

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UM FRAGMENTO E DETECÇÃO POR RT-
PCR DE RICE STRIPE NECROSIS VIRUS

Marcos Vinícios de Souza
Engenheiro Agrônomo/UFRGS

Dissertação apresentada como um dos
requisitos à obtenção do Grau de
Mestre em Fitotecnia
Área de Concentração Fitossanidade

Porto Alegre (RS), Brasil
Março de 2006

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

A Deus e aos meus guias e protetores;

Aos meus pais, Zulmar e Zilma;

Aos meus irmãos, Tiaguinho e Lander;

A minha amada, Fernanda e ao Jorginho;

A minha cunhada, Ana Clara;

Ao meu cunhado Felipe;

Aos amigos do LFM, Adriana, Mônica, Sandra, Ricardo, Jéferson, Johannes, Vanina e, especialmente, Alex Corrêa, Caren Lamb, Grasiela Agnes e Leandro Hillebrand;

Aos amigos da Faculdade de Agronomia, especialmente, Caio Efrom, Raquel Barro, Claiton Zanini;

Ao professor e orientador Marcelo Gravina de Moraes, pelos seus ensinamentos científicos e éticos;

Aos Professores do departamento de Fitossanidade, em especial aos professores Valmir Duarte e Rogério Pires;

Aos funcionários do Departamento de Fitossanidade, principalmente ao Miguel;

A Marcus K. Almança, pela ajuda nas primeiras coletas de plantas de arroz com enrolamento e pelos materiais cedidos;

Ao Engenheiro Agr. Zé Mário, da CANMPAL de Dona Francisca, pela ajuda nas coletas de plantas de arroz com enrolamento;

À Mariluci Disconzi, pelas informações e contatos sobre o enrolamento do arroz;

Ao IRGA, pela ajuda nas coletas de plantas de arroz com enrolamento para detecção, em especial aos NATE's de Alegrete, São Borja e Santo Antônio das Missões;

À CAPES, pelo apoio financeiro através da bolsa de estudos;

Ao LFM, pela ajuda financeira;

Ao Departamento de Fitossanidade, pela infra-estrutura.

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UM FRAGMENTO E DETECÇÃO POR RT-PCR DE RICE STRIPE NECROSIS VIRUS¹

Autor: Marcos Vinícios de Souza
Orientador: Marcelo Gravina de Moraes

RESUMO

O enrolamento do arroz é uma doença viral emergente no Brasil causada pelo Rice stripe necrosis virus (RSNV) que é transmitido pelo protozoário *Polymyxa graminis*. RSNV é um membro do gênero *Benyvirus* com genoma dividido em 4 RNAs de fita simples no sentido positivo (ssRNA +). Em função da falta de conhecimento sobre a seqüência de nucleotídeos do seu genoma, a detecção de RSNV através de métodos moleculares não é utilizada. O objetivo deste trabalho foi identificar seqüências do genoma de RSNV que possibilitassem sua detecção em plantas de arroz através da técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). As seqüências do genoma foram identificadas a partir de clones de uma biblioteca de cDNAs obtidos de uma amostra do vírus parcialmente purificado. Os clones que hibridizaram com sondas sintetizadas a partir de RNA de plantas infectadas com RSNV foram seqüenciados e comparados às seqüências do GenBank. Um fragmento de 957 nt da extremidade 3' da fita de um dos 4 RNAs genômicos de RSNV foi obtido. A análise da seqüência nucleotídeos desse fragmento não revelou qualquer similaridade com seqüências conhecidas, tampouco indicou uma possível função. Um par de oligonucleotídeos iniciadores foi desenhado a partir de um clone que potencialmente contém uma seqüência de RSNV. A especificidade e a sensibilidade da RT-PCR utilizando esse par de oligonucleotídeos iniciadores, bem como sua eficiência na detecção do vírus em diferentes partes da planta de arroz, foram avaliadas. Os resultados indicam que a RT-PCR é específica para RSNV e pode detectar o vírus em tecido oriundo das raízes, do colo e de folhas com distorção. Comparada ao diagnóstico da doença através da observação de sintomas e de estruturas do vetor, a RT-PCR é uma ferramenta confiável para a diagnose do enrolamento do arroz.

¹ Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (77p.) Março, 2006.

PARTIAL CHARACTERIZATION OF A FRAGMENT AND DETECTION BY RT-PCR OF RICE STRIPE NECROSIS VIRUS¹

Author: Marcos Vinicios de Souza
Adviser: Marcelo Gravina de Moraes

ABSTRACT

Rice stripe necrosis is an emergent viral disease in Brazil, caused by Rice stripe necrosis virus (RSNV) that is transmitted by the protozoan *Polymyxa graminis*. RSNV is a member of the genus *Benyvirus* and its genome is divided in 4 single stranded RNAs in a positive sense (ssRNA +). Detection of RSNV by molecular techniques is not used to being used due to the lack of knowledge about its genome sequence. The goal of this work was to identify sequences of RSNV genome that allow the detection of RSNV in rice plants by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Sequences of RSNV genome were isolated from clones of a cDNA library prepared from a partially purified virus sample. Clones that hybridized with probes synthesized from RNA of RSNV infected plants were sequenced and compared to GenBank sequences. A fragment of 957 nt from the 3' end of one of the 4 RSNV RNAs was obtained. The analysis of this sequence has not shown either similarity or function with known sequences. A pair of primers was designed based on a clone containing a putative RSNV sequence. Specificity and sensitivity of the RT-PCR with those primers and its efficiency to detect RSNV in different rice plant parts were evaluated. The results show that the RT-PCR specifically detects RSNV in root, base and distorted leaf tissues. RT-PCR is a reliable tool in order to diagnose rice stripe necrosis compared to leaf symptoms and vector structures observation.

¹ Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (77p.) March 2006.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Cultura do arroz.....	3
2.2. Principais doenças	3
2.3. Doenças virais	4
2.4. Enrolamento do Arroz (RSNV)	6
2.4.1. Etiologia	6
2.4.2. Sintomatologia	9
2.4.3. Ciclo da doença e epidemiologia	9
2.4.4. Controle	13
2.4.4.1. Controle genético	14
2.4.4.2. Controle biológico.....	14
2.4.4.3. Controle químico	15
2.5. Métodos de detecção de vírus.....	15
2.5.1. Métodos biológicos	16
2.5.2. Métodos físicos	17
2.5.3. Métodos sorológicos	17
2.5.4. Métodos moleculares	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. Isolamento parcial do genoma de RSNV.....	23
3.1.1. Material vegetal.....	23
3.1.2. Purificação parcial de RSNV	24
3.1.3. Extração de RNA total.....	25
3.1.4. Construção de uma biblioteca de cDNAs.....	26
3.1.5. Clonagem.....	27
3.1.8. Macroarranjo de cDNAs.....	31
3.1.9. Seqüenciamento	33
3.1.10. Amplificações de DNA e RNA.....	35
3.2. Detecção de RSNV através de RT-PCR	38
3.2.1. Material vegetal.....	38
3.2.2. Extração de RNA	40
3.2.3. RT-PCR	40
3.2.4. Análise estatística da detecção através da RT-PCR.....	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43

4.1. Isolamento parcial do genoma de RSNV	43
4.2. Detecção de RSNV através de RT-PCR	50
4.2.1. Teste da especificidade da detecção	50
4.2.2. Teste da otimização da amostragem	51
4.2.3. Teste da sensibilidade da detecção	53
4.2.4. Avaliação da detecção de RSNV através da RT-PCR	54
5. CONCLUSÕES	61
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
7. APÊNDICES	71

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Lista de vírus e satélite de vírus que infectam arroz, segundo o índice de vírus ICTVdB, baseado no 7 ^o Relatório do ICTV (van Regenmortel et al., 2000) e atualizações subseqüentes.....	5
2. Sintomatologia, presença de <i>P. graminis</i> e detecção de RSNV através de RT-PCR, em amostras coletadas no Estado do RS, safra 2005/06.....	56

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Enrolamento do arroz.....	8
2. Identificação das amostras de plantas de arroz coletadas no Estado do RS, safra 2005/06.....	39
3. Macroarranjos de clones da biblioteca de cDNAs.....	46
4. Eletroforese dos produtos amplificados pela PCR a partir de DNA genômico de arroz.....	48
5. Eletroforese dos produtos amplificados pela RT-PCR a partir de RNA de raízes e folhas de plantas de arroz infectadas com RSNV.....	48
6. Eletroforese dos produtos amplificados pela RT-PCR usando os oligonucleotídeos iniciadores oligodT/NOT e RSNV7-2.....	49
7. Seqüência de nucleotídeos de MV007 3'.....	49
8. Eletroforese dos produtos amplificados pela RT-PCR a partir de RNA de plantas de 3 cultivares de arroz infectadas e não infectadas com RSNV.....	51
9. Detecção de RSNV através de RT-PCR em diferentes partes da planta infectada.....	52
10. Sensibilidade da detecção de RSNV através de RT-PCR.....	54
11. Detecção de RSNV através de RT-PCR em amostras coletadas na Depressão Central, Fronteira Oeste e Planície Costeira Externa do Estado do RS, safra 2005/06.....	57
12. A) Comparação entre a detecção de RSNV através de RT-PCR e a presença de sintomas nas folhas e/ou de cistosoros de <i>Polymyxa graminis</i> B) Comparação entre a presença de cistosoros de <i>P. graminis</i> e de sintomas nas folhas.....	58
13. Sintomas foliares observados nas plantas de arroz analisadas.....	59

RELAÇÃO DE APÊNDICES

	Página
1. Meio de cultura Luria-Bertani (LB) empregado para o cultivo de <i>Escherichia coli</i>	72
2. Análise do macroarranjo de clones da biblioteca de cDNAs.....	73
3. Seqüência de nucleotídeos de clones da biblioteca de cDNAs.....	74
4. Análise <i>in silico</i> dos clones seqüenciados.....	76
5. Teste Qui-quadrado (χ^2) de associação entre a ocorrência de sintomas foliares do enrolamento do arroz e a presença de cistosoros de <i>Polymyxa graminis</i> (A); entre a detecção de RSNV e a presença de cistosoros de <i>P. graminis</i> (B); entre a ocorrência de sintomas foliares do enrolamento do arroz e a detecção de RSNV (C); e entre a diagnose (ocorrência de sintomas foliares do enrolamento do arroz e de cistosoros de <i>P. graminis</i>) e a detecção de RSNV (D).....	77

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

χ^2	Qui-quadrado
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
cDNA	DNA complementar
d.a.s.	Dias após a semeadura
dATP	2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato
dCTP	2'-desoxicitidina-5'-trifosfato
DEPC	Dietil pirocarbonato
dGTP	2'-desoxiguanosina-5'-trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dCTG, dGTP)
dsRNA	RNA de fita dupla
dTTP	2'-desoxitimidina-5'-trifosfato
DTT	Ditiotreitol
dUTP	2'-desoxiuridina-5'-trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EST	Expressed Sequence Tag
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactosídeo
IRGA	Instituto Riograndense do Arroz
LB	Luria-Bertani
mRNA	RNA mensageiro
nt	Nucleotídeo
pb	Par de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEG	Poli(et)ilenoglicol
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
RT	Transcrição Reversa
RT-PCR	Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
ss cDNA	cDNA de fita simples
TBE	Tris-Borato-EDTA
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é considerado um dos cereais mais importantes do mundo, sobretudo por constituir a base alimentar de grande parte da população mundial, principalmente na Ásia. No Brasil, o Estado do Rio Grande do Sul (RS) se destaca como o maior produtor, sendo responsável por mais de um quarto da área plantada e praticamente a metade da produção nacional.

A ocorrência de doenças é um obstáculo constante à manutenção e ao aumento da produtividade da cultura do arroz no RS. O contínuo melhoramento genético dessa cultura tem garantido níveis satisfatórios de resistência, principalmente contra a brusone (*Magnaporthe grisea*).

Doenças causadas por vírus em arroz não são consideradas importantes para a cultura no Brasil. Porém, o surgimento de uma nova doença causada por um vírus mudou esse panorama. O enrolamento do arroz foi observado pela primeira vez na Depressão Central do RS na safra 2001/2002 e desde então vem aumentando sua área de ocorrência no Estado. Isto está causando preocupação, tendo em vista os danos expressivos e a inexistência de um controle efetivo, mesmo nos países onde a doença ocorre há mais tempo.

O vírus causador do enrolamento do arroz é o Rice stripe necrosis virus (RSNV), que é transmitido para a planta por um vetor, o protozoário *Polymyxa*

graminis. Essa doença já é conhecida na África desde a década de 1970, mas somente na década de 1990 a mesma foi diagnosticada no continente americano. Desde então, os pesquisadores do Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), na Colômbia, têm estudado o enrolamento do arroz. Apesar disso, o genoma de RSNV permanece desconhecido, dificultando a sua detecção por métodos moleculares. A detecção de RSNV através de técnicas sorológicas seria possível, mas é limitada à pesquisa porque anticorpos específicos para o vírus não são produzidos em escala comercial. Já o diagnóstico do enrolamento do arroz pela observação dos sintomas é freqüentemente confundido com alterações causadas por outros agentes.

Devido à carência de conhecimentos sobre o agente causal do enrolamento do arroz e à inexistência de um método rápido e preciso para sua detecção, o objetivo deste trabalho foi identificar seqüências do genoma de RSNV, que possibilitassem sua detecção em plantas de arroz através da técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cultura do arroz

O arroz é um dos cereais mais cultivados no mundo, especialmente na Ásia, onde se constitui a base alimentar da população (Nedel et al., 1998). No mundo, mais de 150 milhões de hectares são plantados anualmente e a produção atinge mais de 600 milhões de toneladas, sendo o Brasil o nono maior produtor (FAOSTAT data, 2005).

O RS se destaca na orizicultura brasileira por ser o maior produtor nacional, com 46,7% da produção e 26,8% da área cultivada, e por possuir uma das maiores produtividades, maior que 5 t.ha⁻¹ (BRASIL, 2005).

A produtividade da cultura do arroz tem crescido continuamente. O marco significativo deste aumento ocorreu a partir do início da década de 1980, com o desenvolvimento pela pesquisa de cultivares de porte baixo e de rendimento alto (Carmona et al., 1994). Entretanto, a ocorrência de doenças é um dos fatores que limita maiores produtividades.

2.2. Principais doenças

Na região sul do Brasil, a cultura do arroz apresenta perdas por diversas doenças, entre elas a principal é a brusone, causada pelo fungo *Magnaporthe*

grisea (Hebert) Barr. Por ordem de importância, nos últimos anos, seguem-se as seguintes doenças: manchas das glumas (causadas por vários fungos e bactérias), queima das bainhas [*Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk (teleomorfo)], podridão do colmo [*Magnaporthe salvinii* (Cattaneo) R. Krause & Webster (teleomorfo)], mancha parda [*Cochliobolus miyabeanus* (Ito & Kuribayashi) Drechsler ex Dastur (teleomorfo)], mancha estreita [*Sphaerulina oryzina* K. Hara (teleomorfo)], escaldadura da folha [*Monographella albescens* (Thümen) Parkison, Sivanesan & Booth = *Metasphaeria albescens* Thümen (teleomorfo)], podridão do colar [*Sarocladium oryzae* (Sawada) W. Gams & D. Hawksworth = *Acrocyndrium oryzae* Sawada (anamorfo)], cárie ou carvão preto do grão [*Tilletia barclayana* (Bref.) Sacc. & Syd. in Sacc. = *Neovossia horrida* (Takah.) Padwick & A. Khan], ponta branca [*Aphelenchoides besseyi* Christie (nematóide)] e podridão das bainhas [*Athelia rolfsii* (Curzi) Tu & Kimbrough (teleomorfo)] (Instituto Riograndense do Arroz - IRGA, 2001).

2.3. Doenças virais

Em nível mundial, os primeiros registros de grandes prejuízos causados por doenças virais foram feitos no final do século XIX, no Japão. Da metade da década de 1950 até a de 1980 muitos outros casos foram identificados (Hibino, 1996). No entanto, até 3 décadas atrás, doenças virais em arroz eram consideradas de importância secundária (Abo & Fadhila, 2001). Em muitos países, os problemas causados por vírus parecem ter sido acentuados pela introdução de modernas técnicas de agricultura, as quais requerem cultivo intensivo e grande aumento da área cultivada (Hibino, 1996).

Atualmente, 16 vírus e 1 satélite de vírus que infectam arroz são reconhecidos pelo Comitê Internacional sobre Taxonomia de Vírus (ICTV) (The Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTVdB, 2004) (Tabela 1). Existe ainda o vírus denominado *Rice bunchy stunt virus* (RBSV), no momento não reconhecido pelo ICTV, mas listado na base de dados “Plant Viruses Online” (VIDEdB) (Dallwitz, 1980; Dallwitz et al., 1993; Brunt et al., 2004). Não obstante, Abo & Fadhila (2001) relatam que são conhecidos mais de 30 vírus que infectam arroz, embora muitos tenham sido encontrados somente em parcelas experimentais.

TABELA 1. Lista de vírus e satélite de vírus que infectam arroz, segundo o índice de vírus ICTVdB, baseado no 7º Relatório do ICTV (van Regenmortel et al., 2000) e atualizações subsequentes.

Nome do vírus¹	Abreviação	Gênero	Família
Rice black streaked dwarf virus	(RBSDV)	Fijivirus	<i>Reoviridae</i>
<i>Rice dwarf virus</i>	(RDV)	<i>Phytoreovirus</i>	<i>Reoviridae</i>
<i>Rice gall dwarf virus</i>	(RGDV)	<i>Phytoreovirus</i>	<i>Reoviridae</i>
Rice giallume, uma linhagem de Barley yellow dwarf virus	(BYDV-RGV)	–	<i>Luteoviridae</i>
<i>Rice grassy stunt virus</i>	(RGSV)	<i>Tenuivirus</i>	–
<i>Rice hoja blanca virus</i>	(RHBV)	<i>Tenuivirus</i>	–
<i>Rice necrosis mosaic virus</i>	(RNMV)	<i>Bymovirus</i>	<i>Potyviridae</i>
<i>Rice ragged stunt virus</i>	(RRSV)	<i>Oryzavirus</i>	<i>Reoviridae</i>
Rice stripe necrosis virus	(RSNV)	<i>Benyvirus</i>	–
<i>Rice stripe virus</i>	(RSV)	<i>Tenuivirus</i>	–
Rice transitory yellowing virus	(RTYV)	–	<i>Rhabdoviridae</i>
<i>Rice tungro bacilliform virus</i>	(RTBV)	Vírus do tipo Rice tungro bacilliform	<i>Caulimoviridae</i>
<i>Rice tungro spherical virus</i>	(RTSV)	<i>Waikavirus</i>	<i>Sequiviridae</i>
Rice wilted stunt virus	(RWSV)	<i>Tenuivirus</i>	–
<i>Rice yellow mottle virus</i>	(RYMV)	<i>Sobemovirus</i>	–
<i>Rice yellow stunt virus</i>	(RYSV)	<i>Nucleorhabdovirus</i>	<i>Rhabdoviridae</i>
Rice yellow mottle virus Satellite			

¹Os nomes dos vírus em itálico representam aqueles com espécies reconhecidas e os demais representam tentativas de espécies.

Entre os 17 vírus citados, 15 são transmitidos por insetos, principalmente por cigarrinhas, enquanto dois, RNMV e RSNV, são transmitidos pelo protozoário

P. graminis.

A maioria desses vírus ocorre na Ásia. No continente americano, somente RHBV havia sido identificado em arroz (Hibino, 1996). Porém, em 1994, o RSNV foi diagnosticado como agente causal do “entorchamiento” (enrolamento), naquele momento, uma nova doença do arroz na Colômbia (Morales et al., 1995a, 1995b).

2.4. Enrolamento do Arroz (RSNV)

2.4.1. Etiologia

O primeiro registro do RSNV infectando arroz foi feito em 1977, na Costa do Marfim, África (Louvel & Bidaux, 1977). Plantas de arroz com uma doença conhecida como “entorchamiento” foram observadas pela primeira vez em 1969 na Colômbia (Restrepo citado por Morales et al., 1995a). A associação de plantas com sintomas dessa doença com a presença de RSNV só foi confirmada em 1994, 4 anos após o aparecimento de uma nova epidemia de uma doença com os sintomas semelhantes aos de 1969. No continente americano, além da Colômbia, Panamá e Brasil registraram a ocorrência de RSNV (Martinez et al., 2005).

