

DANIELA COCO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOLÓGICA DO
BEGOMOVÍRUS Soybean chlorotic spot virus E
CONSTRUÇÃO DE UM VETOR DE SILENCIAMENTO
BASEADO NA MODIFICAÇÃO DE SEU GENOMA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

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

T

C667c
2012

Côco, Daniela, 1987-

Caracterização molecular e biológica do begomovírus
Soybean chlorotic spot virus e construção de um vetor de
silenciamento baseado na modificação de seu genoma /

Daniela Côco. – Viçosa, MG, 2012.

ix, 83f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 71-81

1. Soja. 2. Vírus. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22. ed. 633.34

DANIELA COCO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOLÓGICA DO
BEGOMOVÍRUS Soybean chlorotic spot virus E
CONSTRUÇÃO DE UM VETOR DE SILENCIAMENTO
BASEADO NA MODIFICAÇÃO DE SEU GENOMA**

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

APROVADA: 24 de Fevereiro de 2012.

Alice Kazuko Inoue Nagata

Francisco Murilo Zerbini
(Coorientador)

Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Orientadora)

*Aos meus pais Luiz (“in memorian”) e
Maria Aparecida, e aos meus irmãos
Valdete, Dilza, Everaldo e Luiz.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado força e perseverança para chegar até aqui, por providenciar tudo que sou e que tenho, e por me ensinar a reconhecer, nas coisas simples do dia-a-dia, sua providência divina.

A minha mãe, exemplo de vida e de coragem, por me apoiar e acreditar em mim. Aos meus irmãos Valdete, Dilza, Everaldo, Luiz Antônio, e ao meu sobrinho Luciano, por me incentivarem em cada nova etapa da minha vida. Tenho muito orgulho de vocês!

À Universidade Federal de Viçosa, por todas as oportunidades de estudo oferecidas durante toda minha vida acadêmica.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Interações Planta-Praga (INCTIPP) pelo apoio financeiro.

À professora Elizabeth, exemplo de dedicação profissional, pela orientação durante todo esse tempo que passei em seu laboratório. Agradeço também pela oportunidade de desenvolver este projeto, que permitiu meu crescimento profissional.

Ao professor Murilo, a Dr^a. Alice e a Dr^a. Poliane pela co-orientação deste trabalho.

As minhas grandes amigas Tathiana, Giselle e Marcella por estarem sempre presentes e dispostas a ajudar. Obrigada por aturarem minhas reclamações, minha chatice e meu mau humor, e por todos os momentos divertidos que passamos durante este tempo.

À todos os amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, Pedro, João Paulo, Wellison, Marcos, Lucas, Michirito, Humberto, Gustavo, Tetsu, Cris, Giselle, Priscila, Iara, Ánesia, Elisa, Kênia, Fábria e Mônica, pela

prazerosa convivência durante estes anos e por tornarem cada dia de trabalho uma oportunidade única de aprendizado.

À Marlene e à Gláucia pela presteza.

E a todos que passaram pela minha vida durante a realização deste trabalho e que deixaram sua contribuição para a concretização do mesmo.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Família Geminiviridae.....	3
2.2. Replicação viral.....	8
2.3. Movimento do vírus na planta.....	9
2.4. Infecção por begomovírus na cultura de soja.....	12
2.5.VIGS (<i>virus induced gene silencing</i>).....	14
3. MATERIAI E MÉTODOS.....	19
3.1. Isolado Viral.....	19
3.2. Clonagem e sequenciamento do genoma viral.....	19
3.3. Caracterização molecular.....	22
3.4. Construção do clone infeccioso	23
3.5. Determinação da gama de hospedeiro.....	25
3.6. Construção do vetor de silenciamento viral.....	25
3.7. Clonagem de um fragmento do gene <i>ChlI</i> (<i>magnesium chelatase subunit I</i>) no vetor viral de silenciamento viral.....	34
3.8. Indução do silenciamento do gene <i>ChlI</i> (<i>magnesium chelatase subunit I</i>) em plantas de soja.....	36
3.9. PCR em tempo real (qRT-PCR).....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1. Análise das sequências dos componentes genômicos virais do isolado infectando soja.....	38
4.2. Definição da Gama de Hospedeiro de SoCSV.....	47
4.3. Construção do vetor de silenciamento derivado de SoCV.....	59
4.3.1. A proteína do capsídeo não é essencial para infecção sistêmica de SoCSV em soja.....	59
4.3.2. Construção do Vetor de Silenciamento Viral baseado em SoCSV.....	61
4.4. Silenciamento do gene <i>ChlI</i> (<i>magnesium chelatase subunit I</i>) da soja induzida pelo vetor pUFV1713.....	63
5. CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
ANEXOS.....	82

RESUMO

CÔCO, Daniela, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Caracterização molecular e biológica do begomovírus Soybean chlorotic spot virus e construção de um vetor de silenciamento baseado na modificação de seu genoma.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Coorientadores: Francisco Murilo Zerbini e Poliane Alfenas Zerbini.

O gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) inclui vírus com genoma composto por uma ou duas moléculas de DNA fita simples, transmitidos a espécies de plantas dicotiledôneas pela mosca-branca *Bemisia tabaci*. No Brasil, os begomovírus são um dos principais entraves para a produtividade do feijoeiro e tomateiro. Entretanto, begomovírus infectando soja (*Glycine max*) tem sido apenas esporadicamente relatados. Neste trabalho, foi isolado uma espécie do gênero *Begomovirus* infectando soja na região de Jaíba-MG e designado Soybean chlorotic spot virus (SoCSV). Para a caracterização da espécie, foi feita a clonagem de seu genoma completo seguida de análise molecular, e da obtenção de clones infecciosos para a determinação de sua gama de hospedeiros. Extratos de DNA total de plantas infectadas foram utilizados para a amplificação do genoma viral completo utilizando-se a DNA polimerase do fago $\phi 29$. Os produtos da amplificação foram clonados em plasmídeos, completamente sequenciados e submetidas a análise filogenética. O DNA-A de SoCSV apresentou maior identidade de sequência com o vírus *Macropodium yellow spot virus* (85% de identidade), enquanto o DNA-B apresentou maior identidade com o *Bean golden mosaic virus* (67% de identidade). Este nível de conservação de sequências de SoCSV é suficientemente dissimilar (menos que 89%) para ser considerado uma nova espécie de begomovírus. Nos testes de gama de hospedeiros, dentre as espécies testadas foi constatada a infecção viral nas espécies *Nicotiana clevelandii*, *N. tabacum* e *N. glutinosa*, entretanto nenhum sintoma macroscópico foi observado. As plantas das espécies *Capsicum annuum*, *N. benthamiana*, *N. debneyi*, *N. rustica* e *Glycine max*, apresentaram sintomas leves. Os sintomas mais severos foram observados nas espécies *Phaseolus vulgaris* 'Pérola' e 'Ouro Negro', consistindo em deformação foliar, bolhosidade, clorose entre as nervuras, mosaico e mosaico dourado. Com o objetivo de induzir o silenciamento de genes em plantas de soja, foi construído um vetor de silenciamento viral baseado no DNA-A do SoCSV, denominado

pUFV1713, através da substituição da maior parte da sequência que codifica a proteína capsidial (CP) por um sítio múltiplo de clonagem. Assim como os outros begomovírus, o SoCSV demonstrou não necessitar da proteína capsidial para causar infecção sistêmica. A construção do vetor viral foi confirmada por PCR, clivagem enzimática e sequenciamento. A capacidade de pUFV1713 induzir o silenciamento gênico foi testada com a inserção de um fragmento do gene *magnesium chelatase subunit I (ChII)* no seu sítio múltiplo de clonagem, seguido por inoculação em plantas de soja. A infecção viral foi confirmada via PCR aos 21 dias pós-inoculação (dpi). O decaimento dos transcritos do gene endógeno *ChII* foi avaliado por PCR em tempo real. Os dados do qRT-PCR confirmam a diminuição dos níveis de expressão do mRNA do gene *ChII* nas plantas infectadas mas não nas plantas controles. Coletivamente, estes resultados indicam que o vetor VIGS derivado de SoCSV tem o potencial para aplicações em análises de genômica funcional de soja.

ABSTRACT

CÔCO, Daniela, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Biological and molecular characterization of the begomovirus Soybean chlorotic spot virus and construction of a silencing vector based on the modification of its genome.** Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-advisers: Franscisco Murilo Zerbini and Poliane Alfenas Zerbini.

The genus *Begomovirus* (family *Geminiviridae*) includes viruses with mono or bipartite ssDNA genomes that are transmitted to dicotyledonous plant species by the whitefly *Bemisia tabaci*. In Brazil, begomoviruses are considered major constraints to tomato and bean production. However, soybean (*Glycine max*) infecting begomoviruses have been only sporadically reported. In this investigation, a new begomovirus species was isolated from a soybean plant in Jaíba-MG and designated Soybean chlorotic spot virus (SoCSV). The DNA-A and DNA-B of this new virus species were cloned, sequenced and infectious clones were obtained to determine the host range. Total DNA extracts from infected plants were used for the amplification of the full-length viral genome through phage ϕ 29 DNA polymerase. The amplified fragments were cloned into plasmids, sequenced and submitted to phylogenetic analysis. The DNA-A of SoCSV was more closely related to *Macrotidium yellow spot virus Tomato* (85% identity), whereas the DNA-B was more closely related to *Bean golden mosaic virus* (67% identity). This level of sequence conservation of SoCSV is sufficiently dissimilar (less than 89%) to be considered a new species of *Begomovirus*. For the host range experiments, among the analyzed species, SoCSV was capable to cause a symptomless infection in *Nicotiana clevelandii*, *N. tabacum* e *N. glutinosa*. The plant species *Capsicum annuum*, *N. benthamiana*, *N. debneyi*, *N. rustica* and *Glycine max* displayed mild symptoms. The most severe symptoms were developed in the species *Phaseolus vulgaris* 'Pérola', and 'Ouro Negro', which consisted on leaf distortion, blistering, interveinal chlorosis, mosaic and golden mosaic. To induce gene silencing in soybean plants, we developed a SoCSV DNA-A-based silencing vector, designated pUFV1713, by replacing the majority of the coat protein (CP) sequences with a multiple cloning site. Like other begomoviruses, SoCSV did not require the coat protein for infection. The construction of the viral vector was confirmed by PCR, restriction analysis and sequencing. The capacity of pUFV1713 of inducing gene silencing was tested by cloning a *magnesium chelatase subunit I (ChII)* gene fragment in its multiple

cloning site followed by inoculation in soybean plants. Viral infection was confirmed via PCR at 21 days post-inoculation (dpi). The decay of *Chl* transcripts was monitored by real time RT-PCR. The results of qRT-PCR confirmed the decrease in the levels of *Chl* mRNA expression in the infected plants but not in the control plants. Collectively, these results indicate that the SoCSV-derived VIGS vector has a potential for application in soybean functional genomics analysis.

1-INTRODUÇÃO

O enorme aumento de dados de sequências genômicas e o crescente número de coleções de ESTs demandam ferramentas genéticas simples e rápidas para desvendar as funções dos genes em plantas. Nos últimos anos, o silenciamento do RNA tem emergido como uma das técnicas mais poderosas na análise funcional de genes em plantas. Além de constituir um mecanismo eficiente de defesa a vírus e transposons, evidências acumuladas indicam que o silenciamento de RNA também constitui um poderoso mecanismo de regulação da expressão gênica (Brodersen *et al.*, 2008; Meister e Tuschl, 2004; Voinnet, 2002).

Pequenos RNAs de interferência (siRNAs) e os microRNAs (miRNAs) são as duas maiores classes de RNAs com função de silenciamento (Llave *et al.*, 2002; Reinhart *et al.*, 2002, Chen *et al.*, 2009). Técnicas que envolvam a utilização de ambos siRNA e miRNA foram desenvolvidas para se estudar a função gênica por genética reversa (Lu *et al.*, 2003; Kusaba, 2004; Tenllado *et al.*, 2004; Watson *et al.*, 2005).

O silenciamento de RNA pode ser induzido em plantas como resultado da infecção por vírus, um processo denominado “silenciamento gênico induzido por vírus” (*virus induced gene silencing* – VIGS; Dalmay *et al.*, 2000; Ratcliff *et al.*, 1997). VIGS tem sido explorado como uma tecnologia eficaz e rápida de inativação gênica e é largamente utilizada para definir as funções dos genes (Robertson, 2004). Esta técnica evita a transformação estável de plantas e os fenótipos resultantes do silenciamento específico de genes podem ser facilmente observados dentro de 3 a 4 semanas.

Muitos vírus de plantas, incluindo os begomovírus, têm sido utilizados com sucesso para a construção de vetores de silenciamento funcionais derivados de genomas virais que operam em diversas espécies de plantas (Kjemtrup *et al.*, 1998; Fofana *et al.*, 2004; Godge *et al.*, 2008). Contudo,

existem poucos vetores eficientes para a inoculação em leguminosas, como plantas de soja e feijão (Senthil-Kumaret *et al.*, 2008).

Devido a dificuldade inerente de transformação estável em soja, a construção de um vetor funcional, baseado na modificação do genoma de um vírus que infecta cultivares de soja, seria extremamente útil no estudo da expressão de genes de soja. Isto permitiria um avanço no conhecimento básico de funções gênicas desconhecidas e na consequente seleção de genes de interesse para o melhoramento genético desta cultura de elevada importância econômica em todo o mundo, principalmente no Brasil.

Muito se sabe sobre a expressão e função de genes em plantas-modelo como *Arabidopsis thaliana*. Entretanto, frequentemente têm sido observada uma perda na conservação funcional entre genes de *Arabidopsis* e seus homólogos de outras plantas, fazendo-se necessário o desenvolvimento de ferramentas para o estudo da expressão gênica em diferentes cultivares. Para se desenvolverem estratégias de controle eficientes contra patógenos, por exemplo, é preciso se obter o conhecimento básico dos mecanismos que estão envolvidos na interação patógeno-hospedeiro, incluindo as vias de sinalização a diferentes tipos de estresses. Portanto, torna-se extremamente relevante o estabelecimento de novas ferramentas moleculares que permitam o estudo de genes em diferentes cultivares como fonte de prospecção de genes de interesse biotecnológico.

Com base nas considerações anteriores, o presente projeto de pesquisa teve como objetivos isolar um begomovírus presente na cultura de soja e construir um vetor de silenciamento viral derivado da modificação de seu genoma para expressar siRNAs com a função de induzir o silenciamento de genes específicos. A presente investigação possibilitou a construção de uma ferramenta molecular útil para estudos funcionais de genes de soja no seu sistema homólogo.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Família *Geminiviridae*

Os vírus de plantas classificados na família *Geminiviridae* são caracterizados pelo genoma de DNA circular de fita simples (ssDNA) com aproximadamente 2.500 a 3.000 nucleotídeos, encapsidado por uma única proteína capsidial (CP). A proteína do capsídeo se arranja na forma de 22 capsômeros formando dois icosaedros incompletos geminados, com cerca de 18 x 30 nm (Stanley *et al.*, 2005). Os geminivírus exibem uma considerável diversidade em termos de organização genômica, gama de hospedeiros e insetos vetores. Este nível de diversidade sugere uma longa história evolutiva e uma notável flexibilidade na evolução do genoma (Rojas *et al.*, 2005).

A família *Geminiviridae* é constituída pelos gêneros *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus* e *Topocuvirus*. Os critérios para a classificação das espécies nestes gêneros incluem o tipo de inseto vetor, a gama de hospedeiros, a organização e número de componentes genômicos, e o relacionamento filogenético (Fauquet *et al.*, 2008). O gênero *Mastrevirus* engloba os geminivírus que apresentam apenas um componente genômico e são transmitidos por diversas espécies de cigarrinhas (Homoptera:Cicadellidae) a plantas monocotiledôneas. A espécie-tipo é o *Maize streak virus* (MSV). O gênero *Curtovirus* inclui geminivírus com um componente genômico transmitidos por diferentes espécies de cigarrinhas (Homoptera:Cicadellidae) a plantas dicotiledôneas. O *Beet curly top virus* (BCTV) é a espécie-tipo e a mais importante economicamente. O gênero *Topocuvirus* possui apenas uma espécie, denominada *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV), com um componente genômico e transmitido pelo membracídeo *Micrutalis malleifera* (Homoptera:Auchenorrhyncha) a espécies dicotiledôneas. O gênero *Begomovirus* possui espécies transmitidas pelos diferentes biótipos de *Bemisia tabaci* a plantas dicotiledôneas, e que apresentam um ou dois componentes

genômicos (Stanley *et al.*, 2005). Esse gênero apresenta o maior número de espécies da família *Geminiviridae*. Entre os begomovírus de maior importância econômica pode-se citar o *Bean golden mosaic virus* (BGMV), o *African cassava mosaic virus* (ACMV) e o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV; Pita *et al.*, 2001; Potter *et al.*, 2003; Monci *et al.*, 2002).

