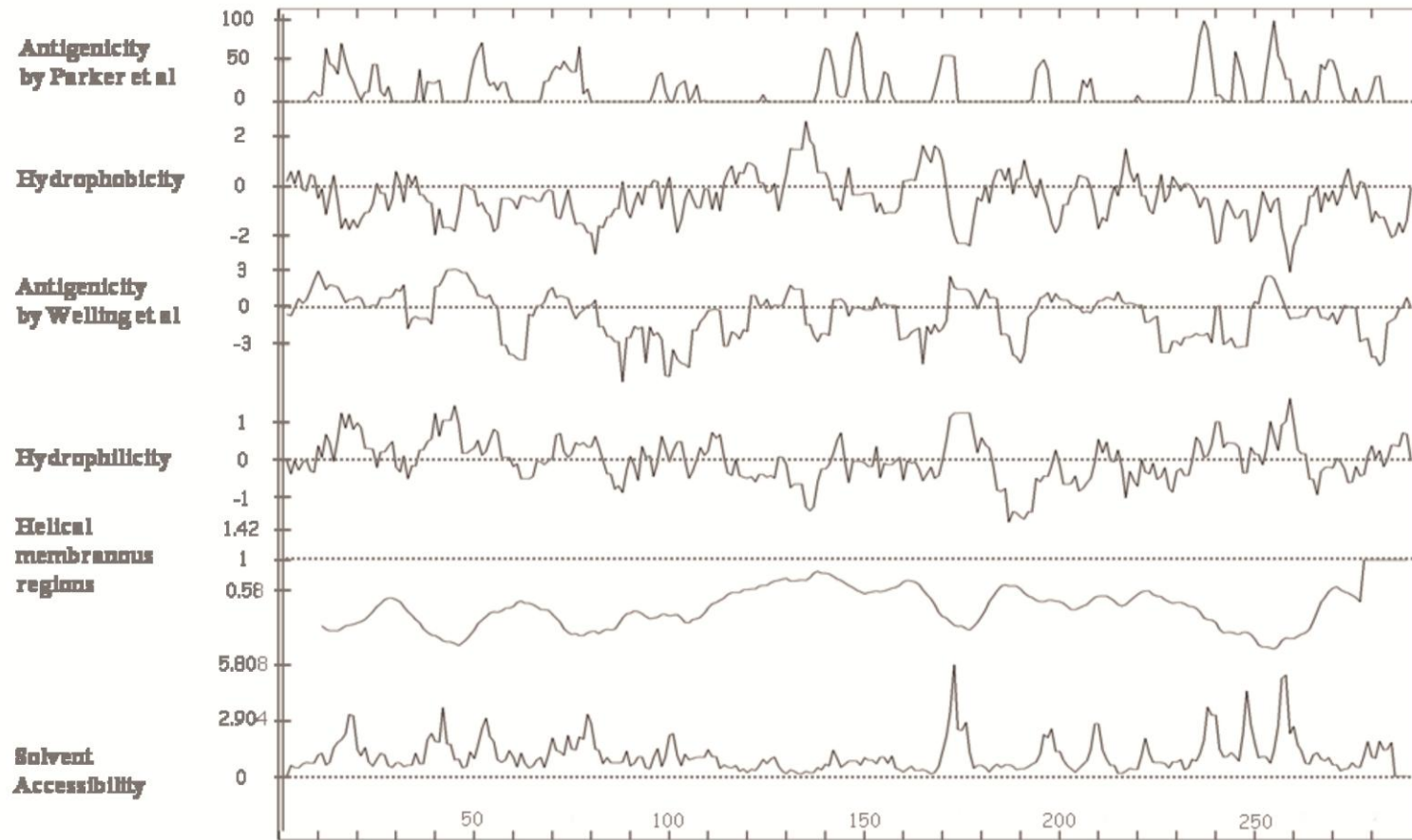


Figure 2. Antigenicity analysis of His-tagged CpMMV CP, isolate CpMMV:BR:BA:09. The amino acid sequence was analyzed using the software ANTHEROT, calculated by the methods of Parker *et. al.* (1986) and Welling *et. al.* (1985).