No Brasil, sintomas idênticos aos do “entorchamiento”, que no RS vem sendo denominada “enrolamento do arroz”, foram observados na safra 2001/2002, em diversas lavouras da Depressão Central do Estado, principalmente no município de Dona Francisca. As pesquisas culminaram com o primeiro diagnóstico da doença no território brasileiro em 2002 (Maciel et al., 2002, 2004 no prelo).

Atualmente, o RSNV (código no ICTVdB: 00.088.0.01.003.) é uma espécie tentativa classificada no gênero *Benyvirus* (código no ICTVdB: 00.088.0.01.)

(Morales et al., 1999a). Anteriormente, era considerado uma espécie tentativa classificada no gênero *Furovirus* (código no ICTVdB: 00.027.0.01.) (van Regenmortel et al., 2000).

Os vírions de RSNV possuem partículas alongadas, com simetria helicoidal, em forma de bastão rígido e não possuem envelope lipídico. As partículas possuem uma clara divisão de dimensões, com comprimento de 110–160 nm e de 270–380 nm e com diâmetro de 20 nm (Büchen-Osmond, 2004) (Figura 1). É possível que as partículas menores, observadas em isolados de RSNV africanos (110–160 nm) e colombianos (140–160 e 195–215 nm) possam representar fragmentos das partículas predominantes (Morales et al., 1999b).

Segundo Büchen-Osmond (2004) o genoma do vírus é bipartido, constituído de RNA linearizado de fita simples de sentido positivo (ssRNA +), dividido em mais de um tipo de partícula. Embora a descrição do vírus disponível no sítio do ICTVdb (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>) (Büchen-Osmond, 2004) considere que o genoma de RSNV seja bipartido, Morales et al. (1999b) observaram a presença de 4 fragmentos distintos de RNA de fita dupla (dsRNA), com tamanhos aproximados de 6.300, 4.600, 2.700 e 1.800 pares de bases (pb) em extratos de dsRNA obtidos de plantas doentes. Esta observação, caso confirmada, considera que o genoma de RSNV tenha organização similar aos genomas de 2 *Benyvirus*: *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) e *Beet soilborne mosaic virus* (BSBMV). Esta possibilidade é reforçada pela observação da ocorrência de 2 RNAs maiores, obtidos de isolados colombianos de RSNV, que foram similares em tamanho aos RNAs correspondentes de BNYVV e BSBMV (Morales et al., 1999b). Embora os 2 RNAs menores apresentem

algumas diferenças em relação aos de BNYVV e BSBMV, diferenças semelhantes no tamanho entre os RNAs 3 e 4 já haviam sido relatadas em diferentes isolados de BNYVV (Morales et al., 1999b).

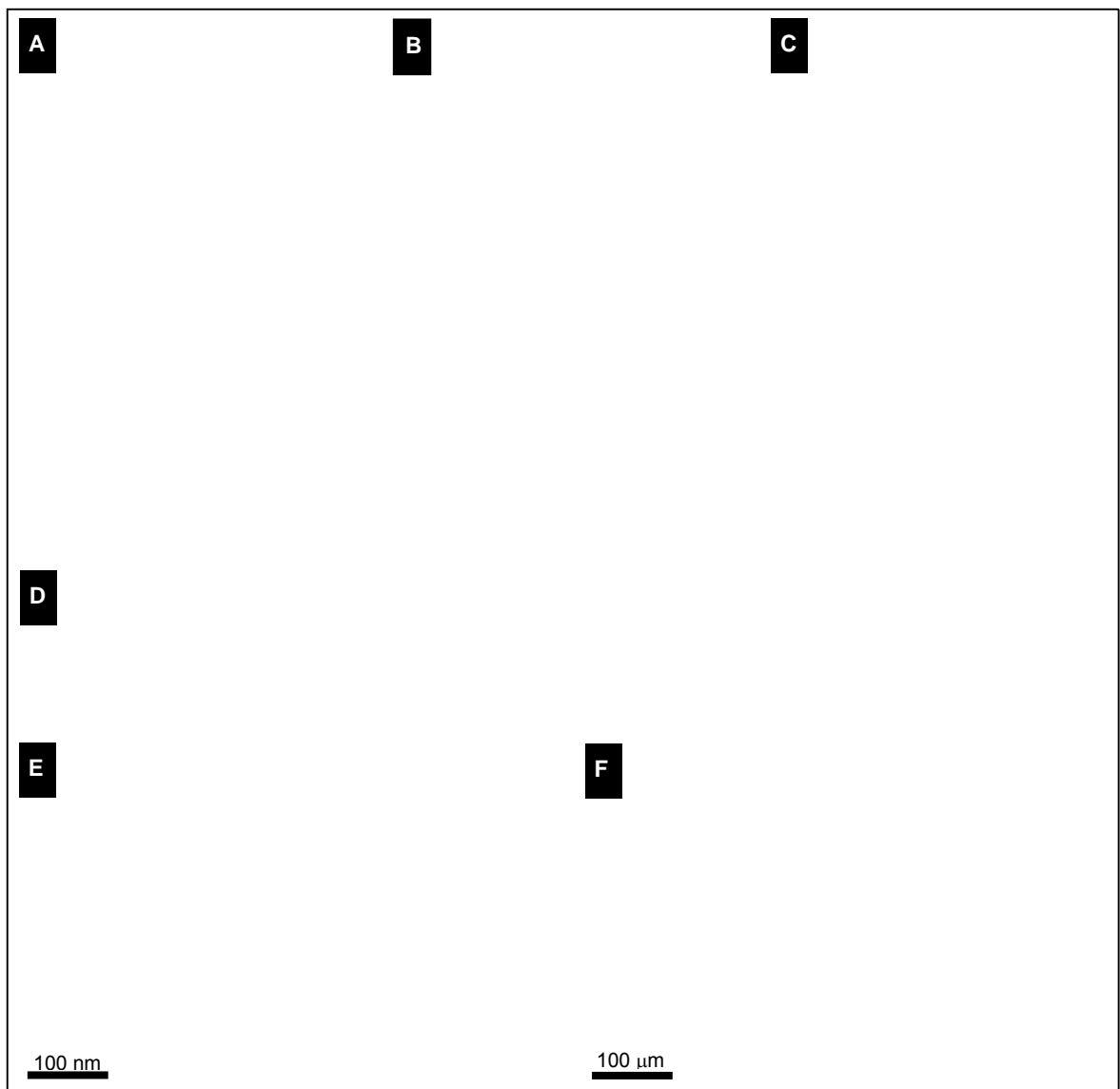


FIGURA 1. Enrolamento do arroz. A: Planta sadia; B: Planta doente; C: Sintoma de distorção da folha; D: Sintoma de necrose em listras; E: Agente causal: Vírions de RSNV observados em extratos foliares (Morales et al., 1999b); F: Vetor: Cistosoros de *Polymyxa graminis*, em raiz de planta infectada.

Além da organização do genoma, o tamanho mais longo das partículas virais de BNYVV e RSNV difere de membros do gênero *Furovirus*. Outra diferença

em relação aos *Furovirus* é que RSNV, assim como os outros *Benyvirus*, possui uma cauda de poli-A na extremidade 3' dos seus RNAs (Morales et al., 1999b).

2.4.2. Sintomatologia

Os sintomas observados em plantas de arroz infectadas com RSNV ocorrem no primeiro mês após a semeadura (Calvert & Sedano, 2004) e são: morte de plântulas; folhas com listras amareladas, que depois se tornam necróticas; e retorcimento (distorção) de folhas e panículas (Hibino, 1996; Morales et al., 1999b; Maciel et al., 2002) (Figura 1). As raízes de plantas infectadas podem apresentar-se dobradas e logo se tornam necróticas (Calvert & Sedano, 2004).

Nas células infectadas com RSNV, partículas do vírus ocorrem em agregados observados no citoplasma (Hibino, 1996). Também podem ser observados retículo endoplasmático retorcido e mitocôndrias com formato anormal (Morales et al., 1999b). O exame do sistema radicular de plantas com sintomas revela a presença de cistosoros, agrupamentos irregulares de esporos de resistência maduros, característicos dos plasmodioforídios (Protozoa) vetores de vírus de plantas (Morales et al., 1995a, 1995b, 1999b) (Figura 1).

2.4.3. Ciclo da doença e epidemiologia

O vetor de RSNV é o plasmodioforídio *P. graminis*, que também é vetor de pelo menos outros 14 vírus de plantas pertencentes aos gêneros *Furovirus*, *Bymovirus*, *Benyvirus* e *Peduvirus* (Campbell, 1996; Kanyuka et al., 2003). RSNV não é transmitido via sementes (Büchen-Osmond, 2004), mas pode ser

transmitido por *P. graminis* presente em restos culturais aderidos às sementes. Embora não haja registros de transmissão mecânica de RSNV em condições de lavoura, a mesma pode ser realizada sob condições experimentais (Morales et al., 1999b; Büchen-Osmond, 2004).

A taxonomia de plasmodioforídios é questionada há anos. Tradicionalmente a maioria dos fitopatologistas considera-os como fungos do filo *Plasmodiophoromycota*. Outros têm os incluído no reino Protozoa ou Protista. Análises das seqüências das pequenas subunidades do DNA ribossomal (rDNA) sugerem que plasmodioforídios não são relacionados aos Ascomicetos, Basidiomicetos, Oomicetos, Mixomicetos ou Quitridiomicetos, o que favorece sua classificação dentro de Protozoa (Kanyuka et al., 2003; Rush, 2003). Além disso, possuem diversas características comuns a membros do reino Protozoa, como parasitismo intracelular obrigatório, divisão nuclear cruciforme, zoósporos com 2 flagelos lisos de tamanhos diferentes, plasmódio com vários núcleos e esporos de resistência (cistos) de longa duração, que às vezes são agrupados, formando um cistosoro (Rush, 2003).

Ainda não é conhecido como os vírus transmitidos por *P. graminis* entram no citoplasma da célula da planta hospedeira. Provavelmente esse processo ocorra quando os zoósporos penetram a célula e transferem seus componentes para o citoplasma. Ou ainda durante o estágio esporogênico do plasmódio, quando existe apenas uma fina camada separando *P. graminis* do citoplasma da célula hospedeira (Kanyuka et al., 2003). Adams et al. (2001) sugerem que, no caso de vírus transmitidos por plasmodioforídios, duas regiões transmembrana

presentes na proteína do capsídeo poderiam facilitar o movimento da partícula viral através da membrana.

Evidências diretas da presença de vírus em zoósporos e esporângios foram obtidas no caso de BNYVV e *Barley mild mosaic virus* (BaMMV) (Rochon et al., 2004). Mas não se sabe como e quando *P. graminis* adquire seus vírus (Kanyuka et al., 2003). Rochon et al. (2004) relatam que, no caso da interação entre *Soilborne wheat mosaic virus* (SBWMV) e *P. graminis*, a proteína de movimento e o RNA viral foram detectados em esporos de resistência, sugerindo que o componente infeccioso dos esporos de resistência não seja um vírion, mas provavelmente complexos de proteína de movimento e RNA virais. A presença do vírus dentro dos esporos de resistência também sugere que o vírus está dentro de zoósporos dos quais eles são derivados uma vez que seria improvável que o vírus conseguisse entrar através das paredes rígidas e espessas dos esporos de resistência (Rochon et al., 2004).

P. graminis é um habitante onipresente do solo quando cereais suscetíveis são cultivados no local. Ele pode sobreviver em uma ampla variedade de solos com variações de pH, textura e estrutura (Rush, 2003). O solo de lavouras com plantas de arroz afetadas pela doença causada por RNMV, um vírus de arroz que também é transmitido por *P. graminis*, mantém estruturas do vetor virulíferas por muitos anos (Hibino, 1996). Valores de pH entre 4 e 8 têm pouco efeito na habilidade de *P. graminis* transmitir RSNV (Adams & Ward, 1999). A infecção de raízes por plasmodioforídios, bem como por outros parasitas que produzem zoósporos, é favorecida por condições de alta umidade do solo (Rush, 2003). Porém, em arroz, altos níveis de infecção por RNMV através do solo são

observados quando a umidade é baixa e o solo atinge temperaturas entre 25-30 °C (Hibino, 1996). Como a umidade não é favorável para a infecção, a incidência da doença causada por RNMV é menor em arroz semeado diretamente em lavouras alagadas (Hibino, 1996).

Os estudos sobre o desenvolvimento de *P. graminis* revelaram que isolados de regiões temperadas são capazes de crescer e infectar raízes de cevada em uma ampla faixa de temperatura, com um ótimo entre 17–20 °C (Adams & Swaby, 1988). Isolados tropicais associados com *Peanut clump virus* (PCV) possuem uma temperatura ótima maior, 27-30 °C (Legrève et al., 1998).

Uma grande diversidade na especificidade por hospedeiros foi demonstrada para alguns isolados de *P. graminis*, os quais são capazes de infectar espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas (Rush, 2003). *P. graminis* foi detectado em raízes de trigo, cevada, arroz, aveia e centeio cultivados, espécies dos gêneros *Zea*, *Sorghum*, *Agrostis*, *Dactylis*, *Festuca*, *Poa* e *Phleum*, e outras espécies forrageiras. Isto é preocupante visto que todas estas espécies gramíneas podem servir como reservatórios para *P. graminis* (Kanyuka et al., 2003). Em contraste com essa ampla gama de hospedeiros de *P. graminis*, *O. sativa* é o único hospedeiro de RSNV na natureza, embora experimentalmente *Chenopodium album*, *C. amaranticolor*, *C. murale*, *C. quinoa* (Morales et al., 1999b) e *Nicotiana benthamiana* (Büchen-Osmond, 2004) também sejam suscetíveis ao vírus.

Na lavoura, a doença ocorre em manchas (Hibino, 1996). Na Colômbia, RSNV tem se disseminado nas áreas de cultivo em uma velocidade relativamente alta nos últimos anos, como resultado do movimento de equipamentos

contaminados para lavouras não contaminadas. Mesmo que RSNV não seja transmitido pela semente, estruturas de resistência de *P. graminis* podem ser veiculadas através de resíduos ou solo aderidos a semente (Correa et al., 2004a, 2004b). Em lavouras com presença de RSNV foram registradas perdas médias de 20%, chegando a atingir 50% em alguns casos (Pardo & Muñoz citados por Morales et al., 1995b; Johnson et al., 1998).

2.4.4. Controle

As principais estratégias de controle do enrolamento do arroz, reunidas por Morales (2001), se baseiam em práticas adotadas para controlar outros vírus transmitidos por *Polymyxa* spp. em culturas de clima temperado assim como práticas específicas contra RSNV. Entre as estratégias de controle sugeridas por Morales (2001) estão o uso de sementes provenientes de regiões produtoras não infestadas por RSNV e a antecipação ou retardamento da época de semeadura. As demais estratégias são a rotação com espécies não gramíneas; controle de espécies silvestres antes da semeadura do arroz; manejo da água de irrigação e suas fontes, pois essas podem ser um meio de difusão de zoósporos virulíferos; e adoção de medidas de restrição do trânsito de implementos, máquinas agrícolas e pessoas para evitar a contaminação de áreas vizinhas a locais infectados.

O manejo adequado da adubação também é indicado para minimizar os danos causados pelo enrolamento. Embora tenha sido relatado que a predisposição à doença seja menor em plantas de lavouras com boas condições nutricionais (Correa-Victoria citado por Maciel et al., 2005), esse efeito positivo sobre a planta parece ser devido à compensação dos danos causados pelo

enrolamento através do aumento de produção das plantas não infectadas. Produtores de arroz do município de Dona Francisca, no RS, relatam que a aplicação adicional de nitrogênio em cobertura induz um maior perfilhamento das plantas não infectadas. Maciel et al. (2005) também verificaram que a adubação não tem efeito sobre a incidência da doença, o que reforça a hipótese da compensação.

2.4.4.1. Controle genético

Ensaio realizados na Costa do Marfim, África, revelaram que a espécie *Oryza glaberrima* possui resistência ao enrolamento (Johnson et al., 1998). Estes resultados foram confirmados na Colômbia, onde pesquisadores do CIAT vêm obtendo sucesso na transferência interespecífica de um gene de resistência ao enrolamento do arroz presente em *O. glaberrima* para os cultivares comerciais de *O. sativa* (Correa et al., 2004a, 2004b; Martinez et al., 2005).

A resistência genética ao enrolamento do arroz é provavelmente controlada por um ou poucos genes de efeito maior (Kanyuka et al., 2003). Os resultados da avaliação da interação entre o vetor e plantas de arroz sugerem que essa resistência possa ser efetiva contra o vetor e não contra o vírus (Correa et al., 2004b).

2.4.4.2. Controle biológico

O controle biológico, através de microrganismos antagonistas pode ser uma alternativa de controle. A incorporação de adubos verdes ou orgânicos que promovam a atividade desses microrganismos é recomendada por Fonseca &

Pérez (citados por Morales, 2001). O fungo *Trichoderma harzianum* tem sido utilizado para reduzir a incidência de infecção de raízes de beterraba açucareira por *Polymyxa betae* (D'Ambra & Mutto, 1986). Entretanto, em experimentos conduzidos sob condições de lavoura no RS, a utilização de isolados locais de *Trichoderma* spp. não afetou a incidência do enrolamento do arroz (Almança et al., 2005). Apesar disso, experimentos anteriores, realizados em casa de vegetação, haviam mostrado diminuição da incidência do enrolamento em plantas de arroz tratadas com *Trichoderma* spp. (Almança, 2004. Informação verbal).

2.4.4.3. Controle químico

A utilização de produtos químicos, tais como fungicidas e outros utilizados na esterilização do solo, tem sido efetiva contra *Polymyxa* spp. em áreas reduzidas, mas esses produtos são muito caros para aplicá-los em campos contaminados pelo vetor (Brunt & Richards, 1989). Uma alternativa seria o tratamento de sementes, como tem sido estudado pelos pesquisadores do CIAT, na Colômbia. Porém, em ensaio conduzido em Agudo, RS, Maciel et al. (2005) não observaram efeito do tratamento de sementes com dois fungicidas, carboxina e tiram, na incidência do enrolamento do arroz.

2.5. Métodos de detecção de vírus

Vírus, assim como bactérias, causam doenças em plantas que são difíceis de controlar. Conseqüentemente, o uso de material propagativo livre do patógeno é um importante, embora não exclusivo, método para controle de doenças virais e bacterianas. Como um material propagativo sadio não significa necessariamente

um material livre de patógenos, a detecção do patógeno é um modo de atestar sua pureza .

A detecção se relaciona com o estabelecimento da presença de um determinado organismo alvo em uma amostra, com ênfase especial em indivíduos assintomáticos (Louws et al., 1999). A detecção também pode fazer parte da diagnose, a qual se relaciona com a identificação da natureza e causa de uma doença em plantas mostrando sintomas. Os métodos de detecção de vírus em plantas podem ser classificados em 4 grupos principais: biológicos, físicos, sorológicos e moleculares.

2.5.1. Métodos biológicos

Como vírus não podem ser identificados a olho descoberto ou através de microscópio óptico, sua presença tem sido detectada pelos sintomas exibidos pelas plantas hospedeiras ou indicadoras (indexação) depois da transmissão do vírus por enxertia, inoculação mecânica, ou por um vetor (Agrios, 1998). Historicamente, a indexação foi usada para a detecção de vírus. Este processo tem limitações para ser empregado na rotina de análise de um grande número de amostras (López, 2003), sobretudo em espécies de plantas lenhosas. Para ter-se uma idéia, os testes de indexação para detecção de *Grapevine leafroll associated virus* (GLRaV 1-8), *Grapevine virus B* (GVB) e *Rupestris stem pitting virus* associados a videiras requerem de 2 a 3 anos até o desenvolvimento de sintomas (Martin et al., 2000). Apesar das suas limitações, a indexação é necessária nos casos em que os vírus não são conhecidos a ponto de permitir sua detecção por outro método.

2.5.2. Métodos físicos

Uma abordagem completa dos métodos físicos utilizados para detecção de vírus foi feita por Matthews (1991). Embora muitas dessas técnicas tenham sido desenvolvidas há muitos anos, ainda hoje são muito úteis na identificação de vírus, principalmente de vírus desconhecidos. Entre elas, cabe destacar: a estabilidade viral *in vitro*, como o ponto de inativação térmica; as propriedades físico-químicas, como a densidade, os coeficientes de sedimentação e difusão, o espectro de absorção ultravioleta e a mobilidade eletroforética; a ultracentrifugação analítica; a centrifugação em gradiente de densidade; a análise por microscopia eletrônica. Através da observação de partículas em extratos brutos de planta ou preparações purificadas se pode determinar o tamanho, a forma e algumas características da partícula viral.