Os begomovírus pertencentes ao “Velho Mundo” (Europa, Ásia e África) apresentam em sua maioria um componente genômico (monossegmentados), e estão normalmente associados a moléculas de ssDNA circular conhecidas como DNA-1 (alfassatélites) e DNA β (betassatélites; Briddon *et al.*, 2003; Briddon *et al.*, 2006). Os betassatélites necessitam do vírus auxiliar para a sua replicação, encapsidação, transmissão pelo inseto vetor e movimento na planta. Os betassatélites contêm uma ORF, β C1, que codifica uma proteína responsável pela indução de sintomas e que atua como supressora do silenciamento gênico pós-transcricional (Briddon *et al.*, 2006). Os alfassatélites são similares ao componente genômico denominado DNA-R dos nanovírus, os quais possuem uma ORF que codifica uma proteína associada à replicação (Rep), seguida de uma região rica em adenina e uma estrutura em forma de grampo onde está inserida a origem de replicação (Briddon *et al.*, 2006). Portanto, os alfassatélites podem se replicar de forma autônoma, mas necessitam do vírus auxiliar para se movimentarem na planta e serem transmitidos pelo inseto vetor (Saunders *et al.*, 2000; Saunders *et al.*, 2002). Nos últimos anos, foram identificados, no Brasil e na Venezuela, alfassatélites associados aos begomovírus bissegmentados *Cleome leaf crumple virus* (CILCrV), *Euphorbia mosaic virus* (EuMV) e *Melon chlorotic mosaic virus* (MeCMV), estes sendo os primeiros relatos de DNAs satélites associados a begomovírus no “Novo Mundo” (Américas; Paprotka *et al.*, 2010; Romy *et al.*, 2010). A ocorrência de alfassatélites em plantas infectadas com o complexo begomovírus-betassatélite pode diminuir o título do vírus e/ou do betassatélite e possivelmente atenuar os sintomas (Wu e Zhou, 2005) e tem

sido mostrado que a proteína Rep pode apresentar atividade de supressão do silenciamento gênico (Nawaz-ul-Rehman *et al.*, 2010).

Os begomovírus encontrados no “Novo Mundo” possuem genoma dividido em dois componentes denominados DNA-A e DNA-B, ambos com aproximadamente 2600 nucleotídeos. No DNA-A, encontram-se os genes codificadores das proteínas responsáveis pela replicação viral e encapsidação. O DNA-B possui genes codificadores das proteínas de movimento célula-a-célula e longa distância do vírus na planta (Rojas *et al.*, 2005). Ambos os componentes são necessários para a infecção sistêmica de plantas e com exceção da região de aproximadamente 200 nucleotídeos, denominada região comum (RC), os dois componentes não apresentam identidade em suas sequências de nucleotídeos. A RC contém a origem de replicação (*ori*) dos geminivírus, que inclui diversos elementos de sequência altamente conservados entre as diferentes espécies do gênero e que são reconhecidos pela proteína Rep (Argüello-Astorga *et al.*, 1994; Fontes *et al.*, 1994). A partir da região intergênica os genes virais divergem no sentido viral e complementar. Desta forma, a transcrição é bidirecional em cada componente, com um gene sendo transcrito no sentido viral e três no sentido complementar para o DNA-A, ao passo que, no DNA-B, um gene é transcrito no sentido viral e outro no sentido complementar (Figura 1).

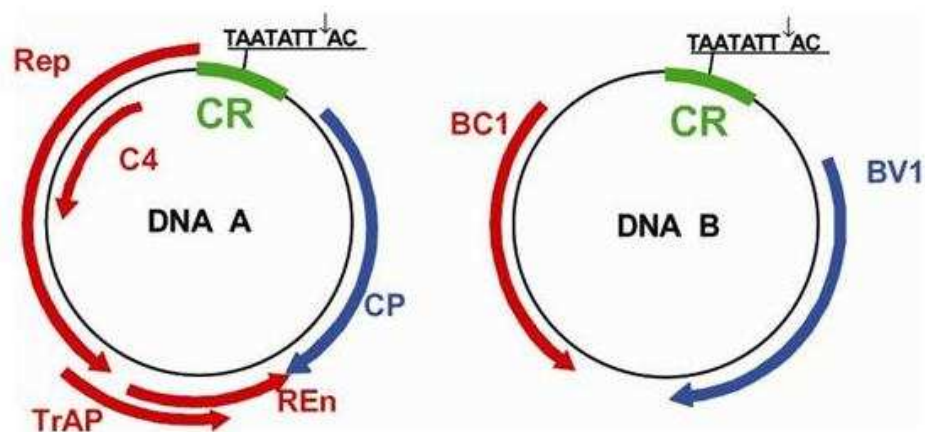


Figura 1. Representação esquemática do genoma do *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV), espécie-tipo do gênero *Begomovirus*. Os círculos representam o genoma viral, com dois componentes (DNA-A e DNA-B) de aproximadamente 2.600 nucleotídeos cada. Uma sequência de aproximadamente 200 nucleotídeos denominada região comum (CR) contém a origem de replicação viral, com uma estrutura em forma de grampo característica contendo a sequência invariável de nove nucleotídeos (TAATATT↓AC), conservada em todos os membros da família *Geminiviridae*. A seta (↓) indica o sítio de início da replicação do DNA viral por círculo rolante. As setas azuis e vermelhas indicam os genes virais e a direção em que ocorre a transcrição (viral e complementar, respectivamente). Reproduzido de Gutierrez *et al.* (2004).

As espécies do gênero *Begomovirus* têm o potencial de codificar de quatro a seis proteínas no DNA-A: uma proteína associada à replicação (REP, “replication-associated protein”, anteriormente denominada AC1 ou AL1), com propriedades de ligação a ácidos nucleicos, endonuclease, ATPase e iniciadora do mecanismo de replicação por círculo rolante; uma proteína transativadora (TrAP, “trans-activating protein”, anteriormente denominada AC2 ou AL2), que funciona *in trans* para ativar a transcrição dos genes *CP* e *NSP* e que também atua como supressora de silenciamento (Voinnet *et al.*, 1999); a proteína REN

("replication-enhancer protein", anteriormente denominada AC3 ou AL3), fator acessório (não essencial) de amplificação da replicação viral; e a proteína capsidial (CP, "coat protein", anteriormente AV1 ou AR1), essencial para a transmissão do vírus pelo inseto vetor (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). Alguns begomovírus codificam a proteína AC4, que também está envolvida na supressão de silenciamento gênico (Vanitharani *et al.*, 2004). O DNA-B codifica as proteínas MP ("movement protein", anteriormente BC1 ou BL1), envolvida no movimento célula-a-célula do vírus por meio do aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas, e a proteína NSP ("nuclear shuttle protein", anteriormente BV1 ou BR1), responsável pelo transporte do DNA através do envelope nuclear (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999).

Os begomovírus estão entre os vírus mais bem caracterizados do ponto de vista molecular. Os atributos que permitiram o progresso nesses tipos de estudos incluem: (a) genoma de DNA de tamanho reduzido; (b) replicação por meio de um intermediário de DNA fita dupla (dsDNA), facilmente manipulável pelos métodos padrão de clonagem; e (c) desenvolvimento de métodos de inoculação independentes do inseto vetor. Estas características têm feito com que os begomovírus sejam utilizados como uma ferramenta para o estudo da replicação do DNA e da regulação da expressão gênica em plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999; Hanley-Bowdoin *et al.*, 2004; Rojas *et al.*, 2005). Pelo fato de os begomovírus produzirem um grande número de cópias de replicons extracromossomais, o potencial de utilização destes para a expressão ou silenciamento de genes endógenos das plantas também tem gerado interesse considerável (Robertson, 2004).

2.2. Replicação viral

As partículas virais são inoculadas na planta pelo inseto vetor e o genoma viral (ssDNA) se desassocia de forma espontânea do capsídeo (Lazarowitz, 1992; Palmer *et al.*, 1998). No interior da célula, o ssDNA viral é transportado até o núcleo, onde é convertido em uma molécula de DNA fita dupla denominado forma replicativa (RF), que servirá de molde para síntese de fitas de DNA contendo várias cópias do genoma viral (concatâmeros), via mecanismo de círculo rolante. A maneira como esta conversão ocorre não é conhecida, entretanto, evidências indiretas indicam que é realizada por fatores do hospedeiro (Stanley, 1995).

A origem de replicação (*ori*) está localizada na região intergênica comum entre os dois componentes genômicos. A sequência da *ori* se mantém conservada entre componentes de um mesmo vírus; entretanto, se mostra variável entre espécies, com exceção de uma região de aproximadamente 30 nucleotídeos conservada entre as espécies (Lazarowitz, 1992). Nesta região, localiza-se uma sequência repetida e invertida composta predominantemente por guanina e citosina, formando uma estrutura conservada em forma de grampo ("structurally-conserved element", SCE), com uma sequência invariável (5'-TAATATTAC-3'), que constitui o domínio funcional da origem de replicação (Orozco *et al.*, 1998). É nesta sequência conservada que ocorre a clivagem (TAATATT↓AC) que inicia o processo de replicação por círculo rolante (Laufs *et al.*, 1995). A clivagem é realizada pela proteína Rep, que funciona como endonuclease sítio-específica com requerimento de estrutura e sequência (Laufs *et al.*, 1995; Orozco *et al.*, 1998). Na região comum também encontram-se as sequências específicas para ligação da proteína Rep (Fontes *et al.*, 1992; Fontes *et al.*, 1994) e regiões promotoras da RNA polimerase tipo II de plantas, responsável pela transcrição dos genes virais (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999).

O sítio de ligação de Rep ao DNA viral está localizado entre a caixa TATA do gene *Rep* e a SCE (Orozco *et al.*, 1998), sendo constituído por duas sequências em repetição direta e uma repetição invertida (“iterons”; Argüello-Astorga *et al.*, 1994). A ligação de Rep aos iterons é essencial para o início da replicação. Depois que Rep se liga ao DNA viral e estabiliza o complexo formado por Rep, Ren e fatores do hospedeiro, a proteína Rep cliva o nonanucleotídeo localizado na SCE, dando início à replicação por círculo rolante (Gutierrez, 1999). O reconhecimento do sítio de ligação ou iteron pela proteína Rep é considerado vírus-específico (Argüello-Astorga *et al.*, 1994; Harrison e Robinson, 1999; Ramos *et al.*, 2003), de modo que Rep só inicia a replicação de DNAs cognatos. Porém, alguns trabalhos demonstram que durante infecções mistas, ocasionalmente a proteína Rep codificada por um vírus pode replicar o DNA-B de outro vírus, fenômeno designado como pseudo-recombinação. Por exemplo, observou-se a formação de pseudorecombinante viável entre *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) DNA-A e o *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) DNA-B, os quais apresentam divergência na sequência dos iterons (Andrade *et al.*, 2006). Também foi demonstrado a ocorrência de um pseudorecombinante mais virulento, formado entre duas espécies distintas de begomovírus (*Tomato leaf curl New Delhi virus* – ToLCNDV e *Tomato leaf curl Gujarat virus* – ToLCGV) (Chakraborty *et al.*, 2008).

2.3. Movimento do vírus na planta

A infecção sistêmica da planta depende não somente da replicação viral na célula inicialmente infectada, mas também da capacidade do vírus mover-se célula-a-célula para que possa se espalhar por toda a planta e estabelecer a infecção sistêmica. Esse movimento do vírus no interior do hospedeiro pode ser dividido em dois processos: movimento célula-a-célula via plasmodesmas, e

movimento a longa distância, no qual o vírus atinge o sistema vascular e é transportado sistemicamente para toda a planta.

Uma vez que os begomovírus replicam no núcleo da célula hospedeira, necessitam de uma etapa adicional de transporte do DNA viral do núcleo para o citoplasma, mediada pela proteína NSP (Palmer *et al.*, 1998). Recentemente, foi demonstrado que uma proteína celular denominada NIG (*NSP-interacting GTPase*) liga-se *in vitro* e *in vivo* com NSP de begomovírus, atuando como um possível cofator para NSP no transporte nucleocitoplasmático do DNA viral (Carvalho *et al.*, 2008). A proteína MP associa-se à membrana celular e altera o limite de exclusão dos plasmodesmas, viabilizando o transporte do genoma viral célula-à-célula (Noueiry *et al.*, 1994). Essas duas proteínas de movimento atuam de forma conjunta permitindo o tráfego intra e intercelular do DNA viral (Sanderfoot *et al.*, 1995), o que possibilita ao vírus infectar sistemicamente o hospedeiro.

Muitos modelos propostos para o movimento do vírus na planta conduzem à idéia da interação física entre as proteínas MP e NSP (Rojas *et al.*, 2005). A interação direta entre as proteínas MP e NSP foi demonstrada *in vitro* para o TGMV, pelo sistema duplo-híbrido de levedura (Mariano *et al.*, 2004), e *in vivo* para o *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV; Carvalho *et al.*, 2008).

Existem dois modelos propostos para explicar o movimento intracelular de begomovírus (Levy e Tzfira, 2010). O primeiro modelo proposto, denominado “couple-skating” (Kleinow *et al.*, 2008), preconiza que NSP transporta ssDNA ou dsDNA do núcleo para a periferia da célula e, no citoplasma, MP atua nos plasmodesmas para facilitar o movimento célula-a-célula do complexo NSP-DNA (Kleinow *et al.*, 2008; Frischmuth *et al.*, 2007; Frischmuth *et al.*, 2004; Sanderfoot *et al.*, 1995). O segundo modelo, conhecido como “relay-race”, foi proposto baseado em experimentos de microinjeção e ensaios de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA) utilizando *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV). Neste modelo,

NSP inicialmente transporta o dsDNA do núcleo para o citoplasma e, uma vez no citoplasma, o dsDNA se associa a MP, e o complexo MP-dsDNA se movimenta célula-a-célula através dos plasmodesmas (Noueiry *et al.*, 1994; Rojas *et al.*, 1998).

No caso dos gêneros *Mastrevirus*, *Curtovirus* e para os begomovírus monossegmentados, a proteína CP é necessária para os movimentos célula-a-célula e a longa distância (Rojas *et al.*, 2001). Para os begomovírus monossegmentados, além da CP, as proteínas V1 e C4 são também necessárias para o movimento. No caso de *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), a CP é responsável pelo transporte do DNA do núcleo para o citoplasma, funcionando como uma proteína análoga à NSP dos begomovírus bissegmentados, e o movimento célula-a-célula através dos plasmodesmas é mediado pelas proteínas C4 e/ou V1 (Rojas *et al.*, 2005; Rojas *et al.*, 2001). Também foi demonstrado que a proteína C4 do curtovírus *Beet severe curly top virus* (BSCTV) é capaz de se ligar de forma não específica a ssDNA e a dsDNA, é essencial para o desenvolvimento de sintomas, e quando expressa em plantas infectadas com mutantes deficientes para C4 pode complementar *in trans* o movimento sistêmico. Coletivamente, esses resultados sugerem o envolvimento de C4 no movimento de BSCTV (Teng *et al.*, 2010).

Na maioria dos casos analisados, já foi demonstrado que a proteína CP dos begomovírus bissegmentados é dispensável para o estabelecimento da infecção sistêmica (Rojas *et al.*, 2005). No caso dos begomovírus, MP e NSP reconhecem o DNA viral de maneira específica com relação à forma e comprimento (Gilbertson *et al.*, 2003; Rojas *et al.*, 1998), o que eliminaria a necessidade da proteína capsidial para o movimento a longa distância. Algumas exceções, como o begomovírus bissegmentado *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), são capazes de infectar sistemicamente alguns hospedeiros na ausência do DNA-B cognato (Galvão *et al.*, 2003; Fontenelle *et al.*, 2007). Nestes

casos específicos, provavelmente, a proteína do capsídio e a proteína AC4 podem estar contribuindo para o movimento sistêmico do DNA-A.

2.4. Infecção por begomovírus na cultura de soja

A importância econômica da soja (*Glycine max*), nos dias atuais, é indiscutível, principalmente em países produtores e exportadores como os Estados Unidos e o Brasil, onde a soja tem importante impacto na balança comercial. A soja é uma cultura de clima temperado que se expandiu no Brasil após anos de melhoramento genético que geraram cultivares adaptados às regiões subtropicais e tropicais (Sediyama *et al.*, 1981).