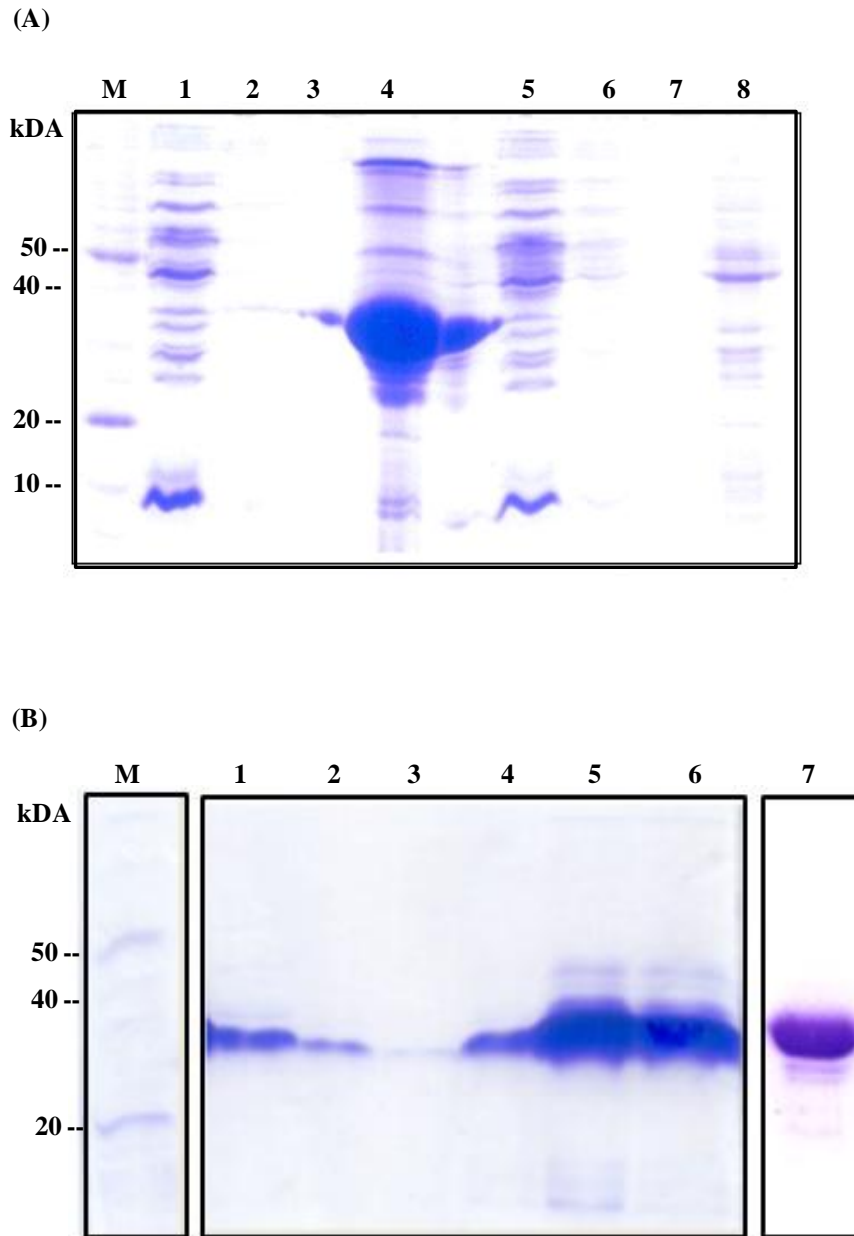


Figure 3. (A) Electrophoretic analyses of expressed His-tagged CpMMV-CP in *E. coli* BL21:DE3. The protein was analyzed by SDS-PAGE 5 to 12% and the gel was stained with Coomassie blue. M corresponds to the protein ladder (Benchmark, Invitrogen). Lines 1-3 are soluble cell protein fractions. Line 4, insoluble protein fraction. Lines 5-7, insoluble cell protein fraction of *E. coli* BL21:DE3 transformed with an empty vector (pRSETA), used as negative control. Line 8, soluble cell portion fractions of *E. coli* BL21:DE3 transformed with an empty vector. (B) Coomassie blue stained gel, Lines 1-6 are the fractions after the purification process. Line 7 corresponds to the purified recombinant CpMMV-CP after dialyses.