2.5.3. Métodos sorológicos

A diagnose e a detecção de vírus de plantas incluem testes sorológicos desde os anos 1960 (Martin et al., 2000). O ensaio de imuno-adsorção ligado a enzimas (“enzyme-linked immunosorbent assay” - ELISA), desenvolvido no final dos anos 1970 (Clark & Adams, 1977), é uma técnica sorológica que tem sido largamente empregada por diversas especialidades envolvidas em patologias. O uso da mesma tem aumentado a habilidade de fitopatologistas detectarem e estudarem vírus de plantas e suas respectivas doenças (Agrios, 1998). Atualmente existem diversas variações do ELISA em uso. Uma delas é o ELISA direto, ou sanduíche duplo de anticorpo (“double-antibody-sandwich” ELISA, DAS-

ELISA). Na Espanha, a introdução desta técnica aumentou expressivamente a capacidade de diagnose de *Citrus tristeza virus* (CTV) em citros (Cambra et al., 2000).

As vantagens do ELISA são a alta sensibilidade, a possibilidade de testar um grande número de amostras simultaneamente com o uso de uma pequena quantidade de anticorpo, a obtenção de resultados quantitativos, a possibilidade de automatização e a inexistência de necessidade de conhecimento sobre a morfologia do vírus (Agrios, 1998).

Por outro lado, o ELISA não se aplica a agentes desconhecidos e pode apresentar reação cruzada com antígenos não relacionados, além de ser pouco confiável em certos patossistemas e em certas épocas do ano em função do estado fisiológico da planta. López et al. (2003) relatam que a especificidade de detecção de vírus e bactérias feitas por técnicas sorológicas aumentaram consideravelmente com o uso de anticorpos monoclonais e/ou recombinantes específicos.

Além do ELISA e suas diversas variações, vale citar ainda a existência de outras técnicas sorológicas, como a microscopia eletrônica de imunoabsorção (“immunosorbent electron microscopy”, ISEM), que é usada para detectar e identificar vírus presentes em baixas concentrações através de microscópio eletrônico; a imunofluorescência, que permite a detecção de vírus dentro de células infectadas (Agrios, 1998); e os imunossensores, que são dispositivos que incorporam um anticorpo a um transdutor (Eun et al., 2002).

2.5.4. Métodos moleculares

Assim como as técnicas sorológicas, as técnicas moleculares são mais apropriadas para a análise de um grande número de amostras (López et al., 2003). Com o desenvolvimento de procedimentos rápidos de extração de ácidos nucléicos e técnicas de amplificação para detectar múltiplos alvos de DNA ou RNA, os métodos moleculares de detecção de patógenos estão sendo cada vez mais utilizados na rotina de laboratórios de diagnose. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), em diferentes formatos, é a técnica molecular mais usada para detecção de vírus e bactérias (López et al., 2003). Como a maioria dos vírus de plantas possui genoma de RNA, existe a necessidade de uma reação de transcrição reversa (RT) de RNA para cDNA, que servirá de molde para a PCR (RT-PCR).

Existem 3 grupos de métodos baseados no ácido nucléico. O primeiro é o isolamento e a análise por eletroforese de dsRNAs (Agrios, 1998). Morales et al. (1999b) comparam algumas características de RSNV com as de BSBMV e BNYVV através da análise do padrão de dsRNAs isolados de plantas de arroz com sintomas do enrolamento. O padrão de dsRNA também é uma das maneiras de diferenciar múltiplos variantes de CTV (Moreno et al., 1998). Apesar de ser laboriosa, essa técnica possui a vantagem de poder ser usada para detectar vírus conhecidos e desconhecidos para os quais não existe anticorpo ou informações sobre seqüências disponíveis (Agrios, 1998).

O segundo grupo de técnicas moleculares envolve a hibridização de ácidos nucléicos virais a sondas conhecidas de vírus. Diversos genomas de patógenos de plantas, incluindo os genomas virais, já foram completamente seqüenciados e o

seqüenciamento de muitos outros está em andamento. Assim, novas seqüências específicas poderiam ser usadas para desenvolver sondas (Van Sluys et al. 2002) e oligonucleotídeos iniciadores para detecção de diferentes patógenos.

Desde o desenvolvimento da marcação não radiativa de ácidos nucléicos, a hibridização molecular se tornou uma alternativa ao ELISA e tem sido aplicada em diversos patossistemas. Para 6 vírus de *Dianthus caryophyllus* L. examinados por Sánchez-Navarro et al. (1999), as hibridizações moleculares não isotópicas foram, em termos práticos, entre 5 e 25 vezes mais sensíveis que o ELISA. Apesar dessa maior sensibilidade, os métodos baseados na hibridização molecular são menos usados em diagnose que os métodos sorológicos, principalmente porque são mais caros e laboriosos.

Sánchez-Navarro et al. (1999) mostraram que o teste de hibridização para diferentes vírus pode ser feito simultaneamente, sem etapas ou custos adicionais, utilizando as sondas para cada vírus na mesma amostra de planta. Neste sentido, os microarranjos de DNA são promissores para de detecção de vírus, pois eles podem comportar cerca de 30.000 sondas. A especificidade dessas sondas pode variar desde um amplo grupo de vírus até isolados específicos deste grupo. Porém seu custo é ainda muito alto e requer técnicos especializados para interpretação do grande volume de dados gerados, o que torna seu uso na detecção de vírus ainda distante, em contraste com a ampla utilização em estudos de genômica funcional (López et al., 2003).

O terceiro grupo de técnicas se baseia na amplificação de ácidos nucléicos. Entre os diferentes formatos da PCR e da RT-PCR, as principais vantagens são especificidade, sensibilidade, facilidade de uso e rapidez. A especificidade é

diretamente relacionada com o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores e com o protocolo de amplificação (López et al., 2003). A alta sensibilidade facilita a detecção de seqüências virais mesmo durante os estádios iniciais de infecção de plantas e em amostras de solo e vetores (Fenby et al., 1995). Embora a PCR possa alcançar alta sensibilidade e especificidade, sua introdução na rotina de detecção tem sido dificultada pela falta de robustez (Van der Wolf et al. citados por López et al., 2003). Falhas da amplificação pela PCR de material vegetal infectado e não infectado têm sido relatadas em diferentes experimentos comparativos. Contaminações com “amplicons” (fragmentos amplificados por PCR) podem ser responsáveis por falsos positivos, enquanto que componentes inibidores em extratos das amostras são a principal causa para falsos negativos (Van der Wolf et al. citados por López et al., 2003).

Diversos métodos de extração de ácidos nucléicos foram desenvolvidos a fim de melhorar as características da PCR e torná-la mais aplicável na análise de grandes quantidades de amostras. A eficiência da PCR é controlada por muitos parâmetros, entre eles, um dos mais críticos é a qualidade do DNA a ser amplificado (López et al., 2003). Inicialmente se utilizavam protocolos complexos e caros para a extração de ácidos nucléicos (MacKenzie et al., 1997). Porém, tais métodos de extração, desenvolvidos nos anos 1990, foram substituídos por protocolos rápidos e simples (Llop et al., 1999) ou ainda por “kits” comerciais de extração de ácidos nucléicos.

Mudanças na PCR também estão constantemente adequando o seu uso na detecção de vírus. A RT-PCR por imunocaptura (IC/RT-PCR) é usada diretamente com extratos de plantas (Nolasco et al., 1993). Apesar dessa

vantagem, a técnica é limitada devido a alguns patógenos serem inaptos ou ineficientemente imunogênicos e por não haver antisoro adequado disponível (Martin et al., 2000)

Sistemas de detecção simultânea de diversos organismos, denominados multiplex, freqüentemente são utilizados na PCR. Eles consistem em misturas de oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada alvo (James, 1999), ou ainda de um único par de oligonucleotídeos iniciadores que permite amplificação diferencial de diversos alvos (James & Upton, 1999)

As melhorias nas técnicas de detecção por amplificação também reduziram significativamente os problemas de contaminações que costumam gerar falsos positivos. Um simples esquema foi descrito por Olmos et al. (1999) para realizar a PCR-protégida (“nested-PCR”) em um tubo único, reduzindo o risco de contaminação.

Outras variações da PCR mais recentes estão sendo usadas na detecção de vírus. Olmos et al. (2002) apresentaram uma nova técnica de amplificação de RNA viral extraído de material vegetal, denominada amplificação cooperativa (“co-operational amplification”, Co-PCR) com sensibilidade pelo menos 100 vezes maior que a obtida com RT-PCR e similar a da PCR-protégida (Olmos et al., 2002). A PCR em tempo real (“real time-PCR”) é também uma alternativa para detecção de vírus. A reação em tempo real combina amplificação, detecção e quantificação em uma única etapa e tem sido aplicada na detecção de diversos patógenos (Weller et al., 2000).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Isolamento parcial do genoma de RSNV

3.1.1. Material vegetal

Aproximadamente 50 plantas do cultivar EPAGRI 108 apresentando sintomas do enrolamento foram coletadas em lavouras do município de Dona Francisca, RS, em dezembro de 2004. Após a retirada do solo das raízes, as plantas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -70 °C.

Uma segunda fonte de material vegetal foi obtida através de um ensaio biológico conduzido com plantas do cultivar BR IRGA 409, em casa de vegetação. Dois vasos foram semeados com 25 sementes cada. Um vaso foi preenchido com solo coletado em lavouras do município de Dona Francisca, onde havia plantas de arroz com enrolamento, além de restos de raízes de plantas doentes. O outro vaso foi preenchido com solo não contaminado, coletado na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre. Os vasos foram mantidos com umidade abaixo da saturação até as plântulas emergirem e atingirem entre 3 e 4 cm. A partir desse ponto o solo foi saturado, mantendo-se uma lâmina de água entre 1 e 2 cm. Os vasos foram adubados com N na forma de uréia [50 Kg de N.ha⁻¹ antes da semeadura e 50 kg de N.ha⁻¹ 15 dias após a semeadura (d.a.s.)]. As plantas foram coletadas 40 d.a.s., quando os sintomas do enrolamento eram evidentes nas plantas

conduzidas em vasos inoculados, e então congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -70 °C.

3.1.2. Purificação parcial de RSNV

Plantas do cultivar EPAGRI 108 coletadas em lavouras do município de Dona Francisca foram submetidas a um protocolo de purificação parcial de vírus adaptado do Centro Internacional de la Papa - CIP (2004). Tecido vegetal das raízes e folhas (50 g) foi triturado e homogeneizado em um multiprocessador (Arno) com 100 ml de solução contendo 0,1 M de tampão fosfato (pH 7,0) acrescido de 0,2% de 2-mercaptoetanol e 10% de etanol. A mistura resultante foi filtrada através de uma gaze e centrifugada a 7.800 x g durante 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, acrescido de 1% (v/v) de Triton X-100 e agitado durante 1 h a 4 °C. O material foi centrifugado a 5.500 x g durante 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, acrescido de ¼ (v/v) de solução contendo 0,2 M de NaCl e 4% de polietilenoglicol 8.000 e então agitado (100 rpm) durante 1 h a 4 °C seguido de incubação durante 1 h à temperatura ambiente. Após, esse material foi centrifugado a 7.800 x g durante 30 min a 4 °C. O precipitado foi ressuspensionado em 0,4 ml de tampão fosfato a 0,01 M (pH 7,2) e agitado (100 rpm) durante aproximadamente 16 h a 4 °C. O material sofreu uma última centrifugação a 5.000 x g durante 10 min a 4 °C. O sobrenadante, que possui o vírus parcialmente purificado, foi mantido por até 1 mês na geladeira.

3.1.3. Extração de RNA total

Plantas de arroz coletadas em Dona Francisca (plantas do cultivar EPAGRI 108 infectadas com RSNV) e do ensaio biológico (plantas do cultivar BR IRGA 409 infectadas e não infectadas com RSNV), além do vírus purificado parcialmente, foram usadas para a extração de RNA total, segundo o método descrito por Bugos et al. (1995). Algumas plantas do cultivar EPAGRI 108 infectadas foram divididas em raízes e folhas. As plantas foram trituradas utilizando-se nitrogênio líquido, transferindo-se aproximadamente 100 mg de tecido vegetal triturado para tubos de 1,5 ml. No caso do vírus purificado parcialmente, alíquotas de 400 μ l foram utilizadas. Em ambos casos, acrescentaram-se 400 μ l de tampão de homogeneização [100 mM de Tris-HCl (pH 9,0); 200 mM de NaCl; 15 mM de EDTA; 0,5% de dodecil sulfato de sódio (SDS)], acrescido de 2,3 μ l de 2-mercaptoetanol, 400 μ l de fenol e 80 μ l de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v:v). Após homogeneização por agitação vigorosa durante 2 min, foram acrescentados 28 μ l de acetato de sódio 3 M (pH 5,2). Após nova homogeneização durante 30 s, incubou-se em gelo por 15 min. Em seguida, centrifugou-se a 16.000 x g durante 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para duas extrações com 480 μ l de fenol:clorofórmio: álcool isoamílico (125:24:1, v:v:v), com centrifugações a 16.000 x g durante 10 min a 4 °C. Após as extrações, os ácidos nucleicos presentes no sobrenadante foram precipitados incubando-os com isopropanol (1:1, v:v) durante 1 h a -20 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g durante 10 min a 4 °C. O sedimento foi ressuspenso em água ultra-pura (Milli Q). A precipitação seletiva de RNA foi realizada acrescentando-se cloreto de lítio para uma concentração final de 2 M e

incubando-se em gelo durante 3 h, seguida de centrifugação a 14.000 x g durante 10 min a 4 °C. O material precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 70% e ressuspenso em água ultra-pura. A quantidade de RNA total foi estimada por leitura em espectrofotômetro a 260 nm (SmartSpec Plus, Bio-Rad). O RNA foi armazenado a -20 °C.

3.1.4. Construção de uma biblioteca de cDNAs

A biblioteca de cDNAs foi construída a partir do RNA extraído do vírus purificado parcialmente. A síntese da primeira fita de cDNA foi obtida através da transcrição reversa do RNA utilizando-se o “Thermoscript RT-PCR System” (Invitrogen). A reação foi composta de 2 µg de RNA total; 1 mM de cada dNTP; 50 mM de Tris-acetato (pH 8,4); 75 mM de acetato de potássio; 8 mM de acetato de magnésio; 5 mM de Ditioneitol (DTT); 2,5 µM de oligonucleotídeo iniciador [oligodT₍₂₀₎(5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3')]; 40 U de RNaseOUT; 15 U de transcriptase reversa ThermoScript; e água tratada com DEPC até completar um volume de 20 µl. Inicialmente, o oligonucleotídeo iniciador, os dNTPs e o RNA foram misturados e aquecidos durante 5 min a 65 °C, sendo imediatamente transferidos para o gelo. Em seguida, o restante dos componentes foi adicionado. A reação foi incubada durante 1 h a 50 °C e em seguida durante 5 min a 85 °C. O RNA adicionado na reação foi degradado acrescentando-se 2 U de RNase H e incubando-se durante 20 min a 37 °C.

A síntese da segunda fita de cDNA foi realizada utilizando-se o fragmento grande da enzima DNA polimerase I [Klenow (Invitrogen)], adaptando-se as recomendações do fabricante. A reação foi composta da amostra contendo o

cDNA de fita simples obtido na etapa anterior (35%, v/v); 200 μM de cada dNTP; 2,5 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ de oligonucleotídeos iniciadores hexâmeros; 50 mM de Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM de MgCl_2 ; 50 mM de NaCl; 1 U de Klenow e água ultra-pura até completar um volume de 60 μl . A reação foi incubada durante 16 h a 4 °C.

Os cDNAs de dupla fita foram clonados em *Escherichia coli* (item 3.1.5).

3.1.5. Clonagem

Os cDNAs obtidos através do procedimento descrito no item 3.1.4. foram digeridos em uma reação composta pelos cDNAs (60%, v/v); 50 mM de Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM de MgCl_2 ; 50 mM de NaCl; 30 U de *Alu* I (Pharmacia); 30 U de *EcoR* V (Gibco BRL) e água ultra-pura até completar um volume de 100 μl . A reação foi incubada durante 16 h a 37 °C.

O plasmídeo pLITMUS 38i (New England Biolabs) foi linearizado e suas extremidades foram desfosforiladas para evitar a sua re-ligação. A digestão foi composta de 15,2 μg do plasmídeo; 50 mM de Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM de MgCl_2 ; 50 mM de NaCl; 45 U de *EcoR* V (Gibco BRL) e água ultra-pura até completar um volume de 15 μl . A reação foi incubada durante 2 h a 37 °C e em seguida incubada durante 20 min a 65 °C e 20 min à temperatura ambiente, para inativação da enzima.

A desfosforilação do plasmídeo digerido (16,416 pmoles de extremidades 5') foi realizada com a adição de 50 mM de Tris-HCl (pH 9,3); 1 mM de MgCl_2 ; 0,1 mM de ZnCl_2 ; 1 mM de espermidina; 0,17 U de fosfatase alcalina - CIAP (0,01 U/pmol de extremidades 5') (Promega) e água ultra-pura até completar um volume de 50 μl . A reação foi incubada durante 15 min a 37 °C seguida de 15 min a 56

°C. Após, foi adicionada uma nova alíquota de 0,17 U de CIAP e a amostra foi submetida a uma nova incubação, como a anterior. A reação foi finalizada pela adição de 300 µl de tampão de parada da CIAP [10 mM de Tris-HCl (pH 7,5); 200 mM de NaCl, 1 mM de EDTA e 0,5% de SDS]. O plasmídeo foi então purificado através do “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega), seguindo as orientações do fabricante.

A quantificação do plasmídeo foi estimada comparando-o a um padrão de DNA (λ -DNA/*Hind* III fragments, Gibco BRL) separados por eletroforese em gel de agarose (Gibco BRL) a 0,6% contendo tampão TBE 1X [Tris (90 mM, pH 8,3); ácido bórico (90 mM); EDTA (2 mM)]. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg.ml⁻¹), fotografado e analisado através do sistema de fotodocumentação “Electrophoresis Documentation and Analysis System 120” (Kodak Digital Science 1D). A concentração de cDNAs foi estimada a partir do RNA total.

Na reação de ligação dos cDNAs digeridos no plasmídeo, foi usada uma razão molar entre o vetor e o inserto de aproximadamente 1:3. A reação foi composta de 37 ng de cDNA digerido; 140 ng do plasmídeo digerido e desfosforilado, 2 U de T4 DNA ligase (Promega); 30 mM de Tris-HCl (pH 7,8); 10 mM de MgCl₂; 10 mM de DTT; 1 mM de ATP e água ultra-pura até completar um volume de 17,5 µl. A reação foi incubada durante 16 h a 16 °C e em seguida incubada durante 10 min a 70 °C para inativar a enzima.

Uma segunda clonagem foi feita com o produto da RT-PCR (MV007 3', item 3.1.10). O fragmento amplificado foi ligado ao plasmídeo pCR 4-TOPO, pertencente ao kit “TOPO TA Cloning for Sequencing” (Invitrogen), baseado nas instruções do fabricante. A reação se constituiu de 4 µl da reação de RT-PCR, 1

μl de solução contendo 300 mM de NaCl e 15 mM de MgCl_2 , além de 1 μl do plasmídeo (10 ng). A reação foi incubada durante 10 min à temperatura ambiente, seguida de 10 min no gelo.

Um lote de células de *E. coli* (linhagem XL-1) eletro-competentes foi previamente preparado conforme o protocolo do guia de aplicação e instruções de operação do eletroporador Micropulser (Bio-Rad). A transformação foi realizada por eletroporação, seguindo as orientações do fabricante. Incubou-se uma alíquota de 40 μl de células eletro-competentes durante 25 min no gelo. A seguir, foram adicionados 2 μl da reação de ligação entre pLITMUS 38i e cDNAs à alíquota. A mistura ficou no gelo por mais 1 min, sendo em seguida transferida para uma cubeta com 0,1 cm de abertura entre eletrodos (Gene Pulser cuvette, Bio-Rad). Aplicou-se um pulso de 1,8 kV e imediatamente adicionou-se 1 ml de meio LB líquido (Apêndice 1) estéril. As células foram transferidas para um tubo de ensaio esterilizado e incubadas durante 1 h a 37 °C sob rotação de 225 rpm. Após, 50 μl da cultura foram espalhados em placas de Petri contendo meio LB acrescido dos antibióticos tetraciclina (15 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) e ampicilina (50 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) e de 4 μl IPTG (200 $\text{mg}.\text{ml}^{-1}$) e 40 μl de X-gal (20 $\text{mg}.\text{ml}^{-1}$). Os 950 μl restantes da cultura foram centrifugados durante 10 s a 13.000 x *g*. As células precipitadas foram ressuspendidas em 50 μl de LB e espalhadas em uma nova placa de Petri, conforme o passo anterior. As placas foram incubadas durante 18 h a 37 °C.