A planta de soja é infectada naturalmente por diferentes vírus, representantes de diferentes grupos taxonômicos e transmitidos por diferentes insetos vetores. A mosca-branca *Bemisia tabaci* foi, por muito tempo, considerada praga ocasional em soja no Brasil. Todavia, o biótipo B de *B.tabaci* introduzido no início da década de 90 vem se tornando mais importante a cada ano. A soja constitui um excelente hospedeiro para a mosca-branca (Menten e Roston, 1980), espécie vetora de begomovírus e de algumas espécies dos gêneros *Carlavirus* (Família *Alfalflexiviridae*; Naidu *et al.*, 1998), e *Ipomovirus* (família *Potyviridae*; Valverde *et al.*, 2004).

Uma das espécies de begomovírus que infectam a soja é o vírus do mosaico dourado do feijoeiro (*Bean golden mosaic virus*, BGMV), responsável por grandes perdas na cultura do feijoeiro (Faria, 1994). A primeira descrição da doença causada por BGMV se deu a partir de feijoeiros infectados no estado de São Paulo (Costa, 1965). O primeiro relato deste vírus infectando soja em condições de campo ocorreu em 1978 (Costa *et al.*, 1979).

Além do BGMV, há relatos de infecção natural de soja por dois outros begomovírus, o *Euphorbia mosaic virus* (EUMV) e o *Abutilon mosaic virus* (AbMV) (Costa, 1955). Entretanto, estes relatos foram baseados exclusivamente

na observação de sintomas macroscópicos e na transmissão pelo inseto vetor. Apesar da impossibilidade da confirmação da espécie viral em questão, a transmissão por mosca-branca sugeria que os vírus pertenciam ao gênero *Begomovirus*.

Apesar da ocorrência constante de BGMV infectando feijão, infecções por begomovírus em soja no Brasil não são comuns. Existem relatos esporádicos desde a década de 1980, sendo que um dos relatos mais recentes data do ano de 2002, onde foi feito um levantamento de begomovírus associados à soja e identificou-se a espécie *Sida mottle virus* (SiMoV) infectando essa cultura no Brasil (Mello *et al.*, 2002). O último relato de infecção por begomovírus em soja ocorreu em 2009. Três distintos begomovírus, *Bean golden mosaic virus*, *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV) e *Okra mottle virus* (OMoV), foram detectados em amostras de folhas de soja sintomáticas, coletadas na região de Santo Antonio de Goiás, Goiás (Fernandes *et al.*, 2009). Este cenário de infecção de soja por begomovírus está em contraste com a situação da Argentina, onde a região noroeste (províncias de Tucumán, Salta, Jujuy, Santiago Del Estero e Catamarca) sofre com elevada incidência de moscas-brancas, sendo comum a detecção de begomovírus em soja (Vizcarret, 1999). Esta região a principal produtora de feijão do país e uma das mais importantes regiões produtora de soja. Uma das primeiras ocorrências de begomovírus nas lavouras de soja na região noroeste da Argentina foi relatada em 1997 (Sakai *et al.*, 1997). A caracterização molecular parcial do agente etiológico demonstrou que um vírus relacionado com o *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) estava envolvido com a doença (Rodríguez-Pardina *et al.*, 1998). Rodríguez-Pardina *et al.* (2006) estudaram a diversidade genética de begomovírus associados à soja, feijão e plantas daninhas associadas na região noroeste da Argentina, e os resultados indicaram a presença de quatro espécies de begomovírus, todas relacionadas às espécies do Novo Mundo. Das quatro espécies encontradas, uma apresentava

elevada identidade nucleotídica com o *Bean golden mosaic virus* (BGMV) detectado em feijoeiro, duas outras apresentavam menos de 89% de identidade com os demais begomovírus, sugerindo-se tratar de novas espécies e a de maior incidência, encontrada em 94% das amostras de feijoeiro e soja e em duas amostras de plantas daninhas, apresentou identidade de sequência e relacionamento filogenético com o *Sida mottle virus* (SiMoV).

Um dos relatos mais recentes de infecção por begomovírus em soja no mundo, data do ano de 2010 na Nigéria, sendo que dois novos vírus naturalmente infectando soja foram caracterizados molecularmente (Alabi *et al.*, 2010). Com base em sintomas desenvolvidos na soja, os dois vírus foram provisoriamente designados como Soybean mild mottle virus (SbMMV) e Soybean chlorotic blotch virus (SbCBV). SbCBV tem um genoma bissegmentado, enquanto que o único componente genômico clonado de SbMMV tem a organização de um vírus monossegmentado. O componente do SbMMV tem 2.768 nucleotídeos (nt) de comprimento e o DNA-A e DNA-B do SbCBV tem 2.708 e 2.647 nt de comprimento, respectivamente. Uma vez que a cultura da soja foi introduzida, a identificação de dois begomovírus infectando naturalmente plantas de soja na Nigéria sugere a ocorrência de espécies de begomovírus em plantas indígenas da África, ressaltando uma ameaça potencial para o cultivo sustentável de soja no continente Africano (Alabi *et al.*, 2010).

2.5. VIGS (*virus induced gene silencing*)

O silenciamento de RNA ou silenciamento gênico pós-transcricional (*post-transcriptional gene silencing*, PTGS) é um mecanismo pelo qual a planta degrada de forma específica um determinado mRNA, bloqueando a expressão do gene sem afetar sua taxa de transcrição (Baulcombe, 2004). Existem duas vias do silenciamento de RNA distintas, a via do siRNA (short interfering RNA) e a via do miRNA (micro RNA). A primeira tem um importante papel na defesa

contra vírus e transposons e a segunda está envolvida com o controle da expressão gênica (Baulcombe, 2004). Na via do silenciamento endógeno (miRNAs), o RNA fita dupla, formado no núcleo (Pri-miRNA), será processado pela DCL1 (RNase III DICER-Like1) em associação com HYL1 (HYPONASTIC LEAVES1) e SE (SERRATE) em Pre-miRNA e, posteriormente, em miRNA. Os miRNAs, após a metilação nas extremidades 3'OH por HEN1, serão transportados para o citoplasma pela proteína HASTY. No citoplasma, uma das fitas de miRNA será incorporada ao complexo RISC ("RNA-induced silencing complex"), acarretando o silenciamento de genes endógenos pela degradação do mRNA alvo. Na via de silenciamento do siRNA, a resposta antiviral da planta é iniciada quando a proteína DCL, com o auxílio de HYL1, cliva o RNA viral fita dupla (dsRNA) em pequenos RNAs designados siRNAs, de 21 a 24 nucleotídeos, no citoplasma da planta. Uma única fita de RNA é incorporada ao RISC, do qual AGO1 faz parte, que é guiada para reconhecer e degradar RNAs complementares ao RNA que gerou os siRNAs (Ding e Voinnet, 2007).

Uma vez que a própria replicação viral ativa o silenciamento de RNA, a inserção no genoma viral de um fragmento de um gene não silenciado (endógeno ou transgene) irá levar ao silenciamento do gene correspondente na planta. Esta forma de induzir o silenciamento por meio da replicação viral foi denominada silenciamento gênico induzido por vírus (*virus induced gene silencing*, VIGS; Kumagai *et al.*, 1995; Ruiz *et al.*, 1998).

Inúmeros genomas virais já foram manipulados para funcionarem como vetores VIGS. Os mais utilizados incluem o potexvírus *Potato virus X* (PVX; Angell e Baulcombe, 1999), os tobravírus *Tobacco rattle virus* (TRV; Ratcliff *et al.*, 2001) e *Pea early browning virus* (PEBV; Constatin *et al.*, 2004), e os begomovírus *Tomato golden mosaic virus* (TGMV; Kjemtrup *et al.*, 1998), *Cabbage leaf curl virus* (CbLCV; Turnage *et al.*, 2002) e *African cassava mosaic virus* (ACMV; Fofana *et al.*, 2004). No entanto, os sintomas causados pela

infecção viral podem interferir com a interpretação do fenótipo resultante do silenciamento do gene contido no genoma viral.

A eficiência do VIGS depende de variáveis ambientais. Por exemplo, plantas cultivadas em temperaturas mais elevadas mostram uma resposta mais forte ao silenciamento (Meza *et al.*, 2001; Szittya *et al.*, 2003). Já o silenciamento em *arabidopsis* é mais eficaz em dias curtos (Turnage *et al.*, 2002). Estas e outras variáveis ambientais são mais fáceis de resolver quando se utiliza um gene-alvo com um fenótipo visual previsto ou quantificável como controle positivo do silenciamento. *GSA* (*glutamato 1-semialdeído aminotransferase*), *PDS* (*fitoeno dessaturase*), *ChlI* (*magnesium chelatase subunidade I*) e *ChlH* (*magnesium chelatase subunidade H*) são genes que possuem fenótipos visuais após o silenciamento (Bender e Fink, 1995; Hofgen *et al.*, 1994; Jeddeloh *et al.*, 1998). O gene *PDS* é um dos mais usados para demonstrar a eficácia do VIGS (Demming-Adams e Adams, 1992). Esse gene participa da via metabólica dos carotenóides, que atua sobre o complexo antena das membranas dos tilacóides, e protege a clorofila da fotooxidação. O silenciamento deste gene resulta em uma diminuição drástica no teor de caroteno da folha, levando a um fotobranqueamento que é um sintoma facilmente detectado (Ruiz *et al.*, 1998; Ratcliff *et al.*, 2001; Holzberg *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002; Turnage *et al.*, 2002).

Existem muitos aspectos interessantes a respeito do silenciamento de RNA mediado por VIGS. Por exemplo, a inoculação em plantas de *N.benthamiana* com o PVX modificado para expressar o gene *PDS* (PVX-PDS), leva ao silenciamento da cópia endógena do gene *PDS*, resultando em um fenótipo de branqueamento dos tecidos foliares (Ruiz *et al.*, 1998). A redução no acúmulo de mRNA chega a 95% aos 24 dias após a inoculação (dpi). Surpreendentemente, apesar da degradação do mRNA do gene *PDS*, o mesmo não aconteceu com o RNA genômico do PVX-PDS, que no mesmo período atingiu níveis ligeiramente inferiores ao do PVX selvagem, permanecendo assim

até 45 dpi. Estas observações levaram os pesquisadores a concluir que o PVX-PDS não estava sendo alvo do silenciamento induzido por ele próprio (Ruiz *et al.*, 1998). O contrário foi observado quando VIGS foi direcionado a um transgene. Ao ser inoculado em plantas de *N. benthamiana* transgênicas expressando GFP, o PVX-GFP levou a ativação do silenciamento resultando na degradação total do mRNA do GFP e também do RNA do PVX-GFP, ao ponto de não ser possível detectá-lo 20 dias após a inoculação (Ruiz *et al.*, 1998). Entretanto, as razões para as diferenças observadas entre VIGS direcionado a um gene endógeno ou a um transgene ainda precisam ser elucidadas.

É amplamente conhecido que VIGS pode ocorrer por cerca de 3 semanas. Algumas evidências na literatura mostram que a duração do VIGS pode ser prolongada por até 3 meses. Recentemente, três genes (*PDS*, *ChlH* e *CpTF-TuB*) que provocam fenótipos visíveis em plantas silenciadas foram utilizados para estudar a persistência e transmissão de VIGS para a progênie em duas espécies de planta, *Nicotiana benthamiana* e tomate. Usando um vetor derivado no genoma do *Tobacco rattle virus* (TRV), estes estudos demonstraram que a duração do silenciamento gênico induzido por vírus pode ocorrer por mais de dois anos e que o TRV é necessário para a longa duração do VIGS. Além disso, foi também demonstrado que a transmissão de VIGS de mudas para a progênie ocorre via sementes (Senthil-Kumar e Mysore, 2011). Consequentemente, estes vetores derivados de TRV poderão ser particularmente relevantes para o estudo detalhado de genes-alvos envolvidos no desenvolvimento e tolerância ao estresse das plantas que requerem um período longo de silenciamento. Similarmente, a demonstração de transmissão de VIGS à progênie poderá ser útil na análise do efeito do silenciamento gênico em mudas jovens.

Diante da relevância e aplicabilidade do tema, o silenciamento de RNA vem sendo intensamente estudado em plantas, fungos e animais (Ding *et al.*, 2004; Susi *et al.*, 2004). VIGS tem sido utilizado como uma importante

ferramenta na análise funcional de genes em plantas (Burch-Smith *et al.*, 2004; Waterhouse e Helliwell, 2003). Esta é uma técnica que oferece grandes vantagens por ser mais rápida e permitir a análise de genes em larga escala. Os vetores para VIGS têm sido frequentemente empregados em estudos de genética reversa, sendo promissores para plantas difíceis de serem transformadas, caso estas sejam suscetíveis à infecção viral (Robertson, 2004). Além disso, VIGS permite analisar genes que possuem um fenótipo letal, uma vez que esse sistema normalmente é aplicado em plantas adultas, não havendo morte do embrião como ocorre em sistemas de mutagênese insercional (Baulcombe *et al.*, 1999). Consequentemente, a presente investigação tem como objetivos primordiais caracterizar um begomovírus que infecta soja eficientemente e desenvolver um vetor de silenciamento derivado do genoma do vírus caracterizado.

3-MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolado Viral

Plantas de soja (*Glycine max*) apresentando sintomas típicos de infecção viral foram coletadas na região de Jaíba – MG e cedidas gentilmente pela Dr. Alice Kazuko Inoue Nagata ao Laboratório de Biologia Molecular de Plantas-UFV. Discos foliares de duas plantas sintomáticas foram submetidos à extração de DNA (Dellaporta *et al.*, 1983), dando origem a duas amostras (9253 e 9254) e o DNA foi utilizado como molde para amplificação de fragmentos do genoma viral via PCR, utilizando oligonucleotídeos universais para o gênero *Begomovirus* (PCRc1: 5'-CTA GCT GCA GCA TAT TTA CRA RWA TGC CA 3' e PBL12040: 5'-GCC TCT GCA GCA RTG RTC KAT CTT CAT ACA 3'; Rojas *et al.*, 1993).

3.2. Clonagem e sequenciamento do genoma viral

Os componentes genômicos presentes nas amostras denominadas 9253 e 9254 foram amplificados utilizando-se a enzima DNA polimerase do bacteriófago phi29, do kit TempliPhi (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante. Alíquotas das amplificações foram submetidas a clivagens com as enzimas de restrição *EcoRI*, *KpnI*, *BamHI*, *ApaI* e *SacI* (Promega). Os produtos das reações foram analisados em gel de agarose 1% corado em brometo de etídeo (Figura 2).

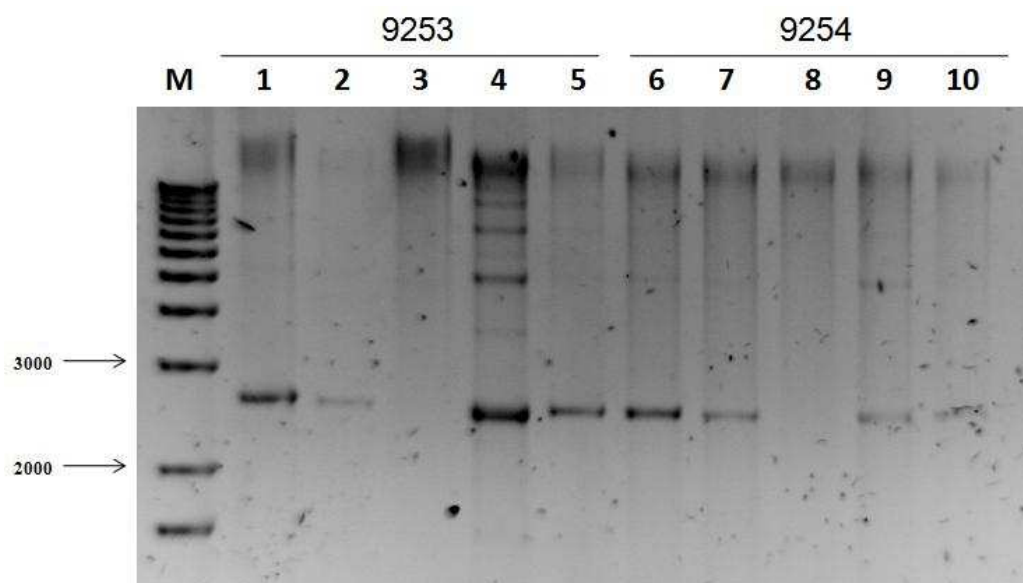


Figura 2. Padrão eletroforético em gel de agarose (1%) da clivagem dos amplicons obtidos por RCA a partir do DNA total das amostras 9253 e 9254. **M**, marcador de comprimento (“1Kb plus DNA ladder”- Invitrogen, em nt); **1-5**, clivagem do amplicon obtido do DNA total da amostra 9253 com as enzimas *Bam*HI, *Eco*RI, *Apa*I, *Sac*I e *Kpn*I respectivamente; **6-10**, clivagem do amplicon obtido do DNA total da amostra 9254 com as enzimas *Bam*HI, *Eco*RI, *Apa*I, *Sac*I e *Kpn*I respectivamente.