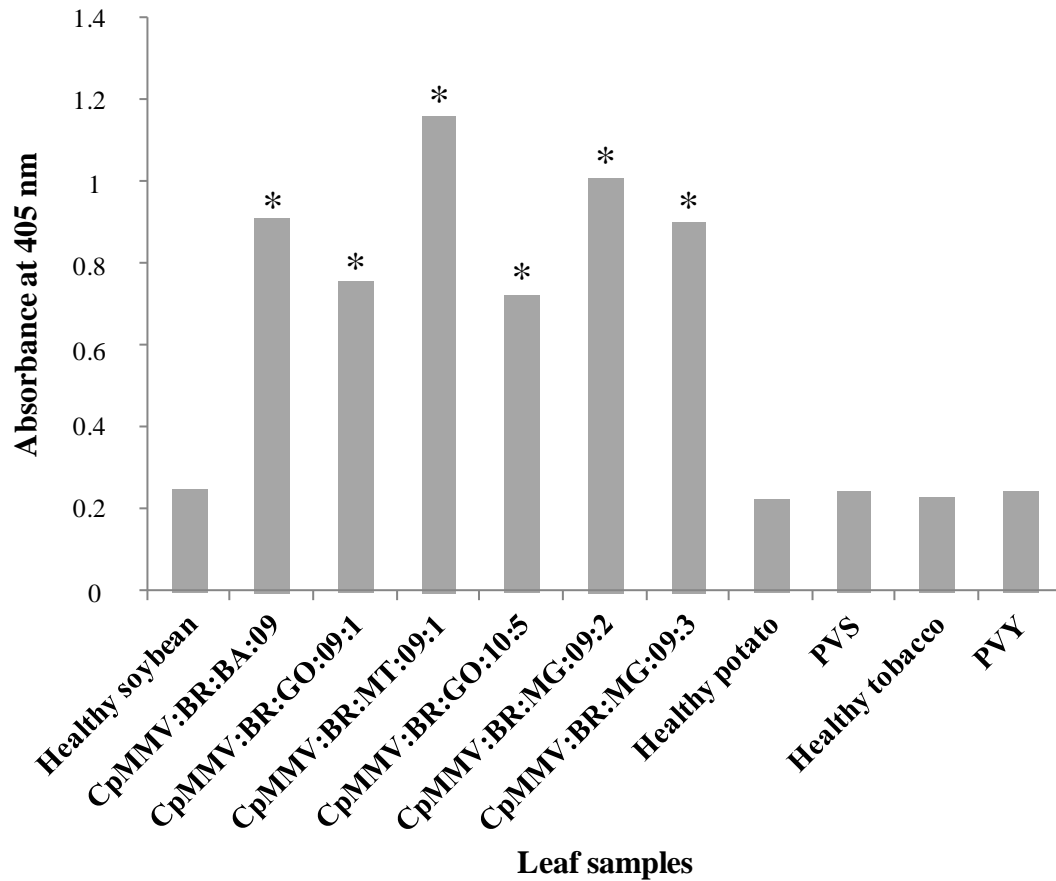


Figure 4. Analysis of CpMMV-CP polyclonal antiserum (AsCP) specificity by indirect ELISA. AsCP was used at 1: 1000 v/v dilution and Goat-anti rabbit AP-conjugate was used as secondary antibody at 1:2000 v/v. Detection of six different CpMMV isolates, healthy soybean leaf sap was used as a negative control. AsCP was also tested against the carlavirus PVS in potato plants and the potyvirus PVY in tobacco. Samples were considered infected when absorbance at 405 nm gave an Infected/Healthy ratio (I/H) of at least 2. * Samples considered positives.