O produto da ligação entre pCR 4-TOPO e MV007 3' foi introduzido em *E. coli* (linhagem XL-1) por eletroporação, conforme os procedimentos descritos anteriormente, exceto pelos antibióticos (foram utilizados 50 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de canamicina) e pela ausência de IPTG e X-gal.

As colônias de *E. coli* da biblioteca de cDNAs foram selecionadas pela coloração branca nas placas de Petri contendo IPTG e X-Gal. As colônias de *E. coli* transformadas com o produto da ligação entre pCR 4-TOPO e MV007 3' foram selecionadas através da PCR descrita no item 3.1.10.

Os plasmídeos dessas bactérias foram extraídos segundo Aragão & Rech (1998). Cada colônia foi transferida para 3 ml de meio LB líquido acrescido de tetraciclina ($15 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) e ampicilina ($50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) (para as colônias da biblioteca de cDNAs) ou de canamicina ($50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) (para as colônias transformadas com pCR4-TOPO-MV007 3') e incubadas durante 16 h a 37°C sob rotação de 250 rpm. As células foram coletadas por centrifugação a $3.400 \times g$ durante 5 min e após foram ressuspendidas em 200 μl de solução P1 [RNase A ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$); Tris-HCl (50 mM, pH 8,0); EDTA (10 mM)], seguida de adição de 200 μl da solução P2 [NaOH (200 mM); SDS (1%)]. O tubo de microcentrífuga contendo as células foi agitado suavemente para uma homogeneização completa e formação de uma solução viscosa indicando lise celular. Após, foram adicionados 200 μl da solução P3 [Acetato de Potássio (3 M, pH 5,5)]. O conteúdo foi novamente homogeneizado e submetido a uma centrifugação de $16.000 \times g$ durante 10 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde se adicionou igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v:v). O material foi agitado vigorosamente durante 1 min e logo centrifugado durante 2 min a $16.000 \times g$. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo para a precipitação dos plasmídeos, através da adição de igual volume de isopropanol e 10% do volume de acetato de sódio a 3 M (pH 5,2) e incubação durante 2 h a -20°C . A seguir, o material foi centrifugado a $16.000 \times g$ durante 15 min. O precipitado obtido foi lavado com 1ml de etanol

70% e ressuspenso em 30 μ l de água ultra-pura. A quantidade de plasmídeo foi estimada por leitura em espectrofotômetro a 260 nm (SmartSpec Plus, Bio-Rad).

3.1.8. Macroarranjo de cDNAs

Uma alíquota de 2,3 μ l de cada plasmídeo da biblioteca de cDNAs foi aplicada em um pedaço de membrana de nylon carregada positivamente [Hybond-N+ (Amersam Biosciences)] utilizando uma micropipeta. Três membranas (repetições) foram produzidas por este processo. Os plasmídeos foram fixados às membranas conforme a recomendação do fabricante: incubação por 2 h a 80 °C.

As sondas foram sintetizadas a partir do RNA total extraído de 3 materiais, 2 contendo RNAs de RSNV [plantas do cultivar BR IRGA 409 infectadas com RSNV (ensaio biológico) e o vírus purificado parcialmente] e um sem RNA de RSNV [plantas do cultivar BR IRGA 409 não infectadas com RSNV (ensaio biológico)]. Um nucleotídeo marcado com fluoróforo (Fluoresceína-11-dUTP, Amersham Pharmacia Biotech) foi incorporado à primeira fita de cDNA através da transcrição reversa do RNA utilizando o “Thermoscript RT-PCR System” (Invitrogen). A reação foi realizada nas mesmas condições utilizadas na síntese da primeira fita de cDNA da biblioteca de cDNAs (item 3.1.4.), exceto pela quantidade de RNA total (27 μ g de RNA das plantas do cultivar BR IRGA 409 com ou sem RSNV e 1,7 μ g de RNA do vírus purificado parcialmente) e pela adição de 242 pmoles de FluoroGreen (0,11 mM na concentração final).

Após a reação de RT, o cDNA de fita simples (ss cDNA) foi purificado através do “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega). Todo ss

cDNA recuperado foi utilizado como molde para a marcação da segunda fita de cDNA, através do kit “Gene Images Random Prime Labelling module” (Amersham Biosciences), baseada nas recomendações do fabricante. A reação foi constituída de 34 μ l do ss cDNA recuperado, 5 U do fragmento grande da enzima DNA polimerase I (Klenow), 10 μ l de mistura de nucleotídeos (fluoresceína-11-dUTP, dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 5 μ l dos oligonucleotídeos iniciadores nonâmeros randômicos, completando um volume de 50 μ l. A mistura foi incubada durante 2 h a 37 °C. A reação foi finalizada com a adição de EDTA (concentração final de 20 mM).

A hibridização e a detecção foram realizadas com a utilização do kit “Gene Images CDP-Star Detection module” (Amersham Biosciences). Cada uma das 3 membranas foi colocada em contato com a solução de pré-hibridização [SSC 5X (75 mM de citrato de sódio, 0,75 M de NaCl); 5% de líquido de bloqueio; 0,1% de SDS] durante 2 h a 62 (\pm 2) °C, sob rotação de 4 rpm. Todas etapas de hibridização e lavagens foram realizadas em forno de hibridização (Hybridization oven/shaker, Amersham Biosciences). As sondas foram desnaturadas durante 5 min a 100 °C, cada uma colocada no líquido de pré-hibridização. Cada líquido de pré-hibridização contendo uma sonda (Líquido de hibridização) foi colocado em contato com uma membrana e incubado durante aproximadamente 16 h a 62 (\pm 2) °C, sob rotação de 4 rpm para a hibridização. Após, a membrana foi lavada 2 vezes por 15 min a 62 (\pm 2) °C, sob rotação de 5 rpm, com a solução de lavagem I [SSC 2X (30 mM de citrato de sódio e 0,30 M de NaCl) e 0,1% de SDS], e 2 vezes por 15 min a 62 (\pm 2) °C, sob rotação de 5 rpm, com a solução de lavagem II [SSC 1X (15 mM de citrato de sódio e 0,15 M de NaCl) e 0,1% de SDS]. Após, cada

membrana foi colocada em 50 ml de solução de bloqueio [10% de líquido de bloqueio (Amersham Biosciences) em tampão A (100 mM de Tris-HCl (pH 9,5); 300 mM de NaCl)] previamente esterilizado, durante 1 h à temperatura ambiente, sob rotação de 4 rpm. Em seguida, cada membrana foi imersa em 30 ml de tampão A contendo 0,5% de Albumina de Soro Bovina (BSA) e 0,02% de conjugado anti-fluoresceína/fosfatase alcalina (Amersham Biosciences) e incubada durante 1 h à temperatura ambiente, sob rotação de 4 rpm. As membranas foram lavadas 3 vezes, durante 10 min à temperatura ambiente, com 200 ml de tampão A contendo 0,3% de Tween 20, e uma vez apenas com 200 ml de tampão A. Para a detecção do sinal, cada membrana foi coberta com 1,5 ml do líquido de detecção (CDP-Star detection reagent, Amersham Biosciences), que contém dioxetano, substrato da fosfatase alcalina, e incubada durante 5 min à temperatura ambiente. Após, o excesso de líquido foi retirado e as membranas foram envolvidas por filme de PVC. O processo de exposição e revelação foi realizado no escuro. O filme de revelação, Kodak diagnostic film X-Omat XK1 (Kodak), foi exposto às membranas durante 1 h. A revelação do filme foi realizada com a imersão em solução reveladora (GBX, Kodak) durante 30 s, seguida de imersão durante 5 s em água destilada, 45 s em solução fixadora (GBX, Kodak) e 5 s em água destilada. O filme foi fotografado utilizando-se o sistema de fotodocumentação "Electrophoresis Documentation and Analysis System 120" (Kodak Digital Science 1D).

3.1.9. Seqüenciamento

Alguns dos clones da biblioteca de cDNAs que hibridizaram seletivamente

com sondas contendo seqüências de RSNV e o produto MV007 3' ligado em pCR4-TOPO foram seqüenciados no Laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando-se o seqüenciador automático "ABI-PRISM 3100 Genetic analyzer" armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Os plasmídeos (100 ng) foram marcados utilizando 4,5 pmoles do primer PUC/M13 FOR (5' CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC 3') ou do primer PUC/M13 REV (5' TCACACAGGAAACAGCTATGAC 3') e 2 µl do reagente "BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100" (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µl. As reações de marcação foram realizadas em termociclador "GeneAmp PCR System 9700" (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 s, 55 °C por 5 s e 60 °C por 4 min. Depois de marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol (1:1, v:v) e lavagem com etanol 70%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µl de formamida, desnaturados a 95 °C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no seqüenciador automático. Os dados do seqüenciamento foram coletados utilizando-se o programa "Data Collection v1.0.1" (Applied Biosystems).

Os eletroferogramas das seqüências de nucleotídeos obtidos foram manipulados através do programa "Chromas Lite" (Technelysium Pty Ltd) para a obtenção das seqüências em formato FASTA. Inicialmente, as seqüências foram submetidas ao programa VecScreen [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>] (Altschul et al., 1997)] para eliminar as regiões pertencentes ao plasmídeo. Em seguida, a região referente aos insertos foi comparada às

seqüências de nucleotídeos, de proteínas e de domínios conservados de proteínas das bases de dados do GenBank utilizando os programas BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) para encontrar regiões de similaridade local entre as seqüências. Os programas utilizados foram o Blastn, para comparação nucleotídeo-nucleotídeo, Blastx para comparação da seqüência traduzida-proteína (Altschul et al., 1997) e rps-Blast para encontrar domínios de proteínas (Marchler-Bauer & Bryant, 2004). As seqüências deduzidas de aminoácidos, que foram submetidas ao programa rps-Blast, foram obtidas através de um programa que produz 6 possíveis leituras de tradução da proteína [<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu> (Worley et al., 1998)]. As seqüências do mesmo plasmídeo, obtidas a partir do uso de PUC/M13 FOR e PUC/M13 REV (opostas), foram comparadas entre si, através do programa de alinhamento de múltiplas seqüências ClustalW 1.8 [<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu> (Jeanmougin et al., 1998)] para a montagem de uma seqüência consenso.

3.1.10. Amplificações de DNA e RNA

Dois oligonucleotídeos iniciadores, RSNV7-1 (5' CGAAGCACGTTAGCAA GTTGCTC 3') e RSNV7-2 (5' CGGAATTCCCGTTTGGAAAAGG 3'), foram sintetizados de modo a serem complementares às extremidades de um clone (MV007, que possivelmente contém um fragmento do genoma de RSNV) e orientados para amplificar sua região interna.

O RNA total de folhas e raízes de plantas do cultivar EPAGRI 108 infectadas com RSNV foram submetidos a uma RT-PCR conforme a reação descrita por Murphy & Taiz (1995). A reação foi composta de 250 ng de RNA total;

320 μM de cada dNTP; 50 mM de Tris-HCl (pH 8,3); 75 mM de KCl; 3 mM de MgCl_2 ; 11,6 mM de DTT; 1,32 μM de oligonucleotídeo iniciador RSNV7-1, 32 U de enzima transcriptase reversa MMLV (Amersham Biosciences) e água ultra-pura até completar 5 μl . A reação foi incubada durante 1 h a 37 °C. O cDNA resultante foi utilizado como molde na PCR (50 μl), que foi constituída da reação de RT (10%, v/v); 200 μM de cada dNTP; 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl_2 ; 0,8 μM de cada oligonucleotídeo iniciador, RSNV7-1 e RSNV7-2, e 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). A reação foi incubada no termociclador PTC-100 (MJ Research) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 10 min, 30 ciclos constituídos de desnaturação a 94 °C por 1 min, pareamento a 57 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1 min, seguido de uma extensão final a 72 °C por 5 min. O mesmo procedimento foi realizado substituindo os oligonucleotídeos iniciadores RSNV7-1 e RSNV7-2 por ACT-R (5' AGGAAGCTCGTAGCTCTTCTC 3') e ACT-F (5' GATCTGGCATCACACCTTCTA C 3'), que são baseados no RNA mensageiro (mRNA) de uma actina de *Oryza sativa* (RAc1) [número de acesso no GenBank: X16280 (McElroy et al., 1990)].

A região 3' da fita do RNA que deu origem ao clone MV007 foi amplificada através da RT-PCR de um RNA total de arroz contendo RSNV (item 3.1.1.), baseada na RT-PCR descrita por Murphy & Taiz (1995). O RNA total (330 ng) foi transcrito reversamente na reação composta de 320 μM de cada dNTP; 50 mM de Tris-HCl (pH 8,3); 75 mM de KCl; 3 mM de MgCl_2 ; 11,6 mM de DTT; 1,32 μM de oligonucleotídeo iniciador antisense OligodT/NOT (5' GCGGCCGCTTTTTTTTTT TTTTTTTT 3'); 32 U de enzima transcriptase reversa MMLV (Amersham Biosciences) e água ultra-pura até completar 5 μl . A reação foi incubada durante 1

h a 37 °C. O cDNA resultante foi utilizado como molde na PCR (50 µl), que foi constituída da reação de RT (10%, v/v); 200 µM de cada dNTP; 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM de KCl; 2 mM de MgCl₂; 0,8 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, senso (RSNV7-2) e antisenso (OligodT/NOT), e 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). A reação foi incubada no termociclador PTC-100 (MJ Research) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 10 min, 35 ciclos constituídos de desnaturação a 94 °C por 1 min, pareamento a 50 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 3 min, seguido de uma extensão final a 72 °C por 10 min.

As colônias obtidas da transformação de *E. coli* com MV007 3' ligado a pCR4-topo foram submetidas a uma PCR com os oligonucleotídeos iniciadores baseados na região M13 do plasmídeo, utilizados para confirmação da clonagem do fragmento esperado. Utilizando-se um palito, cada colônia de bactéria transformada foi tocada e o material aderido no palito foi colocado em 20 µl de solução contendo 200 µM de cada dNTP; 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen); 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM KCl; 2,0 mM de MgCl₂; 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, PUC/M13 FOR e PUC/M13 REV. A PCR foi incubada no termociclador PTC-100 (MJ Research) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 10 min, 30 ciclos constituídos de desnaturação a 94 °C por 1 min, pareamento a 50 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min e 45 s, seguidos de uma extensão final a 72 °C por 5 min.

Três DNAs genômicos de arroz, de plantas dos cultivares BR-IRGA 409, IRGA 417 e EPAGRI 108 [banco de DNAs e RNAs do Laboratório de Fitopatologia Molecular (LFM/UFRGS)] foram submetidos a uma PCR com os

oligonucleotídeos iniciadores RSNV7-1 e RSNV7-2. A reação foi constituída de 200 ng de DNA; 200 μ M de cada dNTP; 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM de KCl; 2 mM de $MgCl_2$; 0,8 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador; e 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). A reação foi incubada no termociclador PTC-100 (MJ Research) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 10 min, 30 ciclos constituídos de desnaturação a 94 °C por 30 s, pareamento a 57 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1 min, seguido de uma extensão final a 72 °C por 5 min. O mesmo procedimento foi realizado substituindo os oligonucleotídeos iniciadores RSNV7-1 e RSNV7-2 por ACT-R e ACT-F.

Os produtos das RT-PCRs e PCRs foram separados por eletroforese em gel de agarose (Gibco BRL) a 1,5% (PCR) ou a 0,6% (RT-PCRs) contendo tampão TBE 1X [90 mM de Tris-HCl (pH 8,3); 90 mM de ácido bórico; 2 mM de EDTA]. O gel foi corado com brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), fotografado e analisado através do sistema de fotodocumentação “Electrophoresis Documentation and Analysis System 120” (Kodak Digital Science 1D).

3.2. Detecção de RSNV através de RT-PCR

3.2.1. Material vegetal

Plantas de arroz com ou sem sintomas do enrolamento foram coletadas em propriedades localizadas nas seguintes regiões de produção de arroz do RS listadas pelo Instituto Riograndense do Arroz (IRGA): Depressão Central, Fronteira Oeste e Planície Costeira Externa (Figura 2). As propriedades foram escolhidas com base nas informações sobre a ocorrência do enrolamento do

arroz fornecidas pelos Núcleos de Assistência Técnica e Extensão Rural (NATE's) do IRGA.

Amostra	Local	Cultivar	Observações sobre a área amostrada
1A	Município de Manoel Viana. Rodovia RS 377	IRGA 422CL	Alta incidência da doença na safra 2004/05.
1B			
2A			
2B			
3A			Alta incidência da doença na safra 2004/05.
3B			
4A			
4B			
5A	Município de São Borja. Rodovia BR 287	IRGA 422CL	Doença observada desde a safra 2002/03.
5B			
6A			
6B			
7A			Doença observada desde a safra 2002/03.
7B			
8A			
8B			
9A			Primeiro ano de cultivo com arroz.
9B			
10A			
10B			
11A	Município de São Miguel das Missões, localidade de Mato Grande	IRGA 422CL	
11B			
12A			
12B			
13A		IRGA 417	
13B			
14A			
14B			
15A	Município de Dona Francisca	IRGA 422CL	Área com histórico de ocorrência da doença.
15B			
16A			
16B		IRGA 417	
17A			
17B			
18A	Área com histórico de ocorrência da doença.		
18B			
19A	Município de Cachoeirinha. Estação Experimental do Arroz, IRGA.	IRGA 417	
19B			
20		-	

FIGURA 2. Identificação das amostras de plantas de arroz coletadas no Estado do RS, safra 2005/06. UFRGS, RS, 2005.

Cada amostra foi analisada quanto à presença dos sintomas característicos da doença: a ocorrência de listras necróticas e distorção das folhas. Após o transporte para o laboratório, as amostras foram analisadas quanto à presença de *P. graminis*. Aproximadamente 20% das raízes de cada amostra foram mantidas durante 10 min a 95 °C em solução de azul de tripan a 0,1%. Em seguida, as raízes foram lavadas com água destilada e incubadas durante 10 min a 95 °C em água destilada. Até 6 fragmentos de raízes (2-4 cm) foram analisados sob microscópio óptico para a observação de cistosoros de *P. graminis*.

3.2.2. Extração de RNA

O RNA total das plantas coletadas foi extraído segundo o método de Bugos et al. (1995), conforme descrito anteriormente (item 3.1.3.) utilizando o tecido do colo da planta como fonte. Algumas plantas apresentando sintomas da doença foram separadas em perfilhos sem sintomas, folhas sem sintomas de perfilhos com sintomas, folhas com distorção e folhas com listras necróticas. Estas partes também foram submetidas à extração de RNA. A concentração de RNA total foi estimada por leitura em espectrofotômetro a 260 nm (SmartSpec Plus, Bio-Rad). O RNA foi armazenado a -20 °C.

3.2.3. RT-PCR

Os RNAs totais de plantas dos cultivares BR-IRGA 409, IRGA 417 e EPAGRI 108, infectadas e não infectadas com RSNV, [(item 3.1.3.) e RNAs do banco de DNAs e RNAs do LFM/UFRGS] foram submetidos a uma RT-PCR

conforme o procedimento realizado com RNA total de folhas e raízes, exposto no item 3.1.10.

Outra RT-PCR foi realizada com essas mesmas condições, exceto pela utilização apenas dos oligonucleotídeos iniciadores RSNV7-1 e RSNV7-2 e da quantidade de RNA total, de 250 ng, ou 25 ng, ou 2,5 ng ou 0 ng (controle negativo). O RNA utilizado foi extraído de plantas do cultivar IRGA 422CL infectadas com RSNV (item 3.2.1, amostra 2b). Os produtos das RT-PCRs foram separados por eletroforese, conforme descrito no 3.1.10, com 1,5% de agarose.