Foram selecionadas alíquotas das reações de clivagem com as enzimas *Bam*HI, *Kpn*I e *Sac*I, contendo fragmentos de 2600 nucleotídeos (nt), correspondentes a uma cópia de cada componente genômico, e foram ligadas utilizando a enzima T4 DNA Ligase (Promega) no vetor pBluescript KS+ (Stratagene) previamente linearizado com a mesma enzima e desfosforilado. O produto da reação de ligação foi utilizado para transformação de *Escherichia coli* estirpe DH5α pelo método de choque térmico (Sambrook *et al.*, 2001). Colônias contendo os possíveis plasmídeos recombinantes foram repicadas para meio LB líquido e incubadas a 37°C durante 12 horas. Após a incubação, as culturas foram submetidas à minipreparação de DNA plasmidial pelo método de lise

alcalina (Sambrook *et al.*, 2001) e o DNA resultante foi analisado em gel de agarose 1% corado em brometo de etídeo. Amostras de DNA plasmidial cujo comprimento foi de aproximadamente 5500 nt, correspondente ao vetor plasmidial ligado ao genoma viral, foram submetidas à clivagem com a mesma enzima utilizada para a clonagem e o padrão eletroforético foi analisado em gel de agarose 1% (Figura 3).

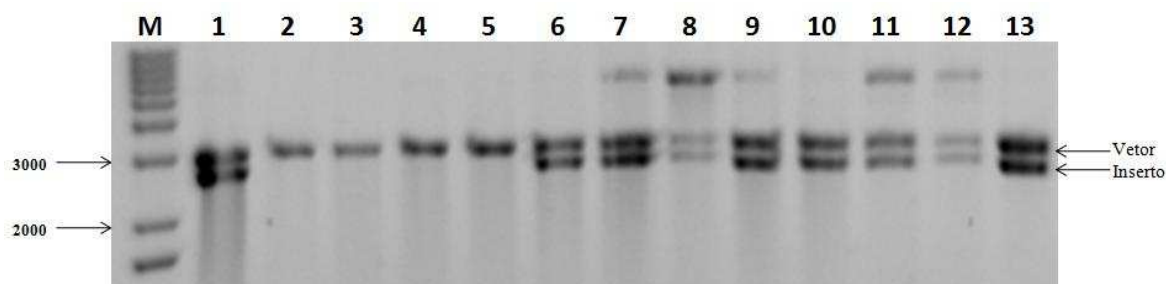


Figura 3. Padrão eletroforético em gel de agarose (1%) da clivagem de DNA plasmidial proveniente da clonagem dos componentes genômicos presentes nas amostras 9253 e 9254. **M**, marcador de comprimento ("1Kb plus DNA ladder"-Invitrogen, em nt); **1**, clivagem com a enzima *Bam*HI de DNA plasmidial obtido a partir da clonagem dos componentes genômicos presentes na amostra 9253; **2-5**, clivagem com a enzima *Kpn*I de DNA plasmidial obtido a partir da clonagem dos componentes genômicos presentes na amostra 9253; **6-13**, clivagem com a enzima *Sac*I de DNA plasmidial obtido a partir da clonagem dos componentes genômicos presentes na amostra 9254.

As amostras que liberaram o fragmento de 2600nt após a digestão, canaletas 1, 6,7,8,9,10,11,12 e 13 (Figura 3), foram digeridas com a enzima de corte frequente *Hae*III para a seleção dos clones a serem sequenciados (Figura 4).

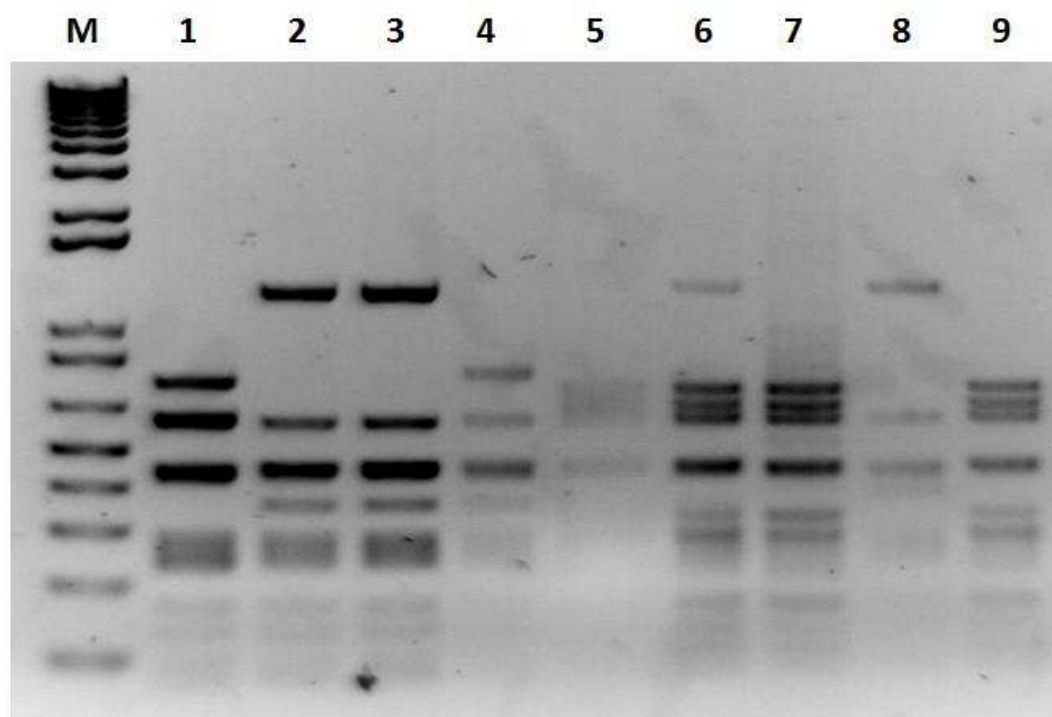


Figura 4. Padrão eletroforético em gel de agarose (1%) da clivagem de DNA plasmidial proveniente da clonagem dos componentes genômicos presentes nas amostras 9253 e 9254. **M**, marcador de comprimento (“1Kb plus DNA ladder”, em nt); **1**, clivagem com a enzima *HaeIII* de DNA plasmidial obtido a partir da clonagem dos componentes genômicos presentes na amostra 9253; **2-9**, clivagem com a enzima *HaeIII* de DNA plasmidial obtido a partir da clonagem dos componentes genômicos presentes na amostra 9254.

Os clones correspondentes as canaletas 1, 3, 4 e 6 (Figura 4), foram selecionados para o sequenciamento pela Macrogen, Inc. (Seul, Coréia do Sul) e foram denominados pUFV1871, pUFV1587, pUFV1872 e pUFV1588, respectivamente.

3.3. Caracterização molecular

As sequências correspondentes ao DNA-A e DNA-B dos isolados selecionados foram analisadas a fim de identificar as ORFs presentes no

genoma viral, utilizando-se o programa ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>). As sequências de nucleotídeos foram comparadas utilizando-se o algoritmo BLASTn. Com base nas sequências de nucleotídeos, alinhamentos múltiplos foram obtidos com o programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), e árvores filogenéticas foram obtidas utilizando-se o programa MEGA 5.0 (Kumar *et al.*, 2004). As sequências utilizadas para a geração das árvores filogenéticas continham em sua maioria espécies de begomovírus das Américas.

3.4. Construção do clone infeccioso

Os quatro clones enviados para o sequenciamento foram denominados pUFV1587, pUFV1588, pUFV1871 e pUFV1872. Os clones pUFV1587, pUFV1871 e pUFV1872 correspondem ao DNA-A da mesma espécie de begomovírus com pequenas variações genéticas entre si. O clone pUFV1588 corresponde ao DNA-B de begomovírus. As sequências de nucleotídeos completa dos clones pUFV1587 e pUFV1588 foram submetidas a análise de restrição utilizando-se o programa DNAMAN versão 6 (Lynnon Corporation). O DNA plasmidial do clone pUFV1587 foi digerido com *Xba*I (Promega), e recircularizado com a enzima T4 DNA ligase. O clone resultante, designado pUFV1589, contém um fragmento de aproximadamente 500 nt que inclui a região comum e a origem e corresponde ao clone “meia-cópia” do DNA-A. Uma cópia completa do DNA-A foi liberada do clone pUFV1587 pela clivagem com a enzima *Sac*I (Promega), o fragmento liberado foi purificado após separação em gel de agarose 1%, e inserido em pUFV1589 previamente digerido com a mesma enzima *Sac*I, gerando o clone multimérico para o DNA-A, denominado pUFV1591.

Para a construção do clone infeccioso para o DNA-B, o DNA plasmidial do clone pUFV1588 foi submetido a clivagem com a enzima *Eco*RV e

reciclarizado produzindo pUFV1590, que contém um fragmento de aproximadamente 800nt, incluindo a região comum e a origem de replicação, e corresponde à “meia-cópia” do DNA-B. Uma cópia completa do DNA-B foi liberada do clone pUFV1588 pela clivagem com a enzima *SacI*, o inserto foi purificado e inserido em pUFV1590 previamente digerido com a mesma enzima *SacI*, gerando o clone multimérico para o DNA-B, denominado pUFV1592.

A confirmação da ligação dos fragmentos de 2600nt em seus respectivos clones “meia-cópia” foi realizada através da clivagem das amostras de DNA plasmidial com as mesmas enzimas utilizadas para clonagem (*XbaI/SacI* e *EcoRV/SacI*; Figura 5) e por sequenciamento pela Macrogen, Inc. (Seul, Coréia do Sul).

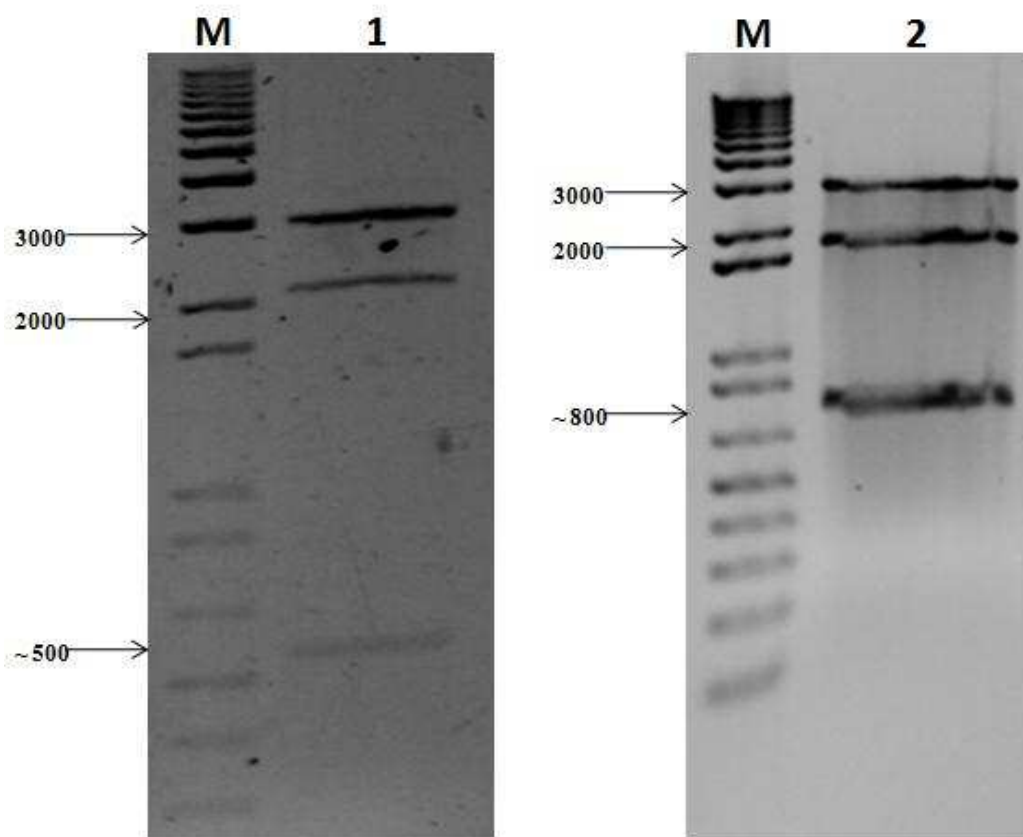


Figura 5. Padrão eletroforético em gel de agarose (1%) dos clones infecciosos. **M**, marcador de comprimento (“1Kb plus DNA ladder”- Invitrogen, em nt); **1**, padrão da clivagem com as enzimas *SacI* e *XbaI* do DNA plasmidial do clone infeccioso pUFV1591; **2**, padrão da clivagem com as enzimas *SacI* e *EcoRV* do DNA plasmidial do clone infeccioso pUFV1592.

3.5. Determinação da gama de hospedeiro

Os clones infecciosos foram inoculados via biobalística (Aragão *et al.*, 1996) em plantas das famílias *Solanaceae* (*Nicotiana rustica*, *N. clevelandii*, *N. debneyi*, *N. glutinosa*, *N. tabacum*, *Solanum lycopersicum* ‘Santa Clara’ e ‘Rutgers’, *Capsicum annuum* ‘Casca Dura Ikeda’), *Fabaceae* (*Glycine max* ‘Conquista’, *Phaseolus vulgaris* ‘Pérola’ e ‘Ouro Negro’), e *Amaranthaceae* (*Chenopodium quinoa*). As plantas inoculadas foram analisadas visualmente para a presença de sintomas, e a infecção viral foi confirmada via PCR (21 dias após a inoculação) utilizando oligonucleotídeos que anelam no DNA-A, específicos para a espécie isolada (SoCSVNcol-R: 5’GGAGCCATGGGCTCCTCCGTTTC3’ e SoCSVMCSF:5’GAAACCATGGAGATCTGTTAACAGCTAGCCGGAACGCAT TATTATTG3’).

3.6. Construção do vetor de silenciamento viral

A sequência parcialmente duplicada do genoma do begomovírus isolado foi previamente clonada no vetor pBluescript KS+ (Stratagene) dando origem aos clones infecciosos pUFV1591 e pUFV1592 (item 3.4) e os clones obtidos foram sequenciados. A sequência do clone pUFV1591 foi analisada quanto ao padrão de restrição utilizando-se o programa ApE-A Plasmid Editor (Figura 6). Foi selecionada a enzima *EcoNI* que cliva na região que codifica a proteína CP (na posição 1357 do mapa de restrição, Figura 6). Após a reação de digestão do

clone pUFV1591 com *Eco*NI (New England Biolabs) foi utilizado o Kit Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) para preenchimento das extensões 5' fita simples geradas. Para a reação de preenchimento, foi utilizado 0,75µl da reação de digestão, dNTPs 0,2 mM de cada nucleotídeo, 0.4 U de Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs), 8µl do tampão 5XPhusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs), totalizando um volume final de 40µl. A reação foi conduzida no termociclador modelo C1000 (Bio-RAD), a temperatura de 72°C por 10 min. Em seguida, o produto da reação foi circularizado usando a enzima T4 DNA Ligase (Promega) segundo as especificações do fabricante, gerando o clone pUFV1712 com interrupção da sequência aberta de leitura da proteína do capsídeo (CP; Figura 7). Para a confirmação dos clones com interrupção da sequência aberta de leitura da proteína CP, foi simulado um padrão de digestão com as enzimas *Bam*HI e *Eco*NI usando o programa ApE-A Plasmid Editor (Figura 8). O DNA plasmidial dos possíveis clones foi digerido com as enzimas *Bam*HI e *Eco*NI e todas as 6 possíveis colônias digeridas apresentaram o padrão esperado (Figura 8). O clone pUFV1712 foi utilizado para inoculação em plantas hospedeiras com o objetivo de confirmar a dispensabilidade da CP para infecção.