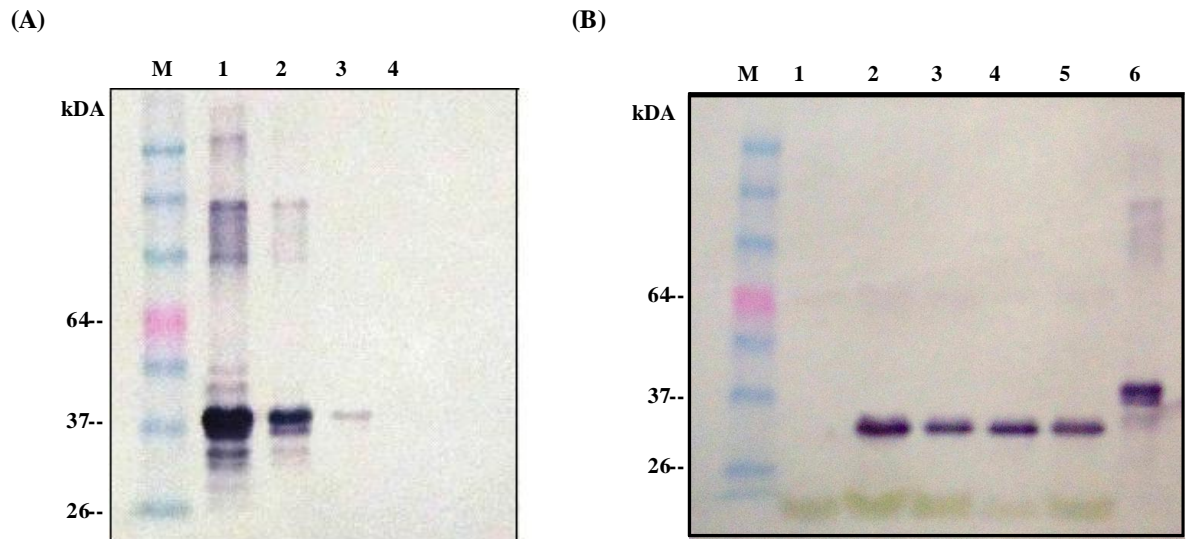
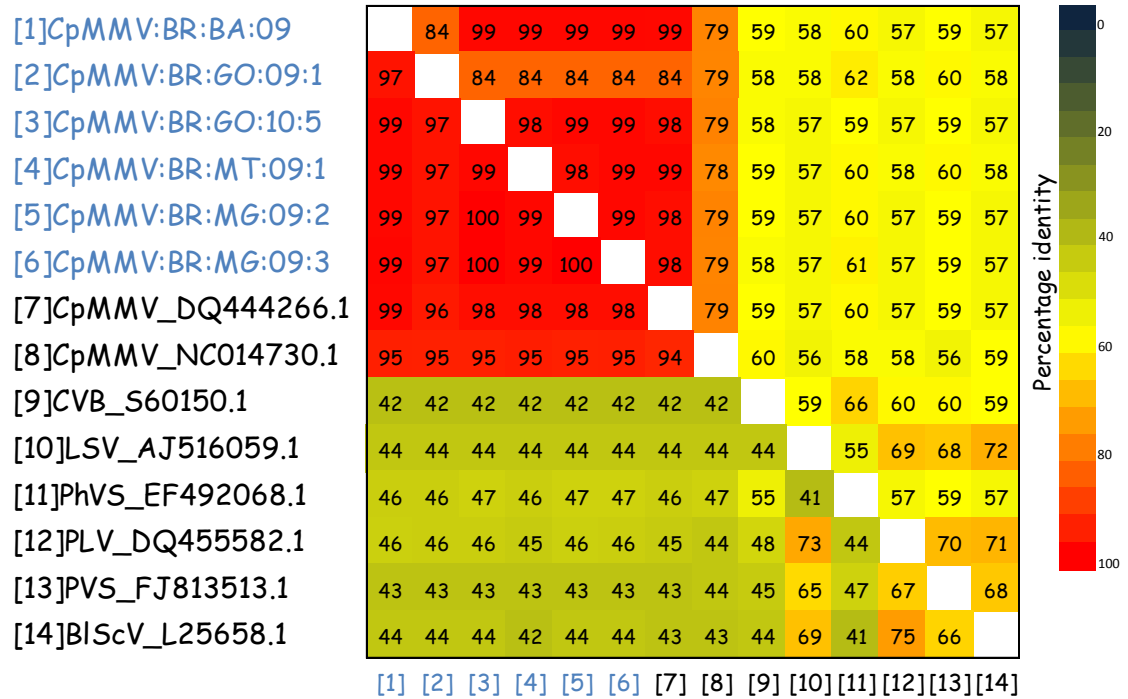
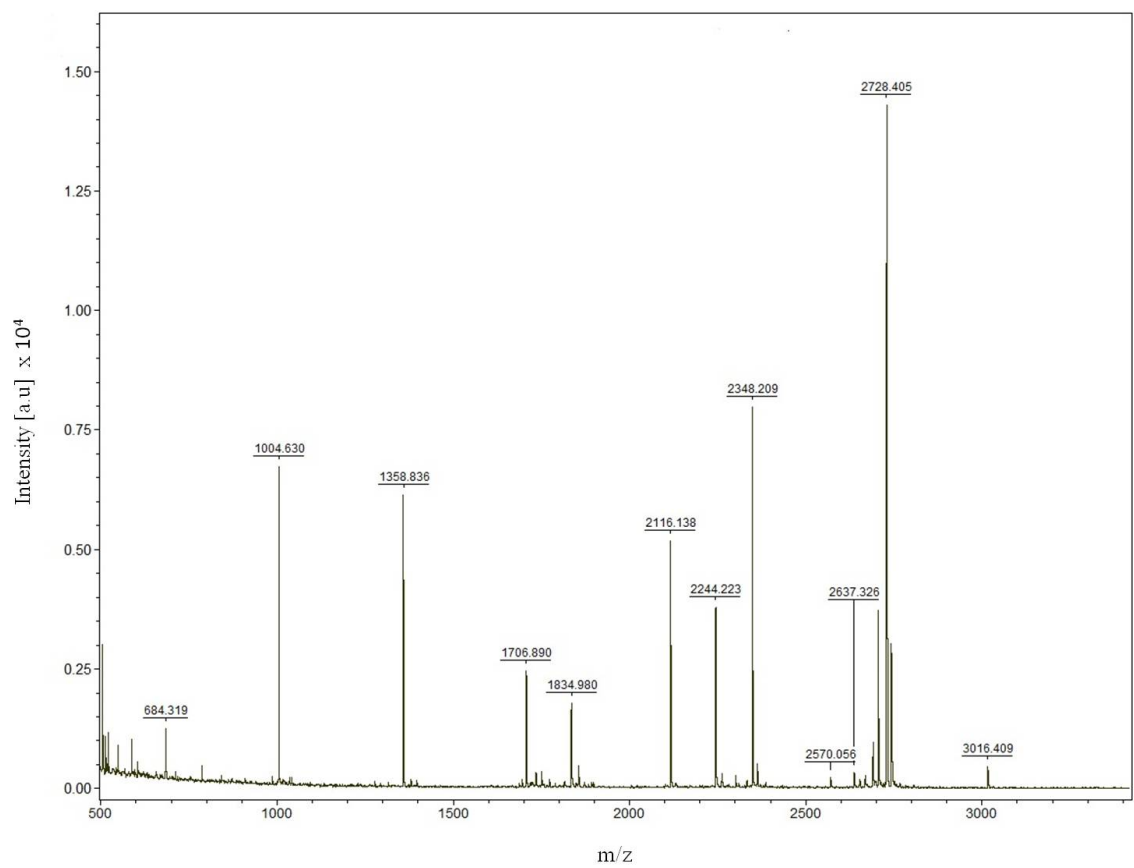


Figure 5. Western blot analyses. **(A)** Western blot of purified recombinant CpMMV-CP against AsCP at 1:1000 dilution. M, the protein ladder (Prestained Benchmark, Invitrogen). 1-3, purified recombinant CpMMV-CP at 1:10, 1:100 and 1:1000 v/v dilutions, respectively. 4, ToRMV AC5 protein at 1: 100 v/v. **(B)** Western blot of total protein extracted from CpMMV-infected or healthy soybean plants, using AsCP at 1:1000 dilution. 1, healthy soybean plant. 2-5, infected plants (isolates CpMMV:BR:GO:09:1; CpMMV:BR:MT:09:1; CpMMV:BR:MG:09:2; CpMMV:BR:MG:09:3). 6, purified recombinant CpMMV-CP, used as positive control.



Supplementary Figure 1. Two-dimensional plot representing the coat protein percentage sequence identities between the CpMMV brazilian isolates and the most related carlaviruses from the GenBank database. Percent nucleotide sequence identities (above the diagonal) and amino acid identities (below the diagonal).



Supplementary Figure 2. MALDI-ToF/ToF mass spectrum. PMF of the tryptic digested CpMMV recombinant coat protein.