Uma terceira RT-PCR foi realizada com a utilização simultânea de 2 pares de oligonucleotídeos iniciadores, com objetivo de co-amplificar os alvos de RSNV e actina. Os RNAs obtidos (item 3.2.2.) mais 2 RNAs-controle, RNA de plantas do cultivar EPAGRI 108 com RSNV e RNA de plantas do cultivar BR IRGA 409 sem RSNV (item 3.1.3.), foram transcritos reversamente numa reação composta de 250 ng de RNA total; 320 μ M de cada dNTP; 50 mM de Tris-HCl (pH 8,3); 75 mM de KCl; 3 mM de $MgCl_2$; 11,6 mM de DTT; 1,32 μ M de oligonucleotídeo iniciador OligodT₍₁₆₎ (5' TTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'); 32 U de enzima transcriptase reversa MMLV (Amersham Biosciences) e água ultra-pura até completar 3 μ l. A reação foi incubada durante 1 h a 37 °C. O cDNA resultante foi utilizado como molde na PCR (30 μ l), que foi constituída da reação de RT (10%, v/v); 200 μ M de cada dNTP; 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM de KCl; 2 mM de $MgCl_2$; 0,8 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador, RSNV7-1, RSNV7-2, ACT-R e ACT-F, e 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). A reação foi incubada no termociclador PTC-100 (MJ Research) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 10 min, 30 ciclos constituídos de desnaturação a 94 °C por 1 min, pareamento a

50 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1 min, seguido de uma extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos das RT-PCRs foram separados por eletroforese, conforme descrito no item 3.1.10, com 1,5% de agarose.

3.2.4. Análise estatística da detecção através da RT-PCR

Os resultados obtidos com a detecção de RSNV através da RT-PCR com co-amplificação de actina foram comparados aos resultados da avaliação da presença de sintomas nas folhas e de cistosoros nas raízes (item 3.2.1.) através do teste de qui-quadrado (χ^2) de associação, a um nível de 5% de probabilidade de erro.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento parcial do genoma de RSNV

Apesar do longo período que transcorreu desde o primeiro registro de ocorrência de RSNV em arroz por Louvel & Bidaux (1977), o seqüenciamento total, ou mesmo parcial, do genoma de RSNV ainda não foi realizado. Conseqüentemente, o conhecimento sobre os produtos gênicos de RSNV e a similaridade de seu genoma com o de outros vírus é inexistente. Também são escassos os estudos sobre a doença causada por RSNV em arroz.

No presente trabalho, 3 tentativas foram empreendidas a fim de isolar seqüências do genoma de RSNV. A primeira estratégia foi a da purificação de dsRNAs, intermediários da replicação viral que podem servir de molde para a síntese de cDNAs. Estes, por sua vez, podem ser clonados e seqüenciados. Embora essa estratégia tenha sido empregada com sucesso no isolamento de alguns vírus, como, por exemplo, *Cherry virus A* [CVA (Jelkmann, 1995)] e um isolado chinês de Tobacco bushy top virus [TBTV (Mo et al., 2003)], no presente trabalho não houve sucesso com a utilização desse procedimento (dados não mostrados). Talvez, no caso de RSNV a concentração de dsRNA nos tecidos usados para extração não foi suficiente para obter cDNAs em quantidade suficiente para a clonagem.

A segunda estratégia foi baseada na hipótese da conservação entre os genomas de vírus que pertencem a determinados grupos. Como exemplo disto, Nemchinov et al. (2004) seqüenciaram o genoma completo de *Beet mosaic virus* (BtMV) a partir de cDNAs do vírus produzidos através de RT-PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores baseados em regiões conservadas de membros do gênero *Potyvirus*. No presente trabalho foram desenvolvidos oligonucleotídeos iniciadores baseados em regiões conservadas da RNA polimerase e do capsídeo de 2 *Benyvirus*: BNYVV e BSBMV. RSNV foi reclassificado por Morales et al. (1999b), passando a ser considerado um membro do gênero *Benyvirus*. Portanto, o uso de oligonucleotídeos iniciadores baseados em genes codificantes de produtos gênicos que, normalmente, são estruturalmente conservados dentro de grupos virais, possivelmente amplificaria fragmentos do genoma de RSNV através da RT-PCR. Os resultados indicaram a ausência de fragmentos correspondentes em RSNV (dados não mostrados). É possível que RSNV seja estruturalmente distinto dos demais *Benyvirus*. Por outro lado, mesmo que seja estruturalmente similar, poucas diferenças na seqüência de nucleotídeos entre RSNV e os outros *Benyvirus*, nas regiões escolhidas para desenho dos oligonucleotídeos iniciadores, poderiam explicar a ausência de produtos específicos amplificados pela RT-PCR.

Em virtude dessas dificuldades, foi adotada a estratégia de análise da expressão diferencial de genes. Considerou-se para tanto que os mRNAs de RSNV possuem uma cauda de poli-A na extremidade 3' da fita (Morales et al., 1999b) e que os genes expressados a partir do genoma viral são acumulados em

grande quantidade na célula vegetal de plantas infectadas, mas são ausentes em plantas sem o vírus.

Desse modo, construiu-se uma biblioteca de cDNAs a partir do RNA de fita simples (poli-A) de RSNV purificado parcialmente. Foram obtidos 86 clones nessa biblioteca. Posteriormente, a biblioteca foi submetida à hibridização com 3 sondas distintas: a primeira foi sintetizada a partir de RNA de plantas de arroz infectadas com RSNV; a segunda sintetizada a partir de RNA de plantas do mesmo cultivar, porém não infectadas com RSNV; e a terceira a partir de RNA de RSNV parcialmente purificado. Os resultados da hibridização revelaram que 39 clones hibridizaram-se com as sondas sintetizadas a partir de RNA de plantas contendo RSNV e do vírus purificado parcialmente, mas não com sondas sintetizada a partir de plantas não infectadas com RSNV (Figura 3, Apêndice 2). Doze desses clones foram seqüenciados (Apêndice 3) e comparados às seqüências depositadas no banco de genes (GenBank) a fim de identificar similaridades com seqüências conhecidas (Apêndice 4).

A análise dos clones através da hibridização não permite distinguir inequivocamente se os clones são originados de mRNAs de arroz expressados em resposta a RSNV ou ao seu vetor (*P. graminis*), de mRNAs de *P. graminis*, ou ainda de mRNAs de RSNV. Três clones seqüenciados, MV006, MV007 e MV140, correspondem a cDNAs que não possuem similaridade a nenhuma seqüência depositada no GenBank. O arroz apresenta mais de 95% do genoma do grupo *indica* (Yu et al., 2001) e 95% do genoma do grupo *japonica* (INTERNATIONAL RICE GENOME SEQUENCING PROJECT - IRGSP, 2005) já seqüenciado, além de diversas bibliotecas de EST's produzidas sob diversas condições

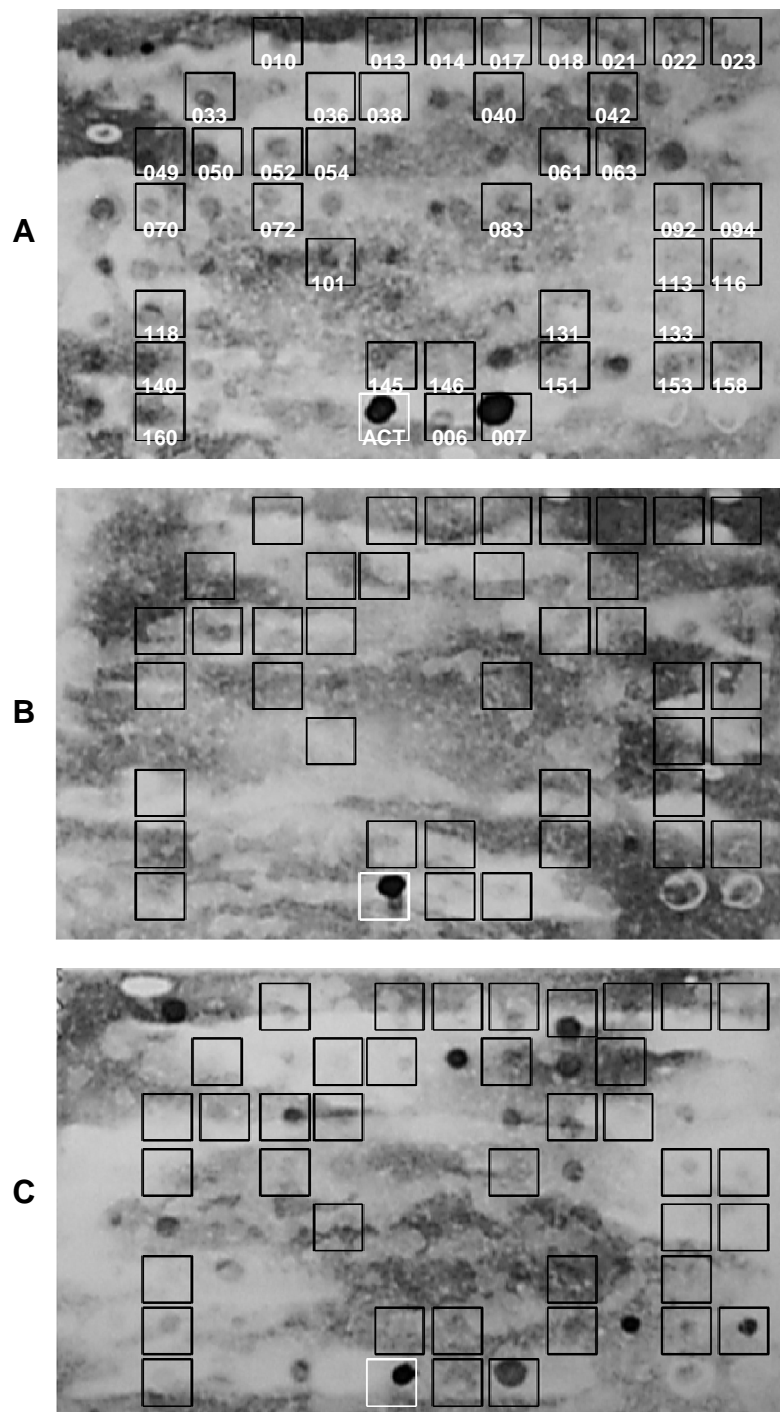


FIGURA 3. Macroarranjos de clones da biblioteca de cDNAs. A) Hibridização com sondas sintetizadas a partir de RNA de plantas do cultivar BR-IRGA 409 infectadas com RSNV; B) Hibridização com sondas sintetizadas a partir de RNA de plantas do cultivar BR-IRGA 409 não infectadas com RSNV; C) Hibridização com sondas sintetizadas a partir de RNA de RSNV purificado parcialmente. As caixas pretas (006 a 160) indicam os clones que hibridizaram com as sondas contendo RSNV (A e C). A caixa branca (ACT) indica o cDNA de actina, controle positivo. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005.

(estresses bióticos e abióticos, estádios fenológicos, etc.) depositadas no GenBank. Portanto, dificilmente os cDNAs analisados corresponderiam a seqüências do genoma de arroz.

Entre os 3 clones que possivelmente contém seqüências de RSNV, MV007 foi o que hibridizou com uma maior intensidade de sinal (Figura 3), possivelmente resultado de acumulação de RNA viral em maior abundância durante a etapa de replicação do vírus presente no tecido coletado. Em função disso, esse clone foi usado como referência para avaliar experimentalmente se o mesmo poderia ser originado de plantas de arroz ou de *P. graminis*. Essa análise foi feita através de PCR e RT-PCR utilizando 2 oligonucleotídeos iniciadores, RSNV7-1 e RSNV7-2, que foram desenvolvidos com base na seqüência de MV007 para gerar um fragmento de 194 pb. Os resultados indicaram ausência de produtos da PCR utilizando DNA genômico de arroz (Figura 4). A possibilidade de que MV007 seja originado a partir de um mRNA de *P. graminis* pode ser descartada em função da amplificação do fragmento esperado, através da RT-PCR, a partir de RNA extraído de folhas de plantas infectadas (Figura 5). As espécies do gênero *Polymyxa* são todas parasitas obrigatórios intracelulares e específicos de raízes (Delfosse et al., 2000). Desse modo, tanto os resultados de análise de similaridade com o banco de genes como os resultados da análise molecular indicam que é altamente provável que MV007 represente uma seqüência originada do genoma de RSNV.

Através de RT-PCR combinando o oligonucleotídeo iniciador senso, RSNV7-2, e outro oligonucleotídeo iniciador complementar à cauda de poli-A,

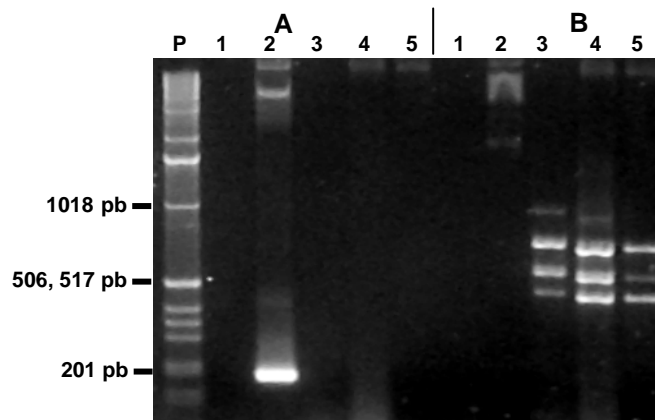


FIGURA 4. Eletroforese dos produtos amplificados pela PCR a partir de DNA genômico de arroz. A: Oligonucleotídeos iniciadores específicos para MV007; B: oligonucleotídeos iniciadores específicos para actina; P: padrão de massa molecular de DNA; 1: controle negativo (água); 2: Controle positivo (Clone MV007); 3-5: DNA de plantas dos cultivares de arroz; 3: EPAGRI 108; 4: BR IRGA 409; 5: IRGA 417. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005.

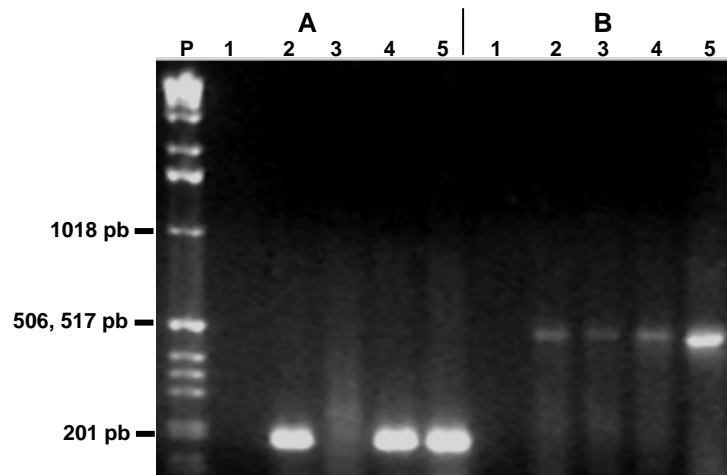


FIGURA 5. Eletroforese dos produtos amplificados pela RT-PCR a partir de RNA de raízes e folhas de plantas de arroz infectadas com RSNV. A: Oligonucleotídeos iniciadores específicos para MV007; B: oligonucleotídeos iniciadores específicos para actina; P: padrão de massa molecular de DNA; 1: controle negativo da reação (água); 2: Controle positivo para RSNV (RNA de plantas do cultivar IRGA 417 infectadas com RSNV); 3: Controle negativo para RSNV (RNA de plantas do cultivar BR IRGA 409 não infectadas com RSNV); 4: RNA de raízes de plantas do cultivar EPAGRI 108 infectadas com RSNV; 5: RNA de folhas de plantas do cultivar EPAGRI 108 infectadas com RSNV. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005.

OligodT/NOT, foi isolada a região 3' da fita correspondente ao RNA de origem do clone MV007 (Figura 6). Essa região, denominada MV007 3', possui 957 nucleotídeos (nt) e uma cauda de poli-A (Figura 7). O seqüenciamento desse fragmento maior (MV007 3'), assim como o fragmento menor (MV007), não permitiu encontrar similaridade com qualquer outra seqüência conhecida ou mesmo indicar uma possível função do produto viral.

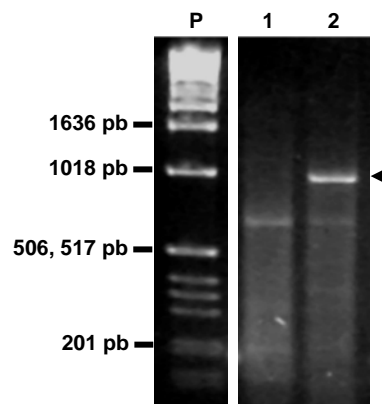


FIGURA 6. Eletroforese dos produtos amplificados pela RT-PCR usando os oligonucleotídeos iniciadores oligodT/NOT e RSNV7-2. P: padrão de massa molecular de DNA; 1: RNA de plantas de arroz sem RSNV; 2: RNA de plantas de arroz com RSNV. O produto específico da reação está indicado pela seta (~950pb). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005.

```

1  CTTCGGAATTCCCCGTTTGGAAAAGGAAGCACTGAACTGTAGAACGTGTGCCTCCGAAGAGGCTGTTTCTC
71  GTGATGCGACGAAAAGTTCTGAGGTGTCAGAGGGTTTCGACTTCTGTCCCGACTCGCCAACAGGTTTTGA
141 TATTAAGATGTCCAATTCTCCGGAAGAGGCATTTGAGCAACTTGCTAACGTGCTTCGTAAGGCCCGTAGG
211 ATTCTCGAGCGACGTCATAAATACATACGGCGTTTGGCGAAGAAGGATAGTGGCAGAGCTCTCATGGCAT
281 CTAAGGTCATGGTTTTCGAATCTAAAGGATCAGCTCAATAGTGATATTGCCAAAGGCAAGGCCAATGTTGA
351 AGACTCCGCAGTTGTCTCAGGCAGGTTTATGCCTCTTTGATGGATTGGGGATGTCTGCAGTCGAAGGCCTT
421 GAATCTGTGTCTGAGGTGGGCATACGTCCTCAAAGAATCCCCTCTACGGGAAACTTAAGAGTGAAAAC
491 AAAGGCTAGTTCACGAGCCTCCGACTTGTGCGTTTTACGTGGACACAAAAAGAGACGTGGGCCGTGAAAGT
561 CGGCTCTAACGATGTCCGTGAAAGTCGGGCATATGTGGGTAACGCCACAATAAATTCTGTGTGAGTTACA
631 GAGGTTTGTGATGACATTAATTACCCCTACACATAATTGGATCTTCAAATCCGGTGATGTGATTGACAA
701 CCACGAACTGGTTATATTCAGGTGACGGCCGTAGCTCCAAAGAGATGGTCTACCGCGGTAGGTGTATACC
771 AACCTGATGTAATCAAAGTAATGGGTTCTTTCTTCTGACGGCCGTAGCTCCTTTGGGGATGTCTACCGC
841 GATAGGCTTTGCCCTTAAGATTGGAATGTTGGTTGTGTAACCGGTTGTGGACCGAGTTGTGTGTTGTTGT
911 TGTTAGTGTGATTATAAATATCTGTTAGTCTGTTTATAGACTATAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA(n)
(957 nt + cauda de poli-A)

```

FIGURA 7. Seqüência de nucleotídeos de MV007 3'. A região sublinhada corresponde ao clone MV007; As caixas cinza e preta representam os oligonucleotídeos iniciadores RSNV7-2 e RSNV7-1, respectivamente. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005.

Um resultado relevante na análise da seqüência de MV007 3' é a ausência de similaridade com as seqüências dos outros *Benyvirus* conhecidos, BNYVV e BSBMV, ainda que este fato não seja surpreendente, pois Morales et al. (1999b) encontraram diferenças entre o tamanho dos RNAs 3 e 4 de RSNV e dos RNAs 3 e 4 dos demais *Benyvirus*. Mais ainda, quando comparados os RNAs 3 e RNAs 4 de BSBMV e BNYVV, se verifica que apenas duas regiões pequenas, de 39-50 pb no caso dos RNAs 3 e de 120-140 pb no caso dos RNA 4, apresentam similaridade significativa de nucleotídeos. Esses resultados explicam também porque a RT-PCR com oligonucleotídeos iniciadores baseados em regiões conservadas da RNA polimerase e do capsídeo de BNYVV e BSBMV não amplificaram fragmentos do genoma de RSNV.