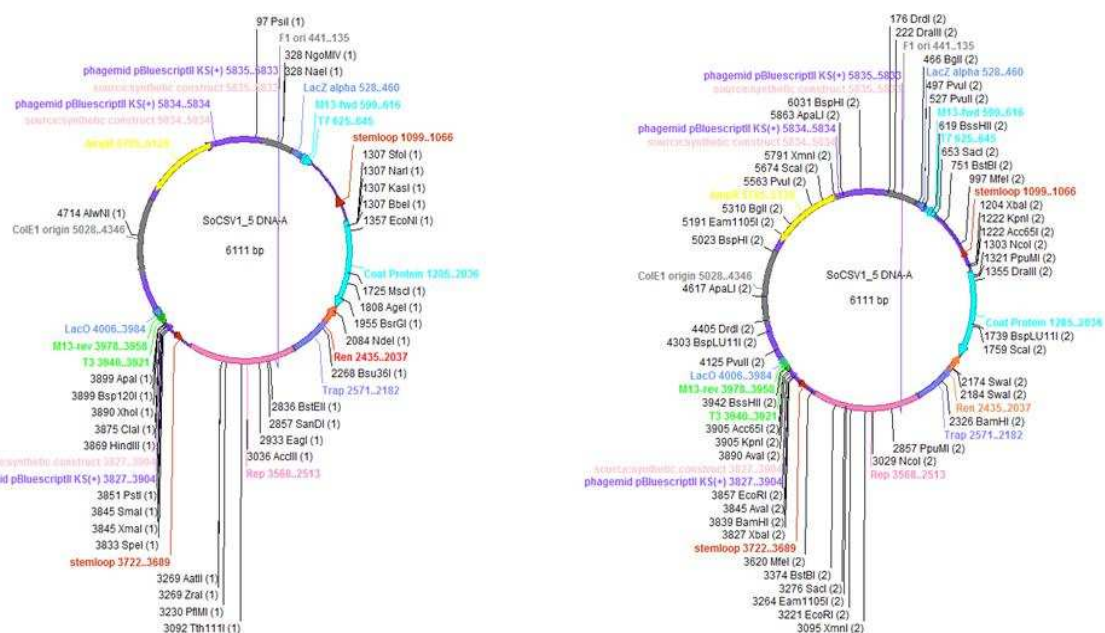


Figura 6. Mapa de restrição do clone infeccioso do DNA-A de SoCSV (pUFV1591). O mapa de restrição foi construído utilizando-se o programa ApE-A Plasmid Editor, e considerando enzimas de restrição com um ou dois sítios de clivagem.

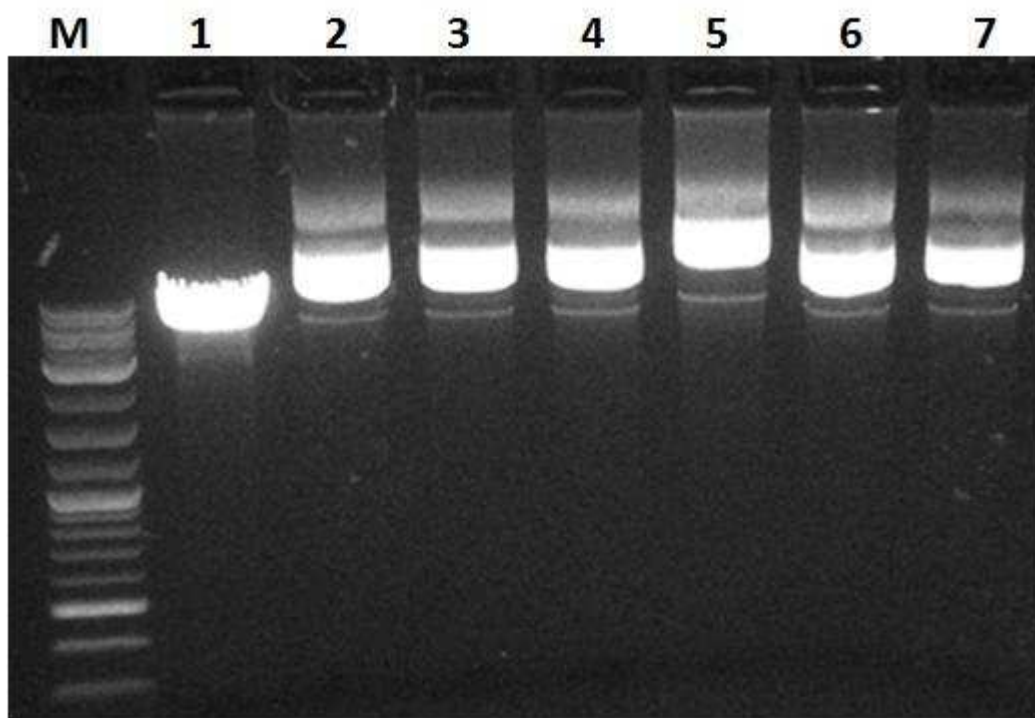


Figura 7. Padrão eletroforético em gel de agarose (1%) das minipreparações de DNA plasmidial obtidas a partir de colônias contendo os possíveis plasmídeos

recombinantes pUFV1712. **M**, marcador de comprimento (“1Kb plus DNA ladder” - Invitrogen, em nt); **1**, controle, DNA plasmidial do clone pUFV1591; **2-7**, minipreparações de DNA plasmidial contendo os possíveis plasmídeos recombinantes.

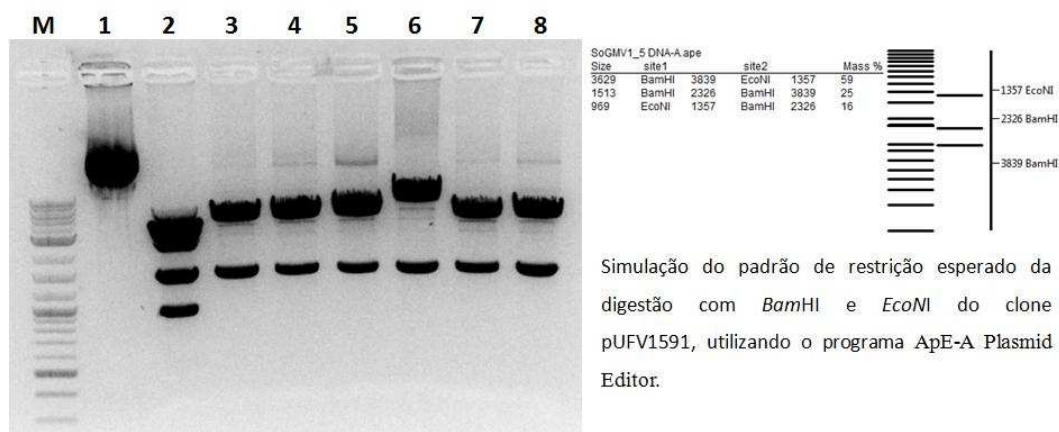


Figura 8. Padrão eletroforético em gel de agarose (1%) da clivagem de DNA plasmidial dos possíveis clones contendo a interrupção da sequência aberta de leitura da proteína CP (pUFV1712). **M**, marcador de comprimento (“1Kb plus DNA ladder”, em nt); **1**, controle, DNA plasmidial do clone pUFV1591; **2**, controle, clivagem com as enzimas *Bam*HI e *Eco*NI do clone pUFV1591; **3-8**, clivagem com as enzimas *Bam*HI e *Eco*NI dos possíveis clones contendo a interrupção da sequência aberta de leitura da proteína CP.

Uma vez confirmada que a proteína CP não é requerida para a infecção viral sistêmica, foi selecionada a enzima *Nco* I para retirar a região do gene que codificada a proteína da CP, pela análise do padrão de restrição do clone pUFV1591 utilizando-se o programa ApE-A Plasmid Editor (Figura 6). A enzima *Nco*I cliva nas sequências do inserto do clone pUFV1591 (nas posições 1303 e 3029 do mapa de restrição, Figura 6), liberando um fragmento de aproximadamente 1726 nt. O clone pUFV1591 foi clivado com a enzima *Nco*I, e

o produto da digestão foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 9). O fragmento correspondente a 4385 nt (pUFV1591 menos o fragmento *NcoI* de 1726pb) foi purificado do gel de agarose usando QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), segundo indicações do fabricante.

Uma vez que durante a reação de clivagem do clone pUFV1591 com *NcoI*, foi liberada uma grande parte da região que codifica a CP, mas também foi retirada a região que codifica as proteínas Ren e Trap e uma parte da sequência que codifica a proteína Rep, foram desenhados primers para amplificação das regiões perdidas e para inserção de um sítio múltiplo de clonagem (em vermelho) (SoCSVN*NcoI*-R:5'GGAGCCATGGGCTCCTCCGTTTC3' e SoCSVMCSF:5'GAAACCATGGAGATCTGTAAACAGCTAGCCGGAAAACGCAT TATTATTG3'). Para tal, a reação de amplificação continha: 50 ng de DNA plasmidial do clone pUFV1591, dNTPs 0,2 mM de cada nucleotídeo, 0,4µM de cada primer (SoCSVN*NcoI*-R e SoCSVMCS-F), 5µl de Tampão 10XTaq Platinum High Fidelity (Promega) e 0.2 U de Taq Platinum High Fidelity (Promega), totalizando um volume final de 50µl. A reação de amplificação foi conduzida no termociclador modelo C1000 (Bio-Rad), com uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 2 min, seguida por 35 ciclos (94°C por 45 s, 50°C por 45 s, e 68°C por 1min e 45 s) e um período adicional de polimerização a 68°C por 10 min. O produto de amplificação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo 0,1 µg/mL (Figura 9). O fragmento amplificado de aproximadamente 1200 nt foi purificado do gel de agarose usando QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), segundo indicações do fabricante.

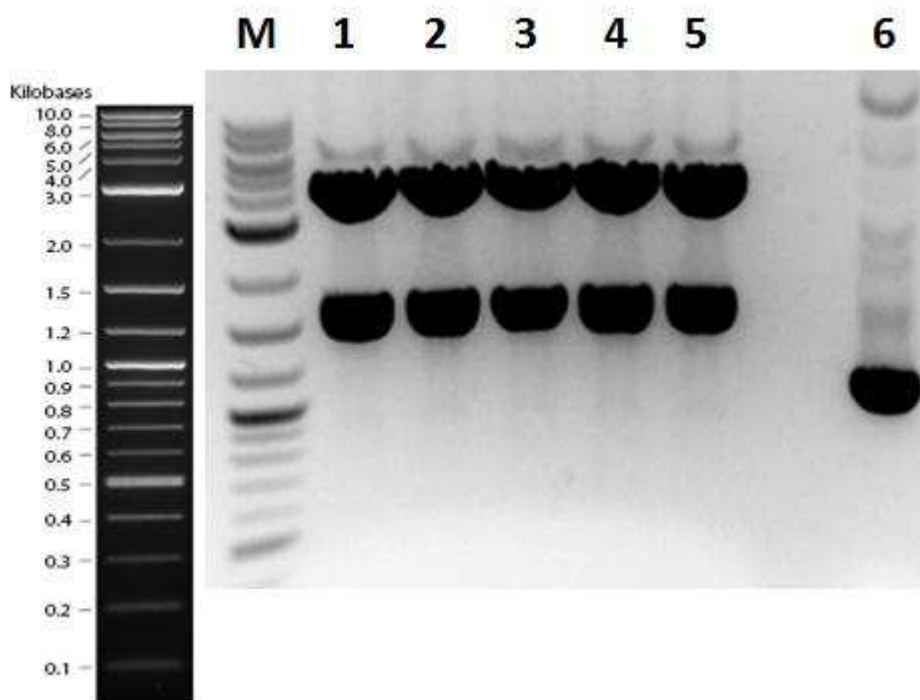


Figura 9. Padrão eletroforético em gel de agarose (1%). **M**, marcador de comprimento (Kilobases); **1-5**, padrão de clivagem do clone pUFV1591 com a enzima *Nco*I; **6**, resultado do PCR a partir do clone pUFV1591 para amplificação de sequências importantes do genoma e inserção de um sítio múltiplo de clonagem .

O produto da amplificação de 1200 nt purificado foi ligado utilizando-se a enzima T4 DNA Ligase (Promega) segundo as especificações do fabricante, ao fragmento de 4385 nt de pUFV1591. O produto da reação de ligação foi utilizado para transformação de *E. coli* DH5 α pelo método de choque térmico (Sambrook *et al.*, 2001) e as colônias contendo os plasmídeos recombinantes foram submetidas a minipreparação de DNA plasmidial. O DNA plasmidial dos possíveis recombinantes foi digerido com *Nco*I e uma colônia foi confirmada (canaleta 3, Figura 10).

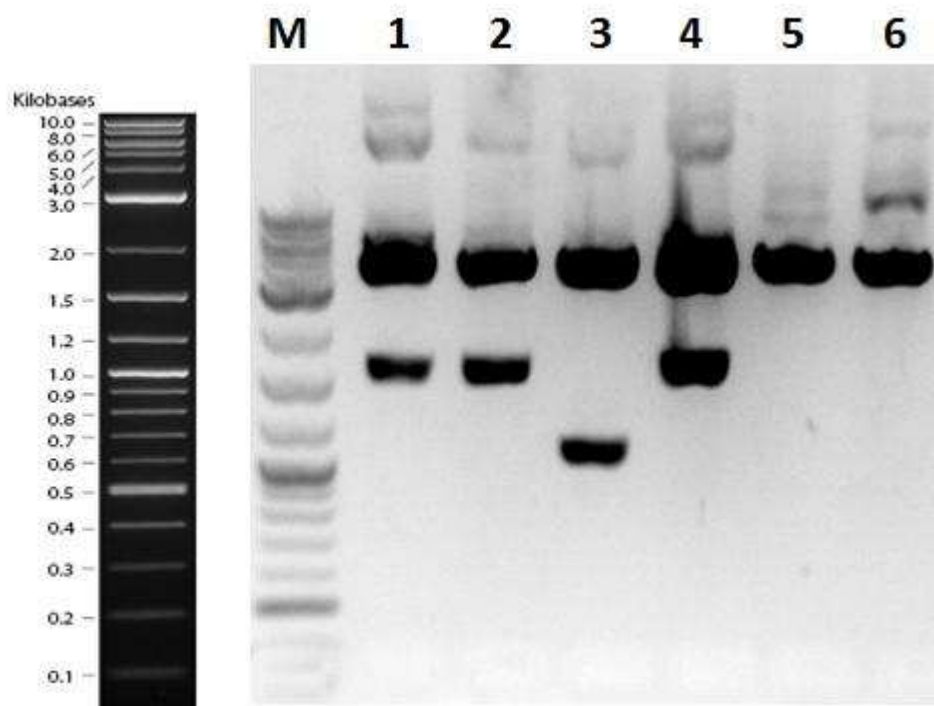
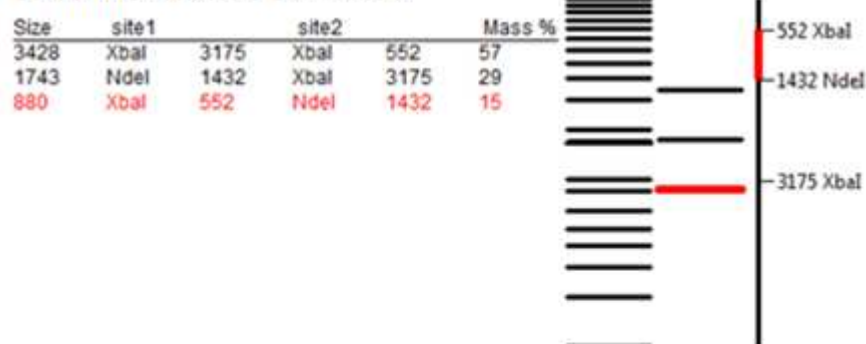


Figura 10. Padrão eletroforético em gel de agarose (1%) das minipreparações de DNA plasmidial clivadas com *NcoI* obtidas a partir de colônias contendo possíveis plasmídeos recombinates. **M**, marcador de comprimento (Kilobases); **1**, controle, DNA plasmidial do clone pUFV1591 clivado com *NcoI*; **2-6**, clivagem com *NcoI* das minipreparações de DNA plasmidial contendo os possíveis plasmídeos recombinates.

Para confirmar se a orientação do inserto estava correta, foi feita a simulação do padrão de restrição com as enzimas *XbaI* e *NdeI* usando o programa ApE-A Plasmid Editor (Figura 11), e a colônia confirmada foi clivada com as mesmas enzimas, apresentando o padrão de restrição esperado (Figura 12).