4.2. Detecção de RSNV através de RT-PCR

4.2.1. Teste da especificidade da detecção

Com o objetivo de avaliar a especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores RSNV7-1 e RSNV7-2 para RSNV, os RNAs de plantas de 3 cultivares de arroz, infectadas e não infectadas com RSNV, foram submetidos a uma RT-PCR. Verificou-se que o fragmento esperado é amplificado somente a partir de RNA de plantas de arroz infectadas (Figura 8), o que mostra a existência de especificidade do método de detecção. Além disso, a comparação entre esses 2 oligonucleotídeos iniciadores e as seqüências depositadas no GenBank não revelou similaridade significativa com qualquer outra seqüência de outro organismo.

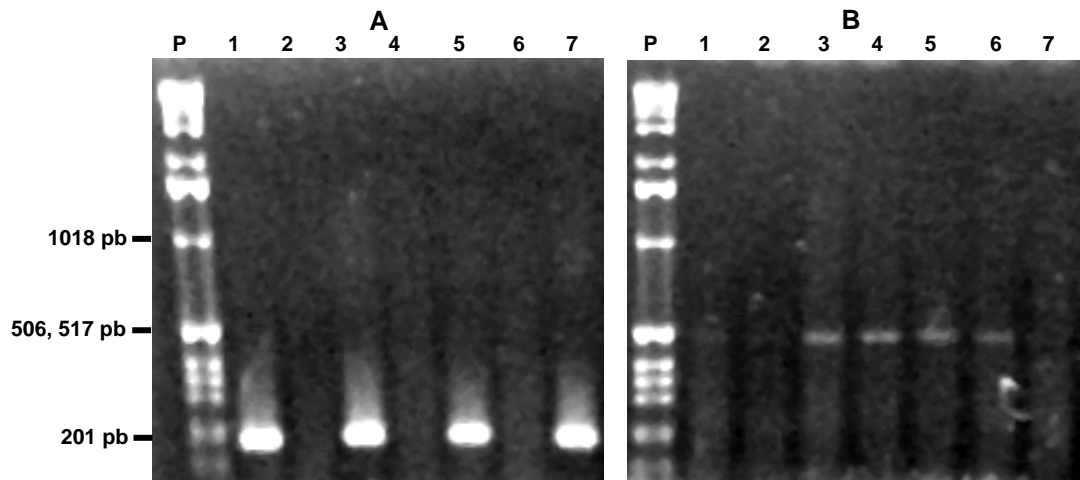


FIGURA 8. Eletroforese dos produtos amplificados pela RT-PCR a partir de RNA de plantas de 3 cultivares de arroz infectadas e não infectadas com RSNV. A: Oligonucleotídeos iniciadores específicos para MV007; B: oligonucleotídeos iniciadores específicos para actina; P: padrão de massa molecular de DNA 1kb; 1, 3 e 5: RNA de plantas infectadas com RSNV; 2, 4 e 6: RNA de plantas não infectadas com RSNV; 1 e 2: cultivar EPAGRI 108; 3 e 4: cultivar BR IRGA 409; 5 e 6: cultivar IRGA 417; 7: RNA de RSNV purificado parcialmente. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005.

4.2.2. Teste da otimização da amostragem

A fim de avaliar as diferentes partes da planta como fonte de RNA viral para a RT-PCR, as seguintes partes foram testadas: perfilhos sem sintomas de plantas com sintomas em outras partes, folhas sem sintomas produzidas em perfilhos com sintomas, folhas com sintoma de distorção e folhas com sintomas de listras necróticas, raízes de plantas com sintomas e parte aérea de plantas com sintomas.

Os sintomas do enrolamento do arroz são observados principalmente na parte aérea e iniciam-se com o aparecimento de listras longitudinais amareladas ou necróticas nas folhas, seguido da distorção das folhas mais jovens ou das panículas. Embora não exista informação sobre o movimento dos vírions de RSNV dentro da planta de arroz, os resultados da detecção de RSNV no presente

estudo são coerentes com essa seqüência de aparecimento de sintomas, já que o vírus é detectado nas folhas mais jovens com distorção (Figura 9), além das raízes, onde ocorre a infecção através de *P. graminis* (Figura 5), mas não é detectado em folhas e perfilhos sem sintomas.

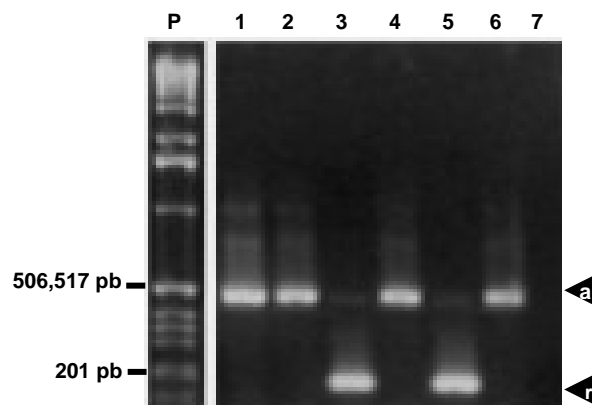


FIGURA 9. Detecção de RSNV através de RT-PCR em diferentes partes da planta infectada. P: padrão de massa molecular de DNA 1 Kb; 1: RNA de perfilho sem sintoma da doença; 2: RNA de folhas sem sintomas de um perfilho com sintomas; 3: RNA de folhas com sintoma de distorção; 4: RNA de folhas com sintoma de listras necróticas; 5: Controle positivo para RSNV (RNA de plantas do cultivar IRGA 417 infectadas com RSNV); 6: Controle negativo para RSNV (RNA de BR IRGA 409 não infectado); 7: Controle negativo para a reação (água); ◄a: Produto amplificado entre ACT-R e ACT-F (~450 pb); ◄r: Produto amplificado entre RSNV7-1 e RSNV7-2 (194 pb). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.

O fato de RSNV não ser detectado em folhas com necrose ainda é difícil de ser esclarecido tendo em vista o pouco conhecimento sobre o vírus. É possível que o RNA alvo dos oligonucleotídeos iniciadores RSNV7-1 e RSNV7-2 não esteja presente, por não ser essencial para a indução de sintomas na parte aérea, assim como ocorre com os produtos dos RNAs 3 e 4 de BNYVV. O RNA 3 deste vírus está relacionado à sua replicação e expressão dos sintomas nas raízes de

beterraba (Tamada et al., 1989; Koenig et al., 1991) enquanto o RNA 4 é importante para a transmissão do vírus via *P. betae* (Tamada & Abe, 1989). Em um trabalho realizado por Koenig et al. (1986), o padrão dos RNAs 1, 2, 3 e 4 de BNYVV isolados das raízes de beterraba de açúcar infectadas de lavouras de vários países foi constante, em contraste com a grande variação do número e do tamanho dos RNAs 3 e 4 encontrados nas folhas de várias espécies inoculadas mecanicamente. Também é possível que o RNA-alvo de RSNV7-1 e RSNV7-2 seja um RNA subgenômico. Nesta hipótese, a menor replicação viral nas folhas com necrose proporcionaria uma concentração viral abaixo do limite inferior de detecção. Estudos sobre o movimento de RSNV dentro da planta ou suas estratégias de replicação, por exemplo, poderão esclarecer essas dúvidas no futuro.

Baseado na analogia de RSNV com BNYVV, a raiz é o órgão mais recomendável para a detecção de RSNV por RT-PCR. Entretanto, os resultados do presente trabalho indicam que a parte aérea, sobretudo o colo da planta, pode servir como fonte mais adequada para a detecção do vírus, já que a sua coleta e manipulação são mais simples que a das raízes.

4.2.3. Teste da sensibilidade da detecção

A sensibilidade da RT-PCR para detectar RSNV foi avaliada utilizando-se uma diluição serial do RNA total de folhas de plantas de arroz infectadas com o vírus. Os resultados indicaram um limite mínimo para a detecção do vírus de 25 ng de RNA total, que foi equivalente a 33 µg de tecido foliar extraído através do método de Bugos et al. (1995) (Figura 10). Ainda não é possível dizer se a RT-

PCR é mais sensível para detectar RSNV em relação a outras técnicas já utilizadas na caracterização do vírus, como o DAS-ELISA (Maciel et al., 2004. No prelo), a ISEM ou o “western blotting” (Morales et al. 1999b), já que este é o primeiro trabalho com ênfase na detecção de RSNV.

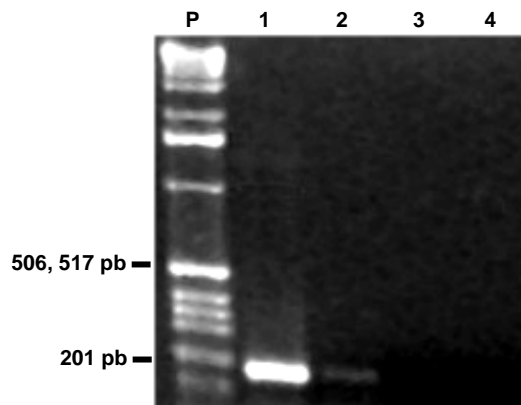


FIGURA 10. Sensibilidade da detecção de RSNV através de RT-PCR. P: padrão de massa molecular de DNA; 1: 250 ng de RNA total de planta infectada com RSNV; 2: 25 ng de RNA total de planta infectada com RSNV; 3: 2,5 ng de RNA total de planta infectada com RSNV; 4: Sem RNA (controle negativo). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.

4.2.4. Avaliação da detecção de RSNV através da RT-PCR

Para dizer se a RT-PCR é adequada para a detecção de RSNV, a técnica foi aplicada a 39 amostras coletadas em 5 municípios do RS, 4 destes com registro de ocorrência de enrolamento do arroz (Dona Francisca, Manoel Viana, São Borja e São Miguel das Missões) e um sem registro (Cachoeirinha, na Estação Experimental do Arroz do IRGA). Os resultados dessa detecção foram comparados aos da detecção indireta do vírus, que é obtida através de procedimentos já estabelecidos para o diagnóstico do enrolamento do arroz. Esse diagnóstico incluiu a observação visual dos sintomas da doença nas folhas e a

observação por microscopia da presença de cistosoros de *P. graminis* em células das raízes.

A detecção de RSNV através de RT-PCR utilizando apenas oligonucleotídeos iniciadores específicos para o vírus poderia gerar dificuldades na interpretação de resultados negativos, uma vez que esses poderiam ocorrer em função da degradação do RNA ou da presença de inibidores da atividade da transcriptase reversa ou da *Taq* DNA polimerase, ao invés da ausência do vírus. A consequência disso são os falsos negativos. Para evitar esse erro, neste trabalho, o mRNA de uma actina de arroz (RAC1) serviu como controle interno para a RT-PCR, através da co-amplificação desse alvo.

A comparação dos resultados da detecção de RSNV através da RT-PCR em que se co-amplificou o alvo de actina (Figura 11) às observações de folhas e raízes (Tabela 2) revela que o método molecular detectou RSNV em todas amostras apresentando sintomas foliares, além de detectar RSNV em 35% das plantas assintomáticas (Figura 12A). A RT-PCR multiplex ainda permitiu distinguir plantas com sintomas, semelhantes àqueles causados por RSNV, causados por outros agentes (Figura 11, Figura 12A). Através do teste de χ^2 de associação, confirma-se a dependência entre os sintomas e a detecção de RSNV ($P = 0,00001$) (Apêndice 5B). Portanto, esse resultado indica que a RT-PCR soluciona a identificação errônea de plantas doentes.

Quando o enrolamento do arroz foi descoberto no RS, postulou-se que tivesse uma causa abiótica. Mesmo atualmente os sintomas ainda são confundidos com injúria causada por herbicidas. Plantas com sintomas

TABELA 2. Sintomatologia, presença de *P. graminis* e detecção de RSNV através de RT-PCR, em amostras coletadas no Estado do RS, safra 2005/06. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.

Amostra	Município	Sintomas foliares ¹		<i>P. graminis</i> ²	RT-PCR ³	
		Distorção	Listras necróticas			
1A	Manoel Viana	-	-	-	-	
1B		-	-	+	-	
2A		+	+	+	++	
2B		+	+	+	++	
3A		+	+	-	+	
3B		+	+	-	++	
4A		+	+	-	++	
4B		-	-	+	+	
5A		São Borja	+	+	-	++
5B			+	+	+	++
6A	-		-	+	-	
6B	-		-	-	-	
7A	-		-	+	-	
7B	-		-	+	-	
8A	+		+	+	++	
8B	+		+	+	++	
9A	-		-	+	+	
9B	-		-	-	-	
10A	São Miguel das Missões	+ ^a	-	-	-	
10B		+ ^a	-	+	-	
11A		+	+	-	+	
11B		+	+	-	+	
12A		-	-	-	+	
12B		-	-	-	+	
13A		+	+	+	+	
13B		-	+	-	+	
14A		-	+ ^b	+	-	
14B		-	-	+	-	
15A	Dona Francisca	+	+	+	+	
15B		+	+	+	+	
16A		-	-	+	+	
16B		-	-	-	+	
17A		+	-	+	+	
17B		+	-	-	+	
18A	+	-	-	+		
18B	-	-	+	-		
19A	Cachoeirinha	-	-	-	-	
19B		-	-	-	-	
20		+ ^a	-	-	-	

¹ -: Ausência de sintoma; +: presença de sintoma.

² -: cistosoros não detectados; +: pelo menos um cistosoro detectado.

³ Detecção através de RT-PCR. -: negativo; +: positivo fraco; ++: positivo forte.

^a Enrolamento não relacionado à doença (Figura 13D).

^b Clorose semelhante à injúria causada por herbicida (Figura 13B).

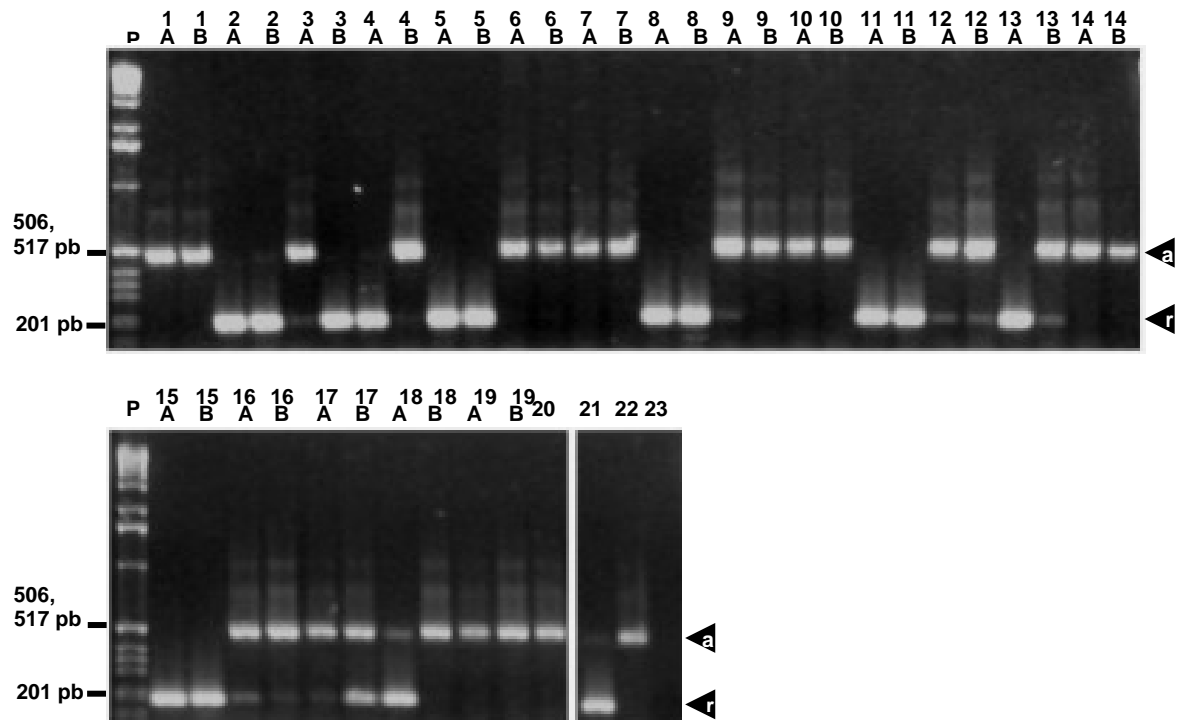


FIGURA 11. Detecção de RSNV através de RT-PCR em amostras coletadas na Depressão Central, Fronteira Oeste e Planície Costeira Externa do Estado do RS, safra 2005/06. P: padrão de massa molecular de DNA; 1A-20: Amostras coletadas na Depressão Central e Fronteira Oeste do Estado do RS, conforme Figura 2; 21: Controle positivo para RSNV (RNA de plantas do cultivar IRGA 417 infectadas com RSNV); 22: Controle negativo para RSNV (RNA de plantas do cultivar BR IRGA 409 não infectadas com RSNV); 23: Controle negativo para a reação (água); ◀a: Produto amplificado entre ACT-R e ACT-F (~450 pb); ◀r: Produto amplificado entre RSNV7-1 e RSNV7-2 (194 pb). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.

semelhantes aos provocados por RSNV, mas sem o vírus (Figura 13), foram coletadas em áreas onde a doença estava ocorrendo (Figura 2). Nesse caso, é possível que a clorose apresentada (Figura 13B) seja devido à injúria causada por herbicidas do grupo das imidazolinonas (inibidores de ALS) em plantas de arroz vermelho ou em plantas de cultivares não tolerantes a esses herbicidas, já que nessas áreas cultivava-se o arroz IRGA 422CL, o qual apresenta tolerância.

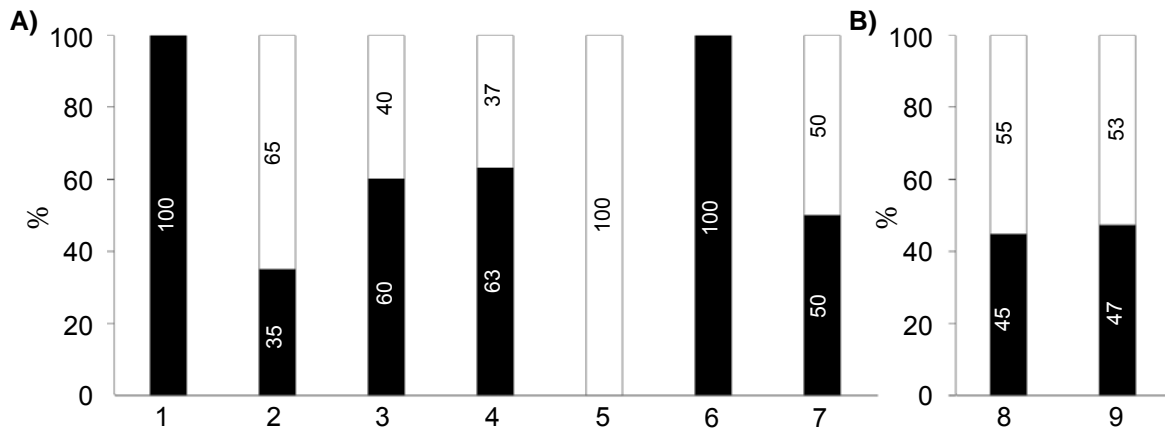


FIGURA 12. A) Comparação entre a detecção de RSNV através de RT-PCR e a presença de sintomas nas folhas e/ou de cistosoros de *Polymyxa graminis*. 1: Plantas sintomáticas (com distorção foliar e/ou listras necróticas nas folhas); 2: Plantas assintomáticas; 3: Plantas com cistosoros de *P. graminis*; 4: Plantas sem cistosoros (não detectados); 5: Plantas com sintomas causados por outros agentes; 6: Diagnóstico positivo (plantas sintomáticas e com cistosoros); 7: Diagnóstico negativo ; ■: Plantas com detecção positiva de RSNV através de RT-PCR; □: Plantas com detecção negativa de RSNV através de RT-PCR. B) Comparação entre a presença de cistosoros de *P. graminis* e de sintomas nas folhas. 8: Plantas com cistosoros de *P. graminis*; 9: Plantas sem cistosoros (não detectados) ■: Plantas sintomáticas; □: assintomáticas.

RSNV foi detectado em 60% das amostras infectadas com *P. graminis* e em 63% das amostras em que o vetor não foi detectado (Figura 12A). Essas variáveis, detecção de RSNV e presença do vetor, analisadas através do teste de χ^2 de associação, não são dependentes ($P = 0,90$) (Apêndice 5B). De maneira semelhante, a presença de sintomas nas folhas e a presença de cistosoros não são dependentes ($P = 0,86$) (Figura 12B, Apêndice 5A), indicando que apenas a presença de cistosoros na raiz não é um bom parâmetro indicativo da presença de RSNV. A presença do vetor em amostras em que RSNV não foi detectado poderia ser devido ao estágio inicial da infecção, com o vírus ausente na parte aérea. Também é possível que as estruturas observadas nas raízes não sejam de

P. graminis. Nem sempre é possível distinguir os esporos de resistência de *Polymyxa* spp. daqueles das espécies do gênero *Ligniera* (Morales et al., 1999b). Além disso, *P. graminis* pode não estar infectado com RSNV. *P. graminis* é considerado um habitante onipresente do solo onde seus hospedeiros são cultivados ou ocorrem naturalmente (Rush, 2003). Ainda é possível que plantas infectadas com o vetor tenham sido consideradas sem cistosoros devido a um escape no procedimento de amostragem.

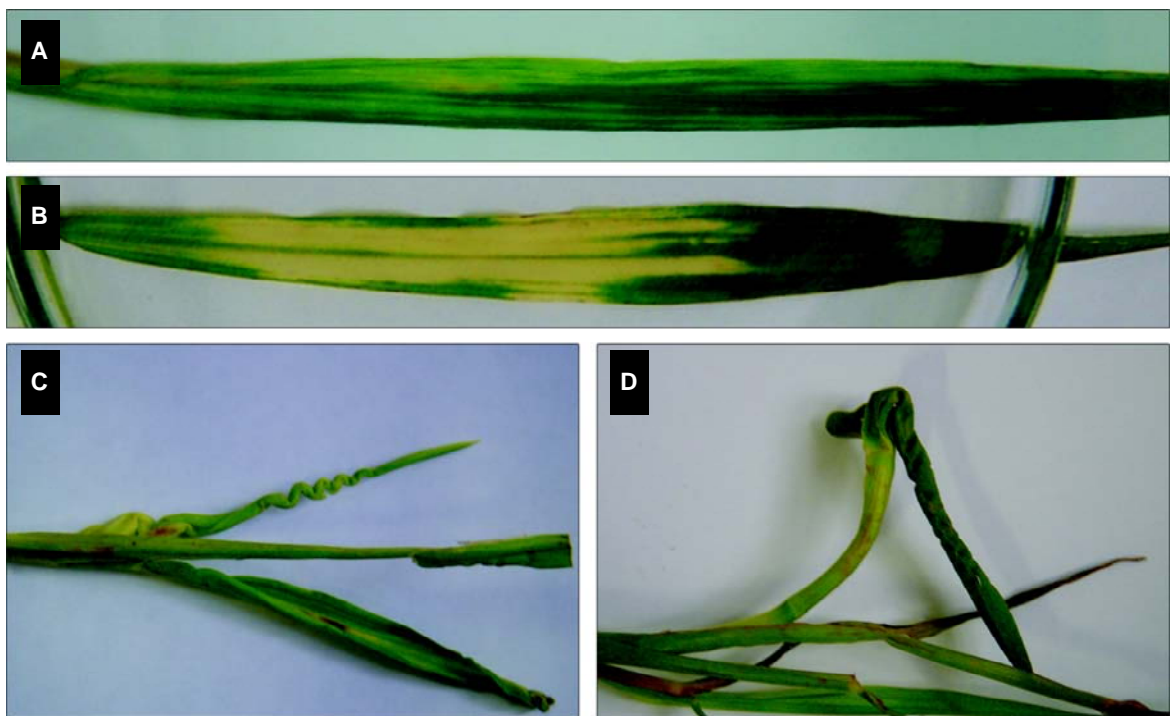


FIGURA 13. Sintomas foliares observados nas plantas de arroz analisadas. A: Necrose em listras típica do enrolamento do arroz; B: Clorose foliar semelhante à injúria provocada por herbicidas do grupo das imidazolinonas; C: Distorção foliar típica do enrolamento do arroz; D: Distorção foliar e alongamento de entre-nós (não relacionada à doença). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005.

Mais importante ainda, o método molecular permitiu a detecção de RSNV em todas as amostras em que o enrolamento do arroz foi diagnosticado (plantas com cistosoros e pelo menos um dos sintomas, Figura 12). Além disso, RSNV

ainda foi detectado em 50% das plantas em que o enrolamento não foi diagnosticado (Figura 12). Através do teste de χ^2 de associação, verifica-se que existe uma dependência entre o diagnóstico do enrolamento e a detecção de RSNV ($P = 0,02$) (Apêndice 5D). Esses resultados indicam que a detecção do vírus através da RT-PCR pode ser utilizada como uma ferramenta na diagnose do enrolamento do arroz quando plantas de arroz não apresentam sintomas e cistosoros simultaneamente.

Alternativamente, métodos sorológicos poderiam ser utilizados para a detecção de RSNV, como já foi realizado através do DAS-ELISA (Maciel et al., 2004. no prelo), da ISEM e de “western blotting” (Morales et al., 1999b) para caracterização do vírus. Essas técnicas, principalmente ELISA, podem ser aplicadas a partir de extratos de plantas de arroz, o que favoreceria sua utilização em larga escala. Porém, a obtenção de anticorpos contra RSNV é uma das limitações ao uso de tais técnicas sorológicas, já que os mesmos não são produzidos em escala comercial.

Este trabalho abriu a possibilidade da detecção de RSNV através da RT-PCR. Novas pesquisas, como a utilização de protocolos simples ou “kits” de extração de ácido nucléicos, poderão tornar a detecção através da RT-PCR mais simples e rápida, maximizando sua utilização.

5. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados do isolamento parcial do genoma de RSNV e da detecção do vírus em plantas de arroz, nas condições realizadas neste trabalho, conclui-se que:

- 1) A seqüência denominada MV007 3' (957 nt) corresponde à região 3' da fita de um dos RNAs genômicos de RSNV;
- 2) Os oligonucleotídeos iniciadores RSNV7-1 e RSNV7-2 são específicos para RSNV;
- 3) A RT-PCR é uma ferramenta suficiente para detecção de RSNV e necessária para a diagnose do enrolamento do arroz.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABO, M.E.; FADHILA, H.A. Epidemiology and Management of Rice Viruses and Virus Diseases. In: PLANT VIROLOGY IN SUB-SAHARAN AFRICA CONFERENCE, 2001, Ibadan. **Book of abstracts...** Disponível em: <[http:// www. iita.org/info/virology/pdf_files/112-127.pdf](http://www.iita.org/info/virology/pdf_files/112-127.pdf)> Acesso em: 27 ago. 2004.

ADAMS, M.J.; ANTONIW, J.F.; MULLINS, J.G.L. Plant virus transmission by plasmodiophorid fungi is associated with distinctive transmembrane regions of virusencoded proteins. **Archives of Virology**, Viena, v. 146, p. 1139–1153, 2001.

ADAMS, M.J.; SWABY, A.G. Factors affecting the production and motility of zoospores of *Polymyxa graminis* and their transmission of barley yellow mosaic virus (BaYMV). **The Annals of applied biology**, Londres, v. 112, p. 69-78, 1988.

ADAMS, M.; WARD, E. Characterization of *Polymyxa* transmitting *Rice stripe necrosis virus* in Columbia. In: SHERWOOD, J.L.; RUSH, C.M. (Eds.) SYMPOSIUM OF THE INTERNATIONAL WORKING GROUP ON PLANT VIRUSES WITH FUNGAL VECTORS, 4., 1999, Denver. **Proceedings...** Denver, 1999. p. 77-80

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 4 ed. San Diego: Academic Press, 1998. 635p.

ALMANÇA, M.A.K.; MATSUMURA, A.T.S.; MACIEL, J.L.N. et al. *Trichoderma* sp. no controle do complexo *Polymyxa graminis*-RSNV e na promoção de crescimento de plantas de arroz. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 4.; REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 24., 2005, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, 2005. p. 553-555.

ALMANÇA, M.A.K. **Controle biológico do enrolamento do arroz por *Trichoderma* spp.** Porto Alegre: Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 15 set. 2004. Informações pessoais.

ALTSCHUL; STEPHEN, F.; MADDEN, T.L. et al. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ARAGÃO, F.J.M., RECH, E.L. Isolamento de vetores para transformação direta, in: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Eds.). **Manual de Transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa-Cenargen, 1998. p. 17-33.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Comparativo da área, produção e produtividade SAFRAS 2001/2002 e 2002/2003 Arroz**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>> Acesso em: 21 set. 2005.

BRUNT, A.A.; CRABTREE, K.; DALLWITZ, M.J. et al. (Eds.). **Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database**. Version: 20th August 1996. Disponível em: <<http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>> Acesso em: 27 ago. 2004.

BRUNT, A.A.; RICHARDS, K.E. Biology and molecular biology of furoviruses. **Advances in virus research**, Nova Iorque, v. 36, p. 1-32, 1989.

BÜCHEN-OSMOND, C. (Eds.) **Rice stripe necrosis virus**. ICTVdB - The Universal Virus Database, version 3. ICTVdB Management, The Earth Institute, Biosphere 2 Center, Columbia University, Oracle, AZ, USA. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>> Acesso em: 27 ago. 2004.

BUGOS, R.C.; CHIANG, V.I.; ZHANG, X.H. et al. RNA isolation from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine. **BioTechniques**, Natick, v. 19, p. 734-737, 1995.

CALVERT, L.; SEDANO, R. **Caracterización de la Enfermedad del Entorchamiento**. Un complejo de *Polymixa graminis* y el virus de la necrosis rayada del arroz. Proyecto IP-4. Mejoramiento del Germoplasma de Arroz para América Latina Y El Caribe. CIAT. Informe Anual, 2001. Disponível em: <http://www.ciat.cgiar.org/riceweb/esp/pdf/contenido_introduccion.pdf> Acesso em: 13 set. 2004.

CAMBRA, M.; GORRIS, M.T.; MARROQUÍN, C. et al. Incidence and epidemiology of *Citrus tristeza virus* in the Valencian Community of Spain. **Virus Research**, Amsterdam, v. 71, p. 85-95, 2000.

CAMPBELL, R.N. Fungal transmission of plant viruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 87-108, 1996.

CARMONA, P.S.; TERRES, A.L.; SCHIOCCHET, M. Avaliação Crítica dos Projetos do PNP-Arroz na Área de Melhoramento Genético, no período de 1980 a 1990: Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão. **A pesquisa de arroz no Brasil nos anos 80: avaliação crítica dos principais resultados**. Goiânia, 1994. p. 269-275. (Documentos, 40).

CIP. Centro Internacional de la Papa. **Techniques in plant virology**. CIP Training Manual. Disponível em: <[http://www.cipotato.org/training/Materials/PVTEchs/Fasc5.2\(99\).pdf](http://www.cipotato.org/training/Materials/PVTEchs/Fasc5.2(99).pdf)> Acesso em: 29 mar. 2004.

CLARK, M.F.; ADAMS, A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **The Journal of general virology**, Londres, v. 34, p. 475-483. 1977.

COPELAND, A.; LUCAS, S.; LAPIDUS, A. et al. **Complete sequence of *Pseudomonas fluorescens* PfO-1**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=77380231>> Acesso em: 25 out. 2005.

CORREA, F.; MARTINEZ, C.; ECHEVERRY, J. et al. **Virus de la Necrosis Rayada del Arroz**. Identificación de Fuentes de Resistencia al VNRA (Entorchamiento) en Inoculaciones de Invernadero. Evaluación de Especies Silvestres de Arroz y Progenies de Cruces Interespecificos. Desarrollo de Métodos de Evaluación. Proyecto IP-4. Mejoramiento del Germoplasma de Arroz para America Latina Y El Caribe. CIAT. Informe Anual, 2001. Disponível em: <http://www.ciat.cgiar.org/riceweb/esp/pdf/contenido_introduccion.pdf> Acesso em: 13 set. 2004a.

CORREA, F.; MARTINEZ, C.; ECHEVERRY, J. et al. **Introgression of RSNV Resistance from the Wild Species *Oryza glaberrima* into the Cultivated *Oryza sativa***. Studies on the Interaction of *Polymyxa graminis* on Rice. Project IP-4. Improved Rice Germplasm for Latin America and the Caribbean. CIAT. Annual Report, 2003. Disponível em: <http://www.ciat.cgiar.org/riceweb/pdfs/rice_2003_contents.pdf> Acesso em: 13 set. 2004b.

DALLWITZ, M.J. A general system for coding taxonomic descriptions. **Taxon**, Utrecht, v. 29, p. 41-46, 1980.

DALLWITZ, M.J.; PAINE, T.A.; ZURCHER, E.J. **User's Guide to the DELTA System**: a general system for processing taxonomic descriptions. 4 ed. Canberra: CSIRO Division of Entomology, 1993. 136p.

D'AMBRA, V.; MUTTO, S. Parasitism of *Trichoderma harzianum* on cystosori of *Polymyxa betae*. **Journal of phytopathology**, Berlim, v. 115, p. 61-71, 1986.

DELFOSSÉ, P.; REDDY, A.S.; LÈGREVE, A. et al. Serological Methods for Detection of *Polymyxa graminis*, an Obligate Root Parasite and Vector of Plant Viruses. **Phytopathology**, Palo Alto, v. 90, n. 5, p. 537-545, 2000.

DUCHAUD, E.; RUSNIOK, C.; FRANGEUL, L. et al. The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photobacterium luminescens*. **Nature Biotechnology**, Nova Iorque, v. 21, n. 11, p. 1307-1313, 2003.

EUN, A.J.C.; HUANG, L.; CHEW, F.T. et al. Detection of two orchid viruses using quartz crystal microbalance (QCM) immunosensors. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 99, p. 71-79, 2002.

FAOSTAT data. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat/collections?version=ext&hasbulk=0&subset=agriculture>> Acesso em: 21 set. 2005.

FENBY, N.S.; SCOTT, N.W.; SLATER, A. et al. PCR and non-isotopic labeling techniques for plant virus detection. **Cellular and Molecular Biology**, Noisy-le-Grand, v. 41, n. 5, p. 639-652, 1995.

FRENCH, C.E.; BOONSTRA, B.; BUFTON, K.A.J.; BRUCE, N.C. Cloning, sequence and properties of the soluble pyridine nucleotide transhydrogenase of *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 179, n. 8, p. 2761-2765, 1997.

HIBINO, H. Biology and epidemiology of rice viruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 249-274, 1996.

ICTVdB – **The Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/index.htm>> Acesso em: 09 set. 2004.

IRGA. Instituto Riograndense do Arroz. **Arroz irrigado: Recomendações Técnicas da Pesquisa para o Sul do Brasil** / IRGA. Porto Alegre, 2001. 128p.

IRGSP - INTERNATIONAL RICE GENOME SEQUENCING PROJECT. The map-based sequence of the rice genome. **Nature**, Londres, v. 436, n. 7052, p. 793-800, 2005.

JAMES, D. A simple and reliable protocol for the detection of apple stem grooving virus by RT-PCR and in a multiplex PCR assay. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 83, p. 1-9, 1999.

JAMES, D.; UPTON, C. Single primer pair designs that facilitate simultaneous detection and differentiation of peach mosaic virus and cherry mottle leaf virus. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 83, p. 103-111, 1999.

JEANMOUGIN, F.; THOMPSON, J. D.; GOUY, M. et al. Multiple sequence alignment with Clustal X. **Trends in Biochemical Sciences**, Cambridge, v. 23, p. 403-405, 1998.

JELKMANN, W. Cherry virus A: cDNA cloning of dsRNA, nucleotide sequence analysis and serology reveal a new plant capillovirus in sweet cherry. **The Journal of general virology**, Londres, v. 76, p. 2015-2024, 1995.

JOHNSON, D.E.; DINGKUHN, M.; FOMBA, S.N. et al. Incidence of rice stripe necrosis virus in upland rice in West Africa. **International Rice Research Notes**, Manila, v. 23, n. 3, p. 25-26, 1998.

KANYUKA, K.; WARD, E.; ADAMS, M.J. *Polymyxa graminis* and the cereal viruses it transmits: a research challenge. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 4, n. 5, p. 393-406, 2003.

KOENIG, R.; BURGERMEISTER, W.; WEICH, H. et al. Uniform RNA patterns of Beet necrotic yellow vein virus in sugar beets roots, but not in leaves from several plant species. **The Journal of general virology**, Londres, v. 67, p. 2043-2046, 1986.

KOENIG, R.; JARAUSCH, W.; LI, Y. et al. Effect of recombinant beet necrotic yellow vein virus with different RNA compositions on mechanically inoculated sugarbeets. **The Journal of general virology**, Londres, v. 72, p. 2243-2246, 1991.

LEGRÈVE, A.; DELFOSSE, P.; VANPEE, B. et al. Differences in temperature requirements between *Polymyxa* sp. of Indian origin and *Polymyxa graminis* and *Polymyxa betae* from temperate areas. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 104, p. 195-205, 1998.

LLOP, P.; CARUSO, P.; CUBERO, J. et al. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. **Journal of microbiological methods**, Amsterdam, v. 37, p. 23-31, 1999.

LÓPEZ, M.M.; BERTOLINI, E.; OLMOS, A. et al. Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. **International Microbiology**, Barcelona, v. 6, p. 233-243, 2003.

LOUVEL, D.; BIDAUX, J.M. Observation de nouveaux symptômes pathologiques sur des variétés précoces de riz en Côte d'Ivoire. **Agronomie Tropicale**, Yaoundé, v. 32, n. 2, p. 257-261, 1977.

LOUWS, F.J.; RADEMAKER, J.L.W.; DE BRUIJN, F.J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytopathogenic bacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 81-125, 1999.

MACIEL, J.L.N.; MENEZES, V.G.; RAMIREZ, H. et al. Ocorrência do vírus RSNV (Rice Stripe Necrosis Virus) em lavouras de arroz do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO DA CADEIA PRODUTIVA DE ARROZ; REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE ARROZ, 7., 2002, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, 2002. p. 491-492.

MACIEL, J.L.N.; MORAES, M.G.; ALMANÇA, M.A.K. et al. Ocorrência do vírus RSNV (Rice Stripe Necrosis Virus) em lavouras de arroz do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 2004. (no prelo).

MACIEL, J.L.N.; PEREIRA, E.S.; TAGLIAPIETRA, J.M. et al. Efeito do tratamento de sementes e adubação sobre os danos e incidência da virose do enrolamento

do arroz. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 4.; REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 24., 2005, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, 2005. p. 514-516.

MACKENZIE, D.J.; MCLEAN, M.A.; MUKERJI, S. et al. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription polymerase chain reaction. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, p. 222-226, 1997.

MARCHLER-BAUER, A; BRYANT, S.H. CD-Search: protein domain annotations on the fly. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 32, p. 327-331, 2004.

MARTIN, R.R.; JAMES, D.; LÉVESQUE, C.A. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 38, p. 207-239, 2000.

MARTINEZ, C.P; BORRERO, J.; ALMEIDA, A. et al. **Utilization of New Alleles from Wild Rice Species to Improve Cultivated Rice in Latin America.** [pôster]. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali: 2002. 1 p. Disponível em: <<http://www.ciat.cgiar.org/>> Acesso em: 22 set. 2005.

MATTHEWS, R.E.F. **Plant Virology.** 3 ed. San Diego: Academic Press, 1991. 835p.

McELROY, D.; ROTHENBERG, M.; WU, R. Structural characterization of a rice actin gene. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 14, n. 2, p. 163-171, 1990.

MO, X.H.; QIN, X.Y.; WU, J. et al. Complete nucleotide sequence and genome organization of a Chinese isolate of tobacco bushy top virus. **Archives of Virology**, Viena, v. 148, p. 389-397, 2003.

MORALES, F.J. El entorchamiento del arroz: un modelo para el manejo integrado de enfermedades virales. **Foro Arroceros latinoamericano**, Cali, v. 7, n. 1, p. 12-15, 2001.

MORALES, F.J.; ARROYAVE, J.A.; AGUDELO, V. F. et al. 'Entorchamiento': una nueva enfermedad viral del arroz en Colombia. **Ascolfi Informa**, Bogotá, v. 21, p. 52-54, 1995a.

MORALES, F.J.; ARROYAVE, J.A.; VELASCO, A.C. et al. Caracterización parcial del 'entorchamiento' o 'necrosis rayada' del arroz en Colombia. **Fitopatología Colombiana**, Cali, v. 19, p. 48-54, 1995b.