1-Controle: SoCSV-1.5-DNA-A



2-Colônia confirmada: Padrão esperado

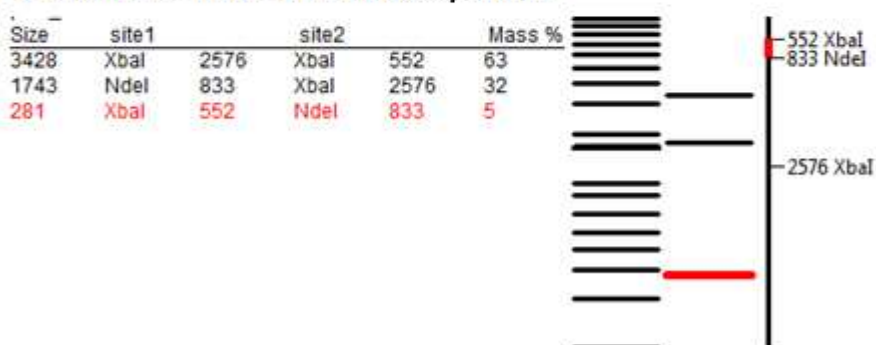


Figura 11. 1, Simulação do padrão de restrição esperado da digestão com *XbaI* e *NdeI* do clone pUFV1591, utilizando o programa ApE-A Plasmid Editor.; **2**, Simulação do padrão de restrição esperado da digestão com *XbaI* e *NdeI* do plasmídeo recombinante esperado.

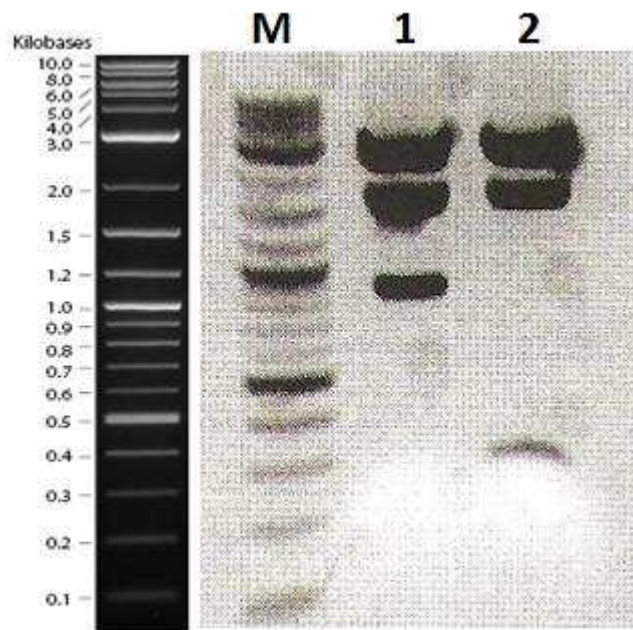


Figura 12. Padrão eletroforético em gel de agarose (1%). **M**, marcador de comprimento (Kilobases); **1**, controle, padrão de clivagem com as enzimas *Xba*I e *Nde*I do DNA plasmidial do clone pUFV1591; **2**, padrão de clivagem com as enzimas *Xba*I e *Nde*I do plasmídeo recombinante.

O clone resultante, pUFV1713, contém a sequência parcialmente duplicada do DNA-A do isolado (pUFV1591), sem a maior parte da região codificante da proteína CP e com um sítio múltiplo de clonagem contendo as enzimas *Bgl*II, *Hpa*I e *Nhe*I, correspondente, portanto, a um vetor silenciamento viral. A clivagem com a enzima *Hpa*I vai gerar extremidades abruptas, o que pode facilitar a clonagem, caso se deseje inserir um fragmento que não possua sítios de clivagem para as enzimas presentes no vetor.

3.7. Clonagem de um fragmento gene *ChlI* (*magnesium chelatase subunit I*) no vetor de silenciamento viral

O RNA total de folhas de soja foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. Para eliminação do DNA contaminante, o RNA total foi tratado com uma unidade de DNase livre de RNase (Invitrogen). O RNA foi quantificado (Espectrofotômetro Thermo Scientific Evolution 60) e analisado em gel de agarose desnaturante 1,5 % (p/v), corado com brometo de etídeo 0,1 µg/mL. A síntese de cDNA foi realizada utilizando 4 µg de RNA total, oligo-dT(18) e Transcriptase Reversa M-MLV (Invitrogen), segundo as especificações do fabricante.

Um fragmentos do gene *ChlI* foi isolado via PCR, utilizando o cDNA sintetizado a partir do RNA total de soja. A reação de amplificação continha: 1µl da reação de síntese de cDNA, dNTPs 0,2 mM de cada nucleotídeo, 0,4µM de cada primer (GmaxChlIF:5'CGAGAATTCATGGGTGTTGAAGTCAGAGAGCGT3' e GmaxChlIR:5'CGAGAATTCACCGTGCAGGATGCGAGATAGAAA3'), 5µl de Tampão 10X Taq Platinum High Fidelity (Promega) e 0.2 U de Taq Platinum High Fidelity (Promega), totalizando um volume final de 50µl.

A reação de amplificação foi conduzida no termociclador modelo C1000 (Bio-RAD), com uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 3 min, seguida por 30 ciclos (94°C por 45 s, 57°C por 45 s, e 68°C por 45 s) e um período adicional de polimerização a 68°C por 10 min. O produto de amplificação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo 0,1 µg/mL.

Após a confirmação da amplificação, o fragmento obtido foi purificado utilizando-se QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), e clonado no vetor de entrada pCR8/GW/TOPO (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricantes. O produto da reação foi utilizado para transformação de *Escherichia*

coli estirpe DH5 α pelo método de choque térmico (Sambrook *et al.*, 2001). O fragmento do gene *Chll* foi liberado do vetor de entrada pCR8/GW/TOPO (Invitrogen) por clivagem com a enzima de restrição *EcoRI* e as extensões 5' fita simples foram preenchidas utilizando-se a enzima DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, o fragmento do gene *Chll* foi inserido no vetor viral de silenciamento (pUFV1713), previamente clivado no seu sítio múltiplo de clonagem com a enzima de restrição *HpaI* e previamente desfosforilado, utilizando-se a enzima T4 DNA Ligase (Promega). O produto da reação de ligação foi utilizado para transformação de *E. Coli* DH5 α pelo método de choque térmico (Sambrook *et al.*, 2001) e as colônias contendo os plasmídeos recombinantes foram submetidas a minipreparação de DNA plasmidial. Para a confirmação dos clones foi realizada a clivagem com as enzimas *BglII* e *NheI*, presentes no sítio múltiplo de clonagem (Figura 13). Duas colônias foram confirmadas, gerando os clones pUFV1732 e pUFV1771.

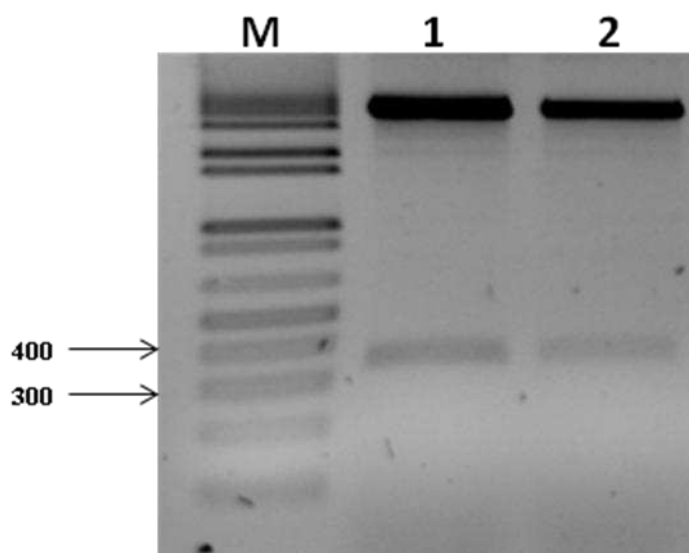


Figura 13. Padrão eletroforético em gel de agarose (1%). **M**, marcador de comprimento (“1Kb plus DNA ladder”-Invitrogen, em nt); **1-2**, clivagem do DNA

plasmidial do vetor de silenciamento viral contendo um fragmento do gene *ChlI* com as enzimas *Bgl*II e *Nhe*I (clones pUFV1732 e pUFV1771, respectivamente).

3.8. Indução do silenciamento do gene *ChlI* (*magnesium chelatase subunit I*) em plantas de soja

Plantas de soja foram inoculadas via biobalística (Aragão *et al.*, 1996), com o DNA plasmidial dos clones pUFV1732 e pUFV1592, com o objetivo de induzir o silenciamento do gene *ChlI*. A infecção viral das plantas inoculadas foi confirmada por PCR 21 dpi (dias após a inoculação) com os primers SoCSVNcol-Re SoCSVMCS-F. O RNA total de folhas de soja das plantas infectadas foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. Para eliminação do DNA contaminante, o RNA total foi tratado com uma unidade de DNase livre de RNase (Invitrogen). O RNA foi quantificado (Espectrofotômetro Thermo Scientific Evolution 60) e analisado em gel de agarose desnaturante 1,5 % (p/v), corado com brometo de etídeo 0,1 µg/mL. A síntese de cDNA foi realizada utilizando 4 µg de RNA total, oligo-dT(18) e Transcriptase Reversa M-MLV (Invitrogen), segundo as especificações do fabricante. O cDNA sintetizado foi utilizado na avaliação do decaimento do gene *ChlI* por PCR em tempo real (item 3.9).

3.9. PCR em tempo real (qRT-PCR)

Todo o procedimento de PCR em Tempo Real, incluindo testes, validações e experimentos foram conduzidos seguindo os manuais da *Applied Biosystems*. As reações de PCR em tempo real foram conduzidas utilizando o aparelho 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems), utilizando-se oligonucleotídeos específicos (*ChlI*F: 5'GCCTTCGCGCTACTTCTCTTC3' e *ChlI*R: 5'GCCCATAGTTCTGCCCTGAA3'), cDNAs dos tratamentos e SYBR

Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). As condições de amplificação foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, e 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Para a quantificação da expressão gênica, foram utilizados os métodos comparativos de Ct: $2^{-\Delta Ct}$ e $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Como controle endógeno para normalização dos dados do qRT-PCR, foi utilizado o primer específico para o gene de soja 18S (18SR: 5'CCTTCAATGGATCCATCGTTA3' e 18SF:5'AAACGGCTACCACATCCAAG3') validado como gene normalizador pelo programa geNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>; Vandesompele *et al.*, 2002).

4-RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise das sequências dos componentes genômicos virais do isolado infectando soja

A análise das sequências de quatro clones correspondentes a uma cópia do genoma viral do isolado indicou se tratarem de componentes genômicos correspondentes ao DNA-A e DNA-B de begomovírus, apresentando a organização genômica típica com cinco ORFs no DNA-A (Rep, Trap, Ren, CP e AC4) e duas ORFs no DNA-B (MP e NSP). Dos quatro clones enviados para o sequenciamento, três correspondiam ao DNA-A da mesma espécie de begomovírus com pequenas variações genéticas entre si (clones: pUFV1587, pUFV1871 e pUFV1872) e um clone ao DNA-B (clone pUFV1588). A comparação de sequência de nucleotídeos da região comum do DNA-A do clone pUFV1587 e do DNA-B do clone pUFV1588 revelou 94% de identidade de sequência entre eles sobre uma extensão de 172pb, sugerindo tratar-se de DNA-A e DNA-B cognatos (Figura 14). As regiões intergênicas dos dois componentes virais contêm os elementos funcionais da origem de replicação de geminivírus, como a sequência conservada de 30pb que forma a estrutura de grampo (em amarelo) e a sequência conservada TAATATTAC na alça da estrutura de grampo (em vermelho) que corresponde ao sítio de clivagem da proteína Rep para início de replicação (Laufs *et al.*, 1995; Orozco *et al.*, 1998). Além de apresentarem uma região comum altamente conservada, os clones pUFV1587 (DNA-A) e pUFV1588 (DNA-B) compartilham na região intergênica idênticos iterons (GGTGAATTGGTG) a montante ao TATA box que correspondem ao possível sítio de ligação da proteína Rep (sublinhados de verde), o que favorece o argumento de que os componentes virais clonados correspondem ao DNA-A e DNA-B cognatos.

SeqA Name	Len (nt)	SeqB Name	Len (nt)	Score
1 DNA-A	170	2 DNA-B	172	94
DNA-A	TTGGTGGTGGCATTCTTGTAAATAAAACGATGTCACCAATTC-GCTCCGCTCTAAAACTC			
DNA-B	CTGGCAGTGGCATGTTTGTAAATAAAACGATGTCACCAATTGAGCTCCGCTCTAAAACTC			
	*** *****			
DNA-A	TATAGCAATTGGTGAATTGGTGACAATATATACTAGAACCCCTCAATAGAACTTCTAATCC			
DNA-B	TATAGCAATCGGTGAATTGGTGACAATATATACTAGAACCCCTCTATAGAACTTCTAATCC			
	***** *****			
DNA-A	TGTTTCGC-CACGTGGGCGCATCGCTATAATATTACGGGTGGCGCGA			
DNA-B	TGTTTCGCACACGTGGGCGCATCGCTATAATATTACGGGTGGCGCGA			
	***** *****			

Figura 14. Alinhamento da sequência de nucleotídeos da região comum do DNA-A do clone pUFV1587 e do DNA-B do clone pUFV1588. A região do TATA box e do nonanucleotídeo estão em vermelho. A região que formará o hairpin está em amarelo. O possível sítio de ligação da proteína Rep está sublinhado de verde.

As sequências de nucleotídeos do DNA-A e DNA-B completos do isolado foram comparadas com a sequência de nucleotídeos de outros begomovírus das Américas e do “Velho mundo”. O DNA-A do isolado do vírus da soja apresentou maior identidade de sequência com o vírus *Macrottilium yellow spot virus* (85% de identidade), enquanto o DNA-B apresentou maior identidade com o *Bean golden mosaic virus* (67% de identidade; Tabela 1 e Tabela 2 respectivamente). Este nível de conservação de sequências com outros begomovírus é considerado suficientemente dissimilar para identificar um begomovírus distinto. De fato, identidade de sequência do DNA-A menor que 89% na comparação com as sequências dos outros begomovírus corresponde ao critério molecular de taxonomia definido pelo Grupo de Estudos de *Geminiviridae* do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) para classificação de novas espécies (Fauquet *et al.*, 2008). Sendo assim, o isolado de soja foi classificado como uma nova espécie de begomovírus e provisoriamente designado Soybean chlorotic spot virus (SoCSV).

Tabela 1. Porcentagem de identidade de sequência de nucleotídeos entre o DNA-A do isolado SoCSV e de outras espécies de begomovírus.

	SoCSV
MaYSV	85*
ToICV	80
MaYNV	80
MaYVV	79
ToCMoV	79
BGMV	78
ToRMV	78
ToSRV	78
ToLDV	77
PYMV	76

Espécies (com o número de acesso no GenBank) usadas para a comparação: MaYSV, *Macrotium yellow spot virus* (JN419018); ToICV, *Tomato interveinal chlorosis virus* (JF803252); MaYNV, *Macrotium yellow net virus* (JN418998); MaYVV, *Macrotium yellow vein virus* (JN419021); ToCMoV, *Tomato chlorotic mottle virus* (AF490004); BGMV, *Bean golden mosaic virus* (JN419006); ToRMV, *Tomato rugose mosaic virus* (AF291705); ToSRV, *Tomato severe rugose virus* (JF803262); ToLDV, *Tomato leaf distortion virus* (EU710749); PYMV, *Potato yellow mosaic virus* (Y15034).

* Indica a espécie com maior identidade de sequência com o isolado.

Tabela 2. Porcentagem de identidade de sequência de nucleotídeos entre o DNA-B de SoCSV e de outras espécies de begomovírus.

	SoCSV
BGMV	67*
CILCrV	67
PSLDV	65
SiMAV	65
MaYNV	64
MaYMV	64
TSMaV	64
BGYMV	63
SiGMoV	62
SoMBoV	62

Espécies (com número de acesso no GenBank) usada para a comparação:

BGMV, *Bean golden mosaic virus* (JF694459), CILCrV, *Cleome leaf crumple virus* (JF694460), PSLDV, *Passionfruit severe leaf distortion virus* (FJ972768), SiMAV, *Sida mosaic Alagoas virus* (JF694475), MaYNV, *Macroptilium yellow net virus* (JN418999), MaYMV, *Macroptilium yellow mosaic virus* (EF585289); TSMaV, *Tomato severe mottle Argentina virus* (JN564750); BGYMV, *Bean golden yellow mosaic virus* (AF173556); SiGMoV, *Sida golden mottle virus* (GU997692); SoMBoV, *Solanum mosaic Bolivia virus* (HM585436).

*Indica a espécie com maior identidade de sequência com o isolado.