MORALES, J.F.; LOZANO, I.; CASTANO, M. et al. Emergence and partial characterization of rice necrosis virus in the Americas. In: SHERWOOD, J.L.; RUSH, C.M. (Eds.) SYMPOSIUM OF THE INTERNATIONAL WORKING GROUP ON PLANT VIRUSES WITH FUNGAL VECTORS, 4., 1999, Denver. **Proceedings...** Denver, 1999a. p. 5-8.

MORALES, J.F.; WARD, E.; CASTAÑO, M. et al. Emergence and partial characterization of rice stripe necrosis virus and its fungus vector in South America. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, p. 643-650, 1999b.

MORENO, P.; GUERRI, J.; BALLESTER-OLMOS, J.F. et al. Separation and interference of strains from a citrus tristeza virus isolate evidenced by biological activity and double-stranded RNA (dsRNA) analysis. **Plant Pathology**, Oxford, v. 42, p. 35-41, 1993.

MURPHY, A.; TAIZ, L. Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten *Arabidopsis* ecotypes. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 109, p. 945-954, 1995.

NEDEL, J.L.; ASSIS, F.N.; CARMONA, P.S. A planta de arroz: morfologia. In: PESK, S.T.; NEDEL, J.L.; BARROS, A.C.S.A. **Produção de arroz irrigado**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 1998. p. 11-66.

NELSON, K.; PAULSEN, I.; WEINEL, C. et al. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 4, n. 12, p. 799-808, 2002.

NEMCHINOV, L.G.; HAMMOND, J.; JORDAN, R.; HAMMOND, R.W. The complete nucleotide sequence, genome organization, and specific detection of *Beet mosaic virus*. **Archives of Virology**, Viena, v. 149, n. 6, p. 1201-1214, 2004.

NICODEME, M.; GRILL, J.P.; HUMBERT, G.; GAILLARD, J. L. **Characterization of a caseinolytic *Pseudomonas* strain isolated from milk**. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=Nucleotide&list_uids=54144894&dopt=GenBank> Acesso em: 25 out. 2005.

NOLASCO, G.; DE BLAS, C.; TORRES, V.; PONZ, F. A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 45, p. 201-218, 1993.

OLMOS A.; BERTOLINI, E.; CAMBRA, M. Simultaneous and co-operational amplification (Co-PCR): a new concept for detection of plant viruses. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 106, n. 1, p. 51-59, 2002.

OLMOS, A.; CAMBRA, M.; ESTEBAN, O. et al. New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed tube. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 27, p. 1564-1565, 1999.

PAULSEN, I.T.; PRESS, C.M.; RAVEL, J. et al. Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. **Nature Biotechnology**, Nova Iorque, v. 23, n. 7, p. 873-878, 2005.

PETERSEN, D. J.; SHISHIDO, M.; HOLL, F.B.; CHANWAY, C.P. Use of species- and strain-specific PCR primers for identification of conifer root-associated *Bacillus* spp. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 133, n. 1-2, p. 71-76, 1995.

ROCHON, D.; KAKANI, K.; ROBBINS, M. et al. Molecular aspects of plant virus transmission by oospidium and plasmodiophorid vectors. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 211-241, 2004.

RUSH, C.M. Ecology and epidemiology of *benyviruses* and plasmodiophorid vectors. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 41, p. 567-592, 2003.

SANCHÉZ-NAVARRO, J.A.; CAÑIZARES, M.C.; CANO, E.A.; PALLÁS, V. Simultaneous detection of five carnation viruses by non-isotopic molecular hybridization. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 82, p. 167-175, 1999.

TAMADA, T.; ABE, H. Evidence that beet necrotic yellow vein virus RNA-4 is essential for efficient transmission by the fungus *Polymyxa betae*. **The Journal of general virology**, Londres, v. 70, p. 3391-3398, 1989.

TAMADA, T.; SHIRAKO, Y.; ABE, H. et al. Production and pathogenicity of isolates of beet necrotic yellow vein virus with different numbers of RNA components. **The Journal of general virology**, Londres, v. 70, p. 3399-3409, 1989.

TYLER, B. **Expression of Phytophthora sojae genes during infection and propagation_sHB Phytophthora sojae cDNA clone sHB039K08 5, mRNA sequence**. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=Nucleotide&list_uids=38062331&dopt=GenBank> Acesso em: 25 out. 2005.

VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L. et al. (Eds) **Virus Taxonomy**. Hardcover: Academic Press, 2000. 1024p. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.

VAN SLUYS, M.A.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; CAMARGO, L.E.A. et al. Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, 169-190, 2002.

WELLER, S.A.; ELPHINSTONE, J.G.; SMITH, N.C. et al. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative multiplex, real-time, fluorogenic PCR (Taqman) assay. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 2853-2858, 2000.

WORLEY, K.C.; CULPEPPER, P.; WIESE, B.A.; SMITH, R.F. BEAUTY-X: enhanced BLAST searches for DNA queries. **Bioinformatics**, Oxford, v. 14, n. 10, p. 890-891, 1998.

YU, J.; HU, S.N.; WANG, J. et al. A draft sequence of the rice (*Oryza sativa* ssp *indica*) genome. **Chinese science bulletin**, Beijing, v. 46, n. 23, p. 1937-1942, 2001.

7. APÊNDICES

APÊNDICE 1. Meio de cultura Luria-Bertani (LB) empregado para o cultivo de *Escherichia coli*. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005.

Componente	Concentração
Peptona	10 mg.ml ⁻¹
Extrato de levedura	5 mg.ml ⁻¹
NaCl	10 mg.ml ⁻¹ (171,11 mM)
Ágar (meio sólido)	1,6% (p/v)

[pH (7,5) ajustado com NaOH]

APÊNDICE 2. Análise do macroarranjo de clones da biblioteca de cDNAs.
UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005.

Clones	Sondas ¹			Clones	Sondas ¹		
	Plantas de BR IRGA 409 com RSNV	Plantas de BR IRGA 409 sem RSNV	RSNV parcialmente purificado		Plantas de BR IRGA 409 com RSNV	Plantas de BR IRGA 409 sem RSNV	RSNV Parcialmente purificado
MV006	+	-	+	MV083	+	-	+
MV007	+	-	+	MV086	+	+	+
MV009	+	+	+	MV087	+	-	-
MV010	+	-	+	MV092	+	-	+
MV011	+	-	nc	MV094	+	-	+
MV013	+	-	+	MV095	+	+	+
MV014	+	-	+	MV098	+	+	+
MV017	+	-	+	MV099	+	+	+
MV018	+	-	+	MV100	+	+	+
MV021	+	-	+	MV101	+	-	+
MV022	+	-	+	MV102	+	-	nc
MV023	+	-	+	MV105	nc	-	nc
MV026	+	-	-	MV106	+	+	+
MV032	+	-	-	MV109	+	+	nc
MV033	+	-	+	MV112	+	+	-
MV034	+	+	+	MV113	+	-	+
MV036	+	-	+	MV116	+	-	+
MV038	+	-	+	MV117	+	+	+
MV039	+	+	+	MV118	+	-	+
MV040	+	-	+	MV121	+	+	+
MV041	+	+	+	MV122	-	-	-
MV042	+	-	+	MV123	nc	-	nc
MV043	+	+	-	MV125	+	-	nc
MV045	+	+	-	MV126	-	-	+
MV047	-	-	-	MV130	+	+	+
MV049	+	-	+	MV131	+	-	+
MV050	+	-	+	MV132	+	+	+
MV052	+	-	+	MV133	+	-	+
MV054	+	-	+	MV134	-	-	+
MV055	+	+	+	MV136	+	+	+
MV056	-	+	-	MV140	+	-	+
MV060	+	+	+	MV141	+	+	+
MV061	+	-	+	MV142	nc	-	nc
MV063	+	-	+	MV143	+	-	nc
MV064	+	+	+	MV145	+	-	+
MV065	+	+	-	MV146	+	-	+
MV069	+	+	-	MV148	+	-	nc
MV070	+	-	+	MV151	+	-	+
MV071	+	+	+	MV152	+	+	+
MV072	+	-	+	MV153	+	-	+
MV073	+	+	+	MV158	+	-	+
MV075	+	-	nc	MV159	+	+	+
MV078	+	+	+	MV160	+	-	+

+) Houve hibridização; -) Não houve hibridização; nc) não conclusivo.

APÊNDICE 3. Seqüência de nucleotídeos de clones da biblioteca de cDNAs.
UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005.

Clone	Seqüência (5' - 3') ¹	
MV006	1 C TACTGAGTAAGTTTGTACGCTAAAAGACAAGGAAAGCATGGGTAGGGAG	50
	51 A CTGTACCTGTGTTTTTTCCTTTGCAATTATTGTTTAGCCTAAGAGGTTGC	100
	101 A CCTTGTTTGATAGGTATGAAGGCGGTGAACTTGCTGTGTTAGTCCATGT	150
	151 C TTTTTTTCCTCAAGAAAAAGACGTTGATAATCTGGCAGAATTTGAGTCAC	200
	201 T CGTGACATCTGCTGGGGTAACAACCCGTACAAATAGTCACAGGCAGTC	249
MV007	1 C GGGCCTTACGAAGCACGTTAGCAAGTTGCTCAAATGCCTCTTCCGGAGA	50
	51 A TTGGACATCTTAATATCAAAACCTGTTGGCGAGTCGGGACAGAAGTCCG	100
	101 A ACCCTCTGACACCTCAGAACTTTCGTCGCAATCACGAGAAACAGCCTCT	150
	151 T CGGAGGCACACGTTCTACAGTTCAGTGCCTTCCTTTTCAAACGGGAATT	200
	201 C CGAAG	206
MV010	1 C TCGTGTTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCCTGT	50
	51 C CTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACCTAAGGAGACTGCCGGTGA	100
	101 C AAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGC	150
	151 C TGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGC	200
	201 G AGGTGGAG	209
MV018	1 C TCATGCCGGTTCGAAGATACCAGGCCGCTGCGACTGTTTATTA AAAACAC	50
	51 A GCACCTCTGCAAACACGAAAGTGGACGTATAGGGTGTGACGCCTGCCCG	100
	101 T GCCGGAAGGTTAATTGATGGGGTTAGCTCACTGGTCGAGTCGGCCTGCG	150
	151 C GGAAGATGTAACGGGGCTAAACTATGCACCGAAG	185
MV022	1 C TGGGCATGGAGAACATCGGGGTCAAGGTCAACAGCCGCGCCAGATCGA	50
	51 A GTCGACGAGAACTACCGCACCTGCGTGCCTAACATCTACGGCGCCGGTG	100
	101 A CGTGATCGGTTGGCCAAGCCTGGCCAGTCCGCCACGACCAGGGGCGC	150
	151 T CCGCCGCCGGCAGCATCGTCGACAACGGTAG	182
MV052	1 A ACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAGTTCCGACCTGCAC	50
	51 G GATGGCGTAACGATGGCGGCGCTGTCTCCACCCGAGACTCAGTGAAATT	100
	101 G AAATCGCTGTGAAGATGCAGTGTATCCGCGGCTAGACGGAAAGACCCCG	150
	151 T GAACCTTTACTATAGATCCTGCAGAGAAGCTTGGCGCCAGCCGGCTTCA	200
	201 A TTGCA	206
MV054	1 C TGGCTGCCGGGAGGTGACGGTTTTTAAACGACGGCTGTTGGGGGACGGAG	50
	51 C CTGGATGCTGGTGGCTCTTGGCGCTGCGTGGCTGGTGCAGGCGTTGTTC	100
	101 G ATTTCTGGACCCGCGAGCAGCATCTGGATCCGTTCAAGAGCGGGTTTTT	150
	151 G TCCTTGCGCTACTTCACTGGCCCCCCCCCTGGCGTTTTTCTTCCCTGCTGT	200
	201 A CCTCAGGGATTTGTGCCGTCTGCGCGATGTTCAAGACGCAAGCGTCTGA	250
	251 T AGCGACGATTGACCAGGCTGTTCAAGGCCAGGGCAATGGCACTCAGCCC	300
	301 C AGGAAGCACAGCCCCAGCGCCATCACCAGGTTGCTGGCGCTCAGGTTGA	350
	351 T GAACGCGCTGATCAGGCCGCCAGAGACAAAGATCAGCATGTTGCCCGCC	400
	401 G AAGCCGAGGTTCCGGCGTTGTGC	424
	MV061	1 C TACGGGTATCATCTTACGATGATGCGGTAGAGGAGCGTTCTGTAAGCCT
51 G TGAAGGTGAGTTGAGAAG		69
MV092	1 C TTAGAAATGAGCATTACATTGAATGTTGATTTCTAGTCTTTTGATTAG	50
	51 A TCGTTCTTTAAAAAATTTGGGTATGTGATAGAAAGATAGACTGAACGTTA	100
	101 C TTTCACTGGTAACGGATCAGGCTAAGGTAAAATTTGTGAGTACTCTTAA	150
	151 G AGTTTTGCGAATTTTCGGCGAATGTCGTCTTCATAGTATAACCAGATTG	200
	201 C TTGGGGTTATATGGTCAAGTGAAGAAGCGCATACGGTGGATGCCTTGGC	250
251 A GTCAGAGGCGATGAAAGACGTGGTAGCCTGCCGATAAGA	289	

APÊNDICE 3. Continuação...

MV140	1	CTTCATCGATTGGGAATATGGCGATAGCATTGAAAGTCTGCGCGCAGCGG	50
	51	TCGTTGCGTTCGAAGATCTTGTGGATTACCCCATGCAAAAACCGGCACGG	100
	101	GTCCGCATGAAAGAATCTAGCAGCAAACAACAGGTCACCGGCACTGTCCG	150
	151	TGTTTACTATTACGCCACACAATCGGAACGCGGCTTTAAAGTCCGTAACA	200
	201	TCCGTGGCGAGACCGATCGCGTTAGAATCCATGGTGAAAGTAAGGCAGAC	250
	251	TGGAAGGCTGCCTTGCGAATCGCTGAAATGTTTCGTCAGGAGTTCGTGAG	300
	301	CGCCTACAGGACGCTACATGCGTTCGATATGCAAACGCTCAAAGAGAAAC	350
	351	TTGGCCTCGCCTGAGGATAAAGGGCGAGTTTAACTCGCCCTTGTACCAC	400
	401	ACCCTAAGGAGGGTGCATATGATCCAGTAT	431
MV158	1	GCTTGCTGGAGGTATCAGAAGTGCGAATGCTGACATGAGTAACGACAATG	50
	51	GGTGTGAAAAACACCCACGCCGAAAGACCAAGGTTTCCGCGCAACGTTA	100
	101	ATCGACGCAGGGTTAGTCGGTCCCTAAGGCGAGGCTGAAAAGCGTAGTCG	150
	151	ATGAAAAACAGGTTAATATTCCTGTACTTCTAGTTATTGCGATGGAGGGA	200
	201	CGGAGAAGGCTAGGCCAG	218
MV160	1	CTCAAGGACTACGTGCGAAACCAGCGTCTACAAACTGGTGGAGACCAGCCA	50
	51	GGTCAACGACCGGCGCCTGGAGTTCATCCTGATCAACAGCCCTCAGCTCA	100
	101	GGCTGTCCCAGACGCCGTACCCAGCAGCGCGGCGAACAACCCGGCGGCG	150
	151	CAGAGCAGGCCAAGCGCCAGGGCGCGCCGAAGACCTTCCAGAAACTCGC	200
	201	TTGCCGCGGCTTCATCGGCGTCCCTCCCGGGTTCGGCTTGCCGGCCCGGCG	250
	251	GCGGACGGTCCACAGGTACAGGCCACTGCCAGGACAATCATGGTCAGCA	300
	301	CATCCAGCGCCGCCACAGCAGCTCCAGGCGCTCTTGCTGGGTGTTCCAC	350
	351	CAGGTCACTTCCAGGCCCGGCAGATTCACTTCGCCGGTGCGGGTCCGCAC	400
	401	CAGGGCCTGGCGTTCCTTCGCGAATGCCAGCAGGCCCTGTTCAACGTGCT	450
	451	GGTTGCTCAGTTGCGGTTGATCC	473

¹A seqüência 5'-3' é representada em função do resultado obtido no seqüenciamento, não significando necessariamente a orientação da seqüência codificante.

APÊNDICE 4. Análise *in silico* dos clones seqüenciados. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2005.

Clone	Melhor alinhamento			Estrutura predita e/ou função	Referência
	Valor de E	Nº de acesso (GenBank)	Espécie		
MV006	3×10^{-11} (1)	NP_931744	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>Laumondii</i>	Proteína de ligação ao GTP	Duchaud et al. (2003)
MV007	nc ⁽³⁾				
MV010	4×10^{-113} (2)	CP000094	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	RNA ribossomal 16S	Copeland et al. (2005)
MV018	2×10^{-65} (2)	U56455	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	RNA ribossomal 23S	Petersen et al. (1995)
MV022	4×10^{-57} (2)	U91523	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	soluble pyridine nucleotide transhydrogenase	French et al (1997)
MV052	4×10^{-85} (2)	CF846677	<i>Phytophthora sojae</i>	mRNA expressado durante a infecção e propagação no hospedeiro. Função desconhecida.	Tyler (2005)
MV054	4×10^{-11} (1)	YP_262934	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Proteína hipotética PFL_5876	Paulsen et al. (2005)
MV061	3×10^{-30} (2)	AE016775 AE015451	<i>Pseudomonas putida</i>	Seção 2 de 21 do genoma completo	Nelson et al. (2002)
MV092	2×10^{-118} (2)	AY756059	<i>Pseudomonas</i> sp	RNA ribossomal 16S	Nicodeme et al. (2005)
MV140	nc ⁽³⁾				
MV158	2×10^{-118} (2)	CP000076	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Parte do genoma	Paulsen et al. (2005)
MV160	2×10^{-45} (2)	CP000076	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Parte do genoma	Paulsen et al. (2005)

¹ Menor valor obtido com o programa Blastx.

² Menor valor obtido com o programa Blastn.

³ Não caracterizado (nenhum programa encontrou similaridade significativa com a seqüência).

APÊNDICE 5. Teste Qui-quadrado (χ^2) de associação entre a ocorrência de sintomas foliares do enrolamento do arroz e a presença de cistosoros de *Polymyxa graminis* (A); entre a detecção de RSNV e a presença de cistosoros de *P. graminis* (B); entre a ocorrência de sintomas foliares do enrolamento do arroz e a detecção de RSNV (C); e entre a diagnose (ocorrência de sintomas foliares do enrolamento do arroz e de cistosoros de *P. graminis*) e a detecção de RSNV (D). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2006.

A)

Frequências observadas.				Cálculo do χ^2 com a correção de Yates.		
cistosoros	sintomas		total	Observado (O)	Esperado (E)	$(O-E -0,5)^2/E$
	sim	não				
sim	9	11	20	9	9,23	0,00786
não	9	10	19	11	8,77	0,00827
total	18	21	39	10	10,77	0,00673
				10	10,23	0,00709
				39	39	0,02995

$P(\chi^2 > 0,02995;1) = 0,86$

B)

Frequências observadas.				Cálculo do χ^2 com a correção de Yates.		
cistosoros	RSNV		total	Observado (O)	Esperado (E)	$(O-E -0,5)^2/E$
	sim	não				
sim	12	8	20	12	12,31	0,00293
não	12	7	19	8	11,69	0,00309
total	24	15	39	7	7,69	0,00469
				7	7,31	0,00494
				39	39	0,01565

$P(\chi^2 > 0,01565;1) = 0,90$

C)

Frequências observadas.				Cálculo do χ^2 .		
sintomas	RSNV		total	Observado (O)	Esperado (E)	$(O-E)^2/E$
	sim	não				
sim	18	0	18	18	11,077	4,32680
não	6	11	17	0	6,923	6,92300
alternativo	0	4	4	6	10,462	1,90302
total	24	15	39	11	6,539	3,04336
				0	2,461	2,46100
				4	1,538	3,94112
				39	39	22,59830

$P(\chi^2 > 22,5983;2) = 0,00001$

D)

Frequências observadas.				Cálculo do χ^2 com a correção de Yates.		
RSNV	Diagnóstico		total	Observado (O)	Esperado (E)	$(O-E -0,5)^2/E$
	enrolamento	não				
sim	9	15	24	9	5,54	1,58312
não	0	15	15	0	3,46	2,53482
total	9	30	39	15	18,46	0,47511
				15	11,54	0,76001
				39	39	5,35306

$P(\chi^2 > 5,35306;1) = 0,02$