Árvores filogenéticas foram construídas com base nas sequências de nucleotídeos do DNA-A e DNA-B de espécies de begomovírus das Américas

incluindo-se SoCSV (Figura 15 e Figura 16). Em ambas as árvores filogenéticas, SoCSV se agrupou com demais espécies brasileiras. Na árvore filogenética baseada na sequência de nucleotídeos do DNA-A, SoCSV agrupou principalmente com begomovírus que infectam leguminosas, *Macrottilium yellow spot virus* (MaYSV), *Macrottilium yellow vein virus* (MaYVV) e o *Bean golden mosaic virus* (BGMV), que é encontrado frequentemente infectando feijões, além de ficar próximo de um vírus que infecta plantas silvestres, *Blainvillea yellow spot virus* (BIYSV). Estes resultados demonstram que SoCSV mantém um relacionamento filogenético com outros begomovírus baseado na origem geográfica, uma vez que ele forma sub-grupos com vírus encontrados no território brasileiro. Análises filogenéticas de begomovírus baseada em conservação de sequências do genoma viral têm demonstrado que as sequências de begomovírus se agrupam principalmente de acordo com a região geográfica (Ferreira *et al.*, 2010). Na árvore filogenética baseada na sequência de nucleotídeos do DNA-B, SoCSV agrupou-se principalmente com os begomovírus *Bean golden mosaic virus* (BGMV) e *Cleome leaf crumple virus* (CILCrV).

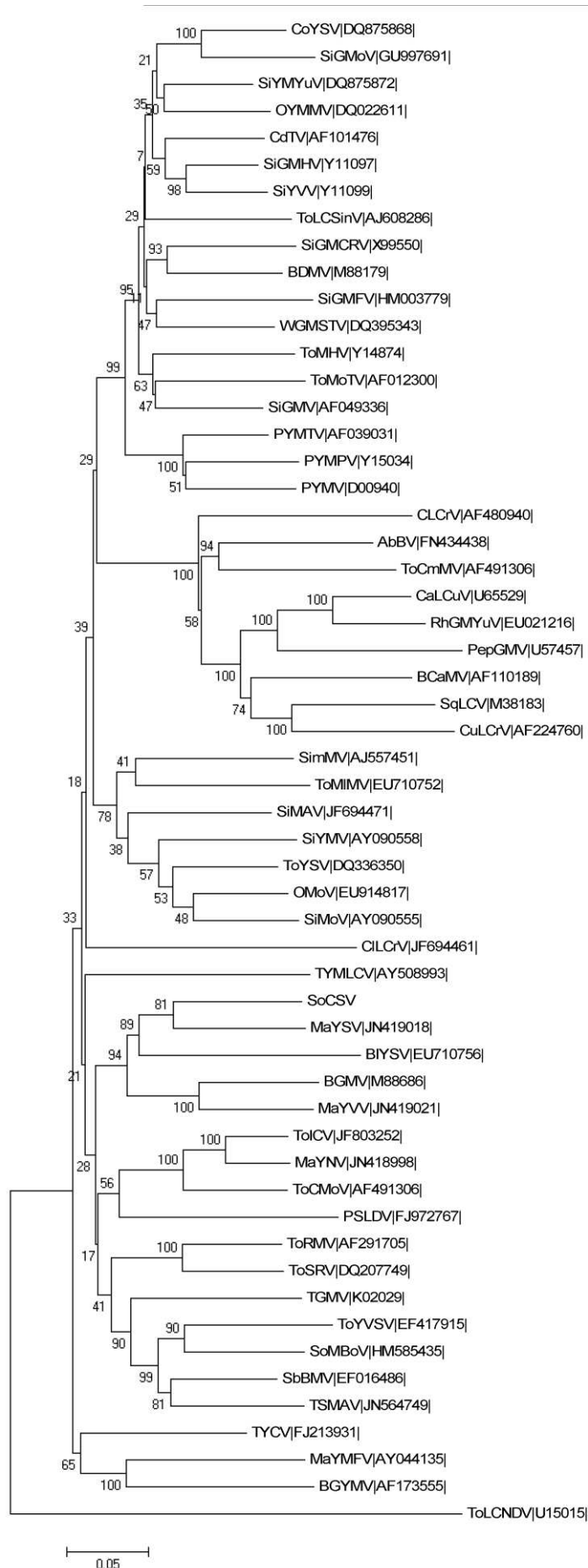
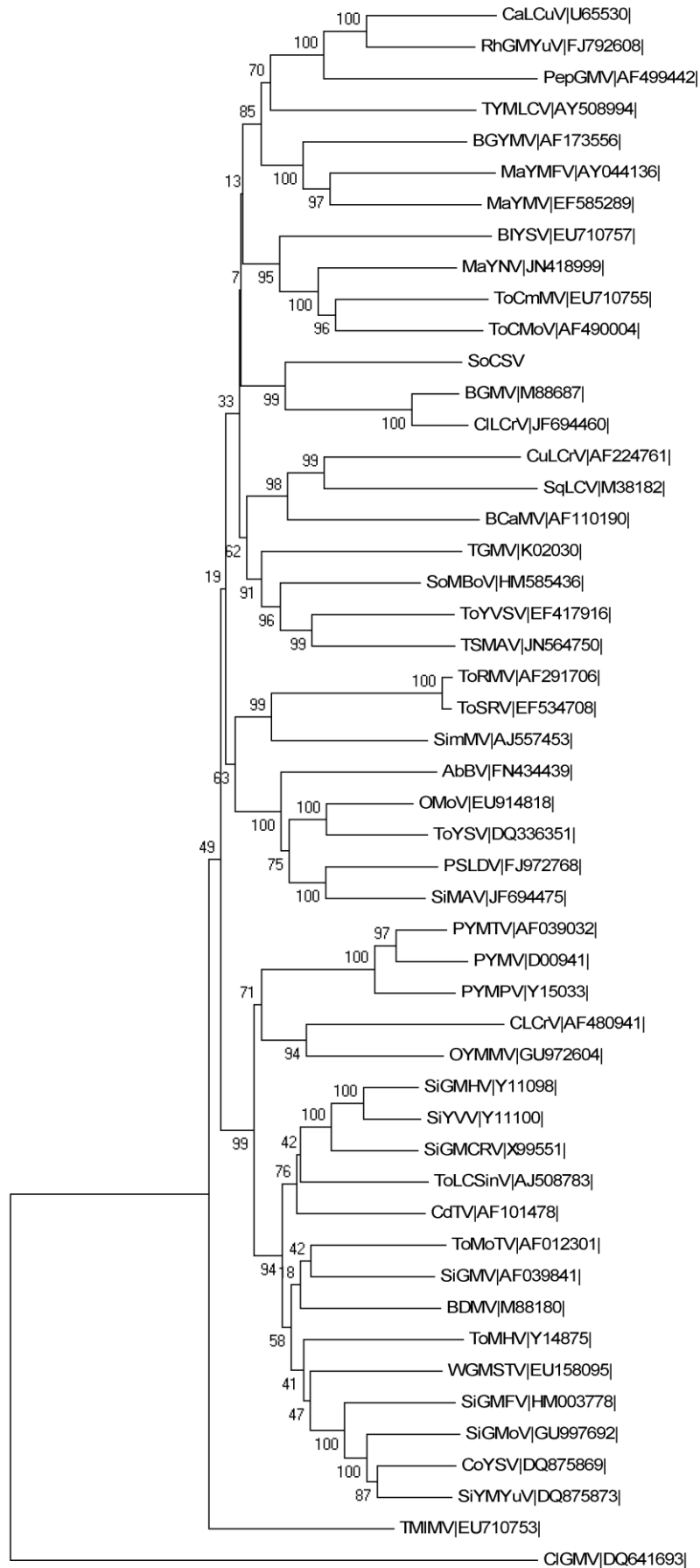


Figura 15. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento das sequências de nucleotídeos completas do DNA-A de espécies de begomovírus das Américas, incluindo SoCSV. A árvore foi obtida pelo método de “Neighbour-Joining”, utilizando o programa Mega 5.0. Os números em cada ramo indicam o valor de “bootstrap” (100.000 repetições).



0.05

Figura 16. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento das sequências de nucleotídeos completas do DNA-B de espécies de begomovírus das Américas e algumas espécies de begomovírus presentes no “Velho Mundo”, incluindo SoCSV. A árvore foi obtida pelo método de “Neighbour-Joining”, utilizando o programa Mega 5.0. Os números em cada ramo indicam o valor de “bootstrap” (100.000 repetições).

4.2. Definição da Gama de Hospedeiro de SoCSV

O DNA plasmidial dos clones infecciosos pUFV1591 e pUFV1592 foi utilizado para inocular via biobalística plantas das famílias *Solanaceae* (*Nicotiana rustica*, *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. debneyi*, *N. glutinosa*, *N. tabacum*, *Solanum lycopersicum* ‘Santa Clara’ e ‘Rutgers’, *Capsicum annuum* ‘Casca Dura Ikeda’), *Fabaceae* (*Glycine max* ‘Conquista’, *Phaseolus vulgaris* ‘Pérola’ e ‘Ouro Negro’), e *Chenopodiaceae* (*Chenopodium quinoa*). Os resultados do teste de gama de hospedeiros são apresentados na Tabela 3. A infecção viral foi confirmada via PCR utilizando oligonucleotídeos específicos (SoCSVNcol-R e SoCSVMCS-F) que amplificam um fragmento com aproximadamente 1200 nt (Figura 17, 18 e 19). Foi feita a observação dos sintomas de todas as plantas inoculadas (Figura 20, 21, 22, 23, 24 e 25).

Exceto por *Solanum lycopersicum* ‘Santa Clara’ e ‘Rutgers’, a espécie SoCSV infectou as demais espécies de plantas da família *Solanaceae* testadas (*Nicotiana rustica*, *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. debneyi*, *N. tabacum*, *N. glutinosa*, *Capsicum annuum* ‘Casca Dura Ikeda’), e todas as espécies da família *Fabaceae* testadas (*Glycine max* ‘Conquista’, *Phaseolus vulgaris* ‘Pérola’, *P. vulgaris* ‘Ouro Negro’). Foi constatada a infecção viral por PCR (Figura 17) nas espécies *N. clevelandii*, *N. tabacum* e *N. glutinosa*, entretanto nenhum sintoma macroscópico foi observado (Figura 25). As plantas das espécies *Capsicum annuum*, *N. benthamiana*, *N. debneyi*, *N. rustica* e *Glycine max*, apresentaram sintomas leves (Figura 20, 21, 24). Os sintomas mais severos foram observados nas espécies *Phaseolus vulgaris* ‘Pérola’, e *P. vulgaris* ‘Ouro Negro’ (Figura 22 e 23), consistindo em deformação foliar, bolhosidade, clorose entre as nervuras, mosaico e mosaico dourado.

Tabela 3. Avaliação da infecção de plantas inoculadas com clones infecciosos de SoCSV.

Espécie, 'Cultivar'	Plantas Infectadas/Inoculadas	Sintomas
<i>Capsicum annuum</i>	7/7	Leve clorose entre as nervuras
<i>Chenopodium quinoa</i>	0/7	-----
<i>Glycine max</i> 'Conquista'	7/7	Pontos cloróticos
<i>Nicotiana benthamiana</i>	7/7	Clorose entre as nervuras
<i>N. clevelandii</i>	5/7	Sem sintomas aparentes
<i>N. debneyi</i>	7/7	Clorose entre as nervuras
<i>N. glutinosa</i>	7/7	Sem sintomas aparentes
<i>N. tabacum</i>	6/7	Sem sintomas aparentes
<i>N. rustica</i>	6/7	Clorose entre as nervuras
<i>Solanum lycopersicum</i> 'Rutgers'	0/7	-----
<i>Solanum lycopersicum</i> 'Santa Clara'	0/7	-----
<i>Phaseolus vulgaris</i> 'Ouro Negro'	6/7	Deformação foliar, bolhosidade, clorose entre as nervuras, mosaico, mosaico dourado.
<i>Phaseolus vulgaris</i> 'Pérola'	5/7	Deformação foliar, bolhosidade, clorose entre as nervuras, mosaico, mosaico dourado.

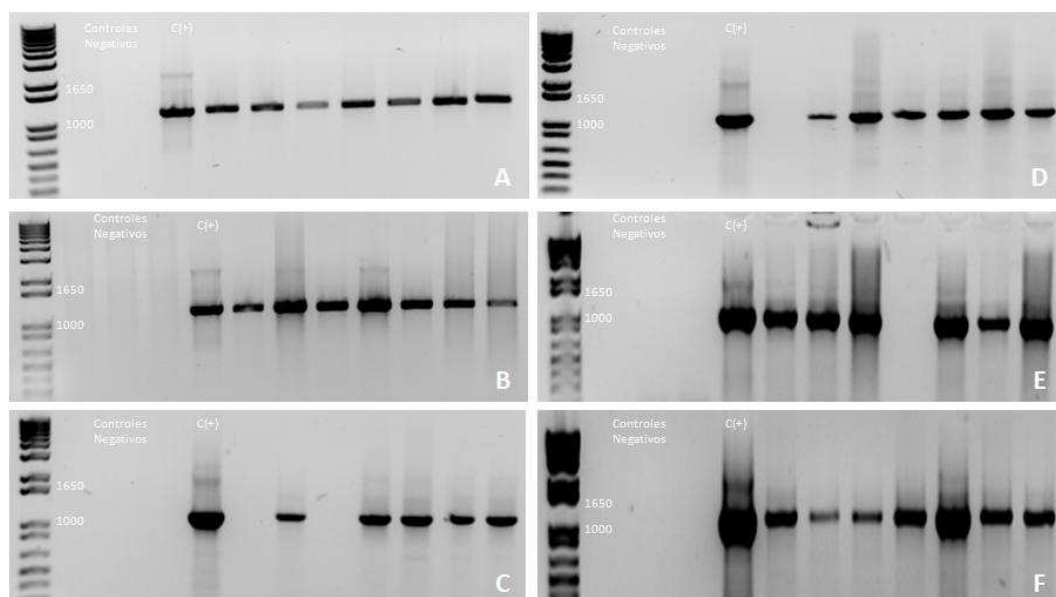


Figura 17. Padrão eletroforético em gel de agarose (1%) da confirmação da infecção viral por SoCSV via PCR 21dpi. **A**, *N. benthamiana*; **B**, *N. debneyi*; **C**, *N. clevelandii*; **D**, *N. tabacum*; **E**, *N. rustica*; **F**, *N. glutinosa*. Um fragmento de aproximadamente 1200 nt foi observado para o controle positivo (DNA plasmidial

do clone pUFV1591). Nenhum fragmento foi observado para o controle negativo (DNA total de plantas inoculadas com partículas de tungstênio sem DNA viral).

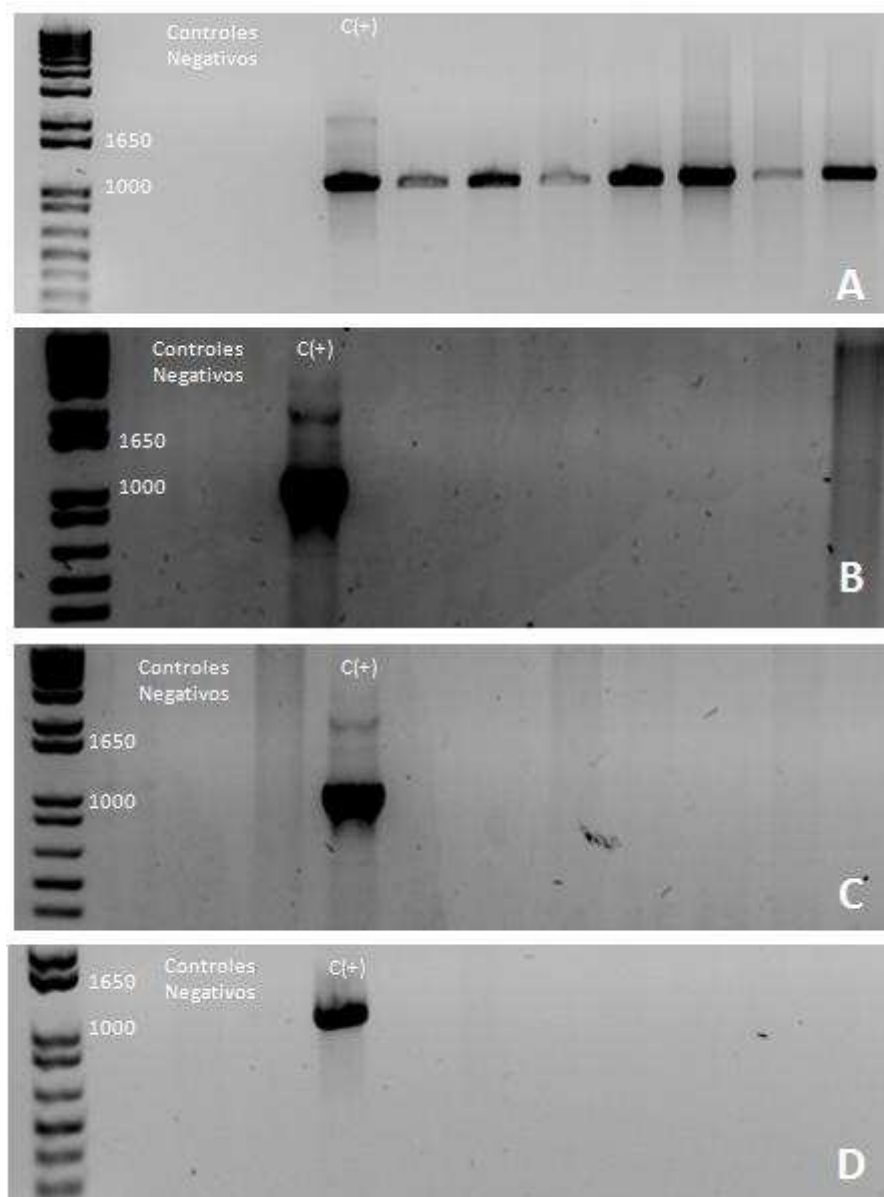


Figura 18. Padrão eletroforético em gel de agarose (1%) da confirmação da infecção viral por SoCSV via PCR 21dpi. **A**, *Capsicum annuum*; **B**, *Solanum lycopersicum* 'Rutgers'; **C**, *Solanum lycopersicum* 'Santa Clara'; **D**, *Chenopodium quinoa*. Um fragmento de aproximadamente 1200 nt foi observado para o controle positivo (DNA plasmidial do clone pUFV1591). Nenhum fragmento foi observado para o controle negativo (DNA total de Plantas inoculadas com partículas de tungstênio sem DNA viral).

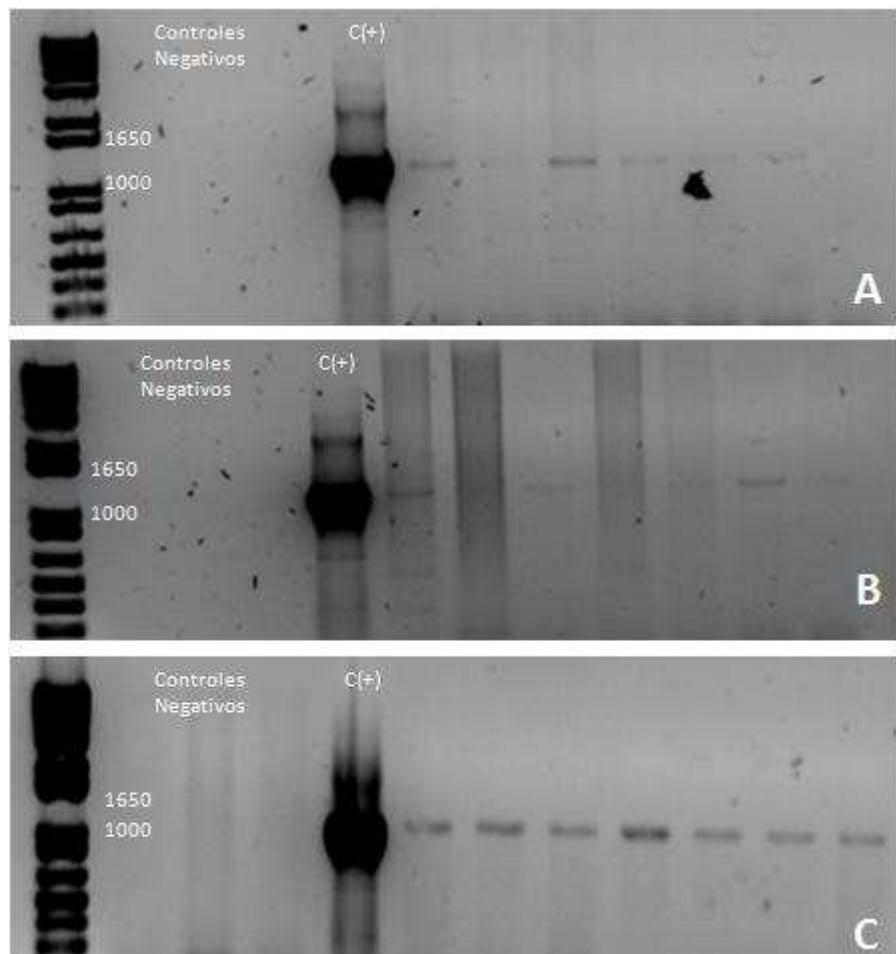


Figura 19. Padrão eletroforético em gel de agarose (1%) da confirmação da infecção viral por SoCSV via PCR 21 dpi. **A**, *Phaseolus vulgaris* 'Ouro Negro'; **B**, *Phaseolus vulgaris* 'Pérola'; **C**, *Glycine max*; Um fragmento de aproximadamente 1200 nt foi observado para o controle positivo (DNA plasmidial do clone pUFV1591). Nenhum fragmento foi observado para o controle negativo (DNA total de plantas inoculadas com partículas de tungstênio sem DNA viral).



Figura 20. Sintomas observados em plantas de *Capsicum annuum*, inoculadas via biobalística com os clones infecciosos derivados de SoCSV DNA-A e DNA-B (pUFV1591 e pUFV1592). **A-D**, *Capsicum annuum*.

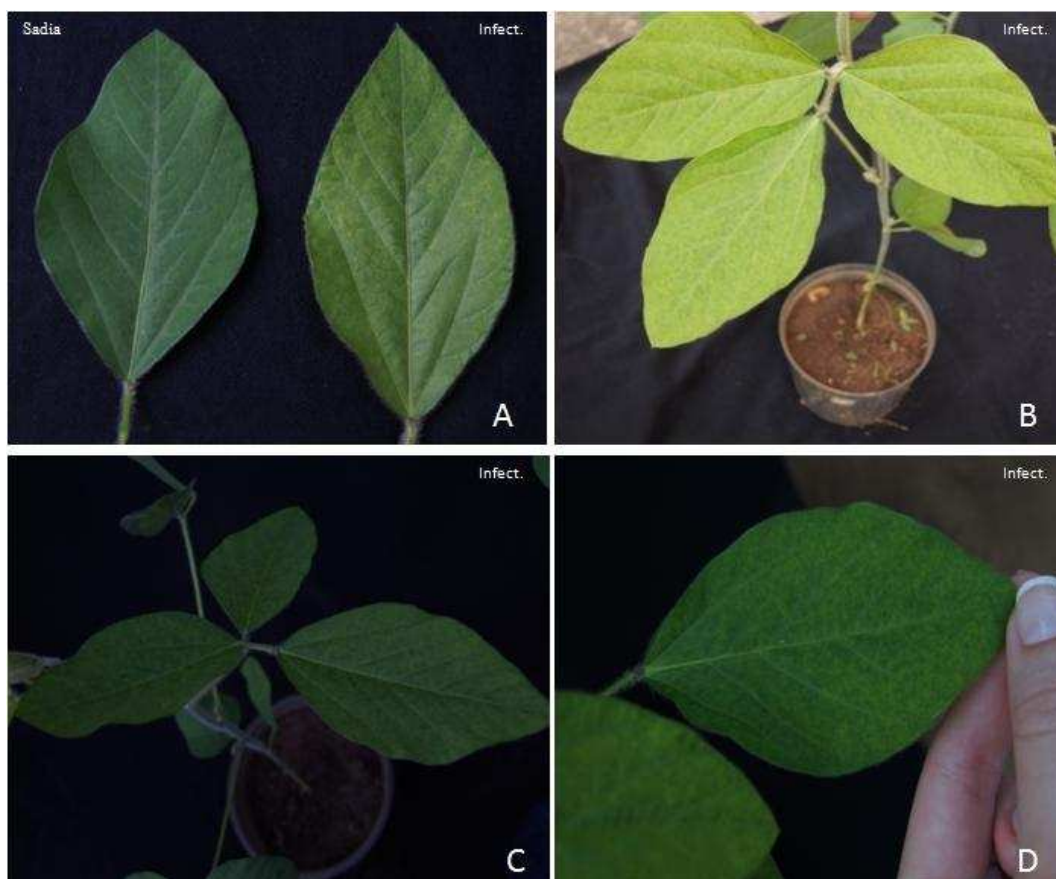


Figura 21. Sintomas observados em plantas de *Glycine Max* 'Conquista', inoculadas via biobalística com os clones infecciosos derivados de SoCSV DNA-A e DNA-B (pUFV1591 e pUFV1592). **A-D**, *Glycine max* 'Conquista'.

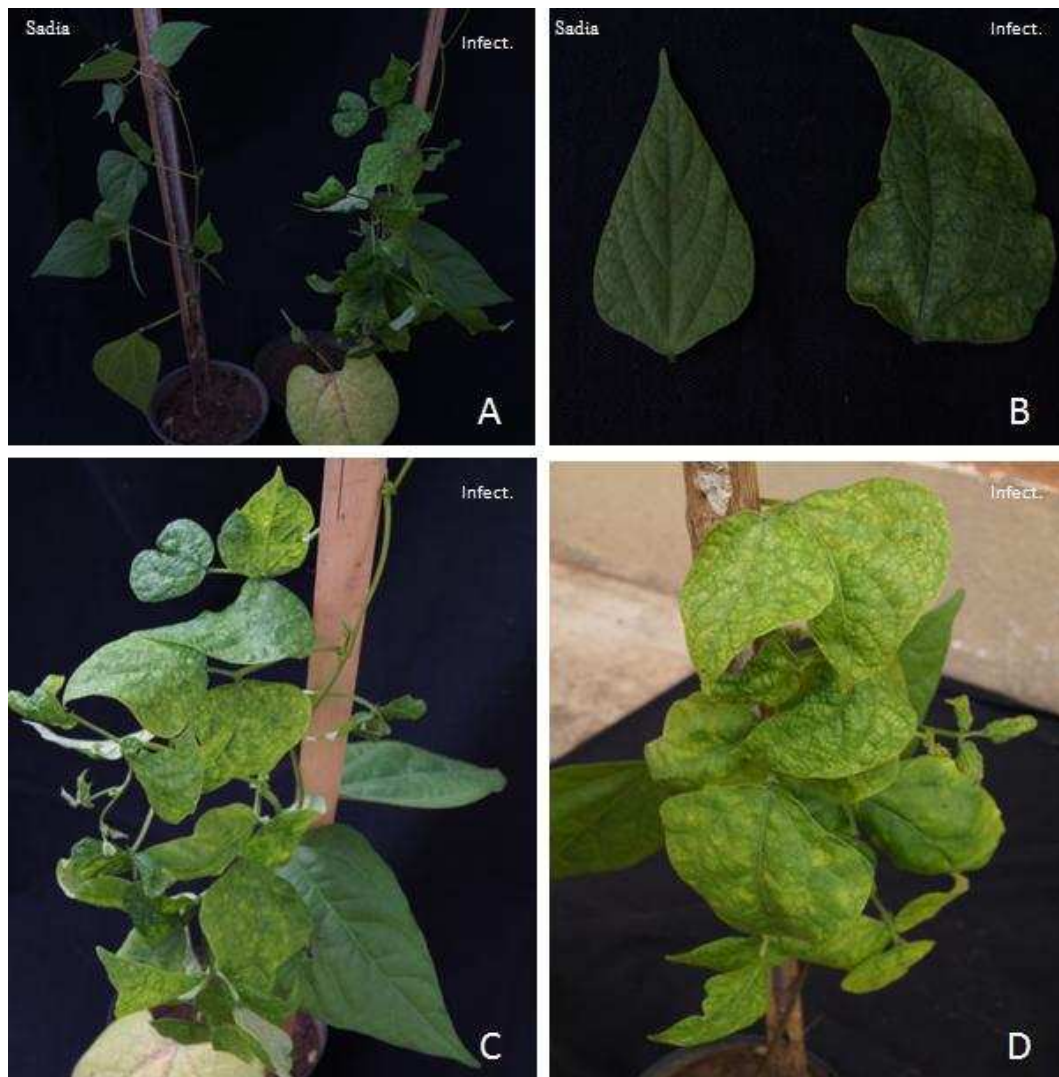


Figura 22. Sintomas observados em plantas de *Phaseolus vulgaris* 'Ouro Negro' inoculadas via biobalística com os clones infecciosos derivados de SoCSV DNA-A e DNA-B (pUFV1591 e pUFV1592). **A-D**, *Phaseolus vulgaris* 'Ouro Negro'.

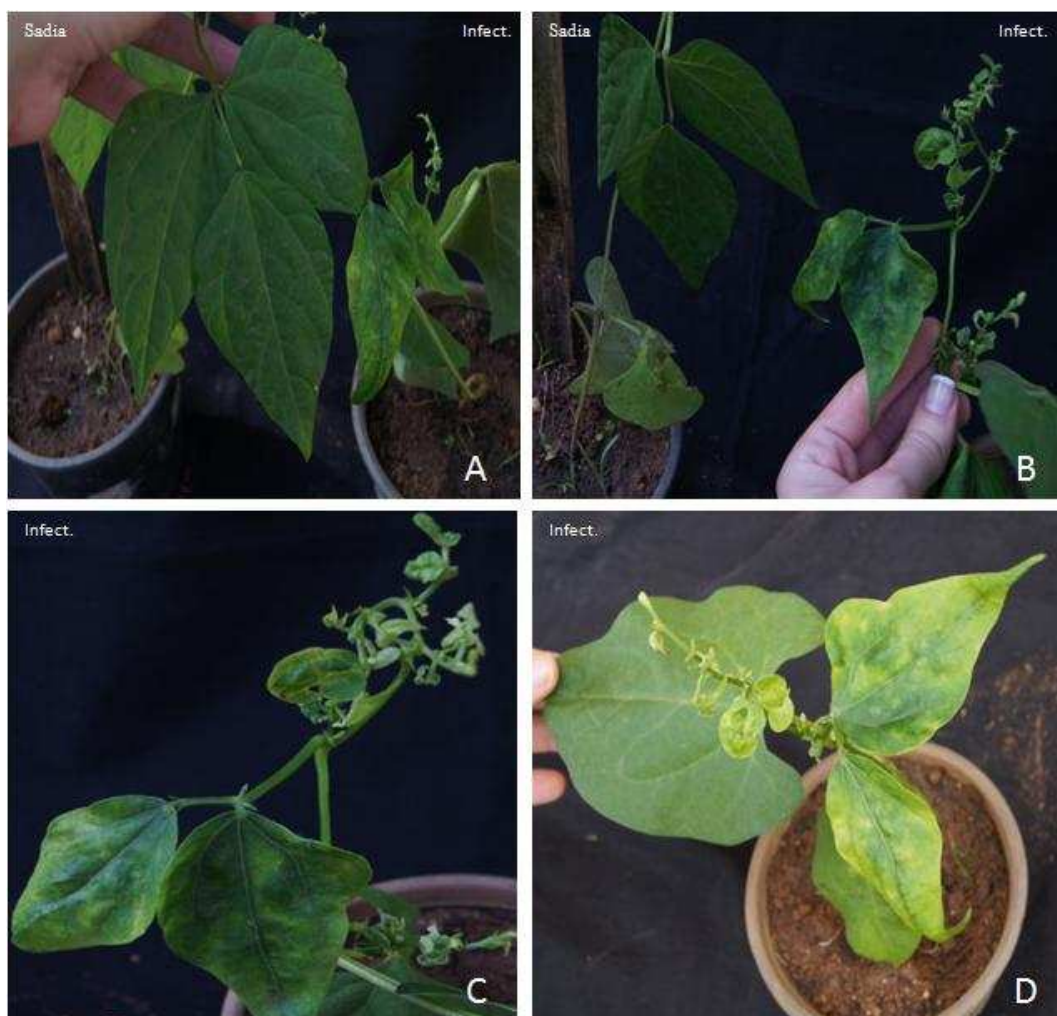


Figura 23. Sintomas observados em plantas de *Phaseolus vulgaris* 'Pérola' inoculadas via biobalística com os clones infecciosos derivados de SoCSV DNA-A e DNA-B (pUFV1591 e pUFV1592). **A-D**, *Phaseolus vulgaris* 'Pérola'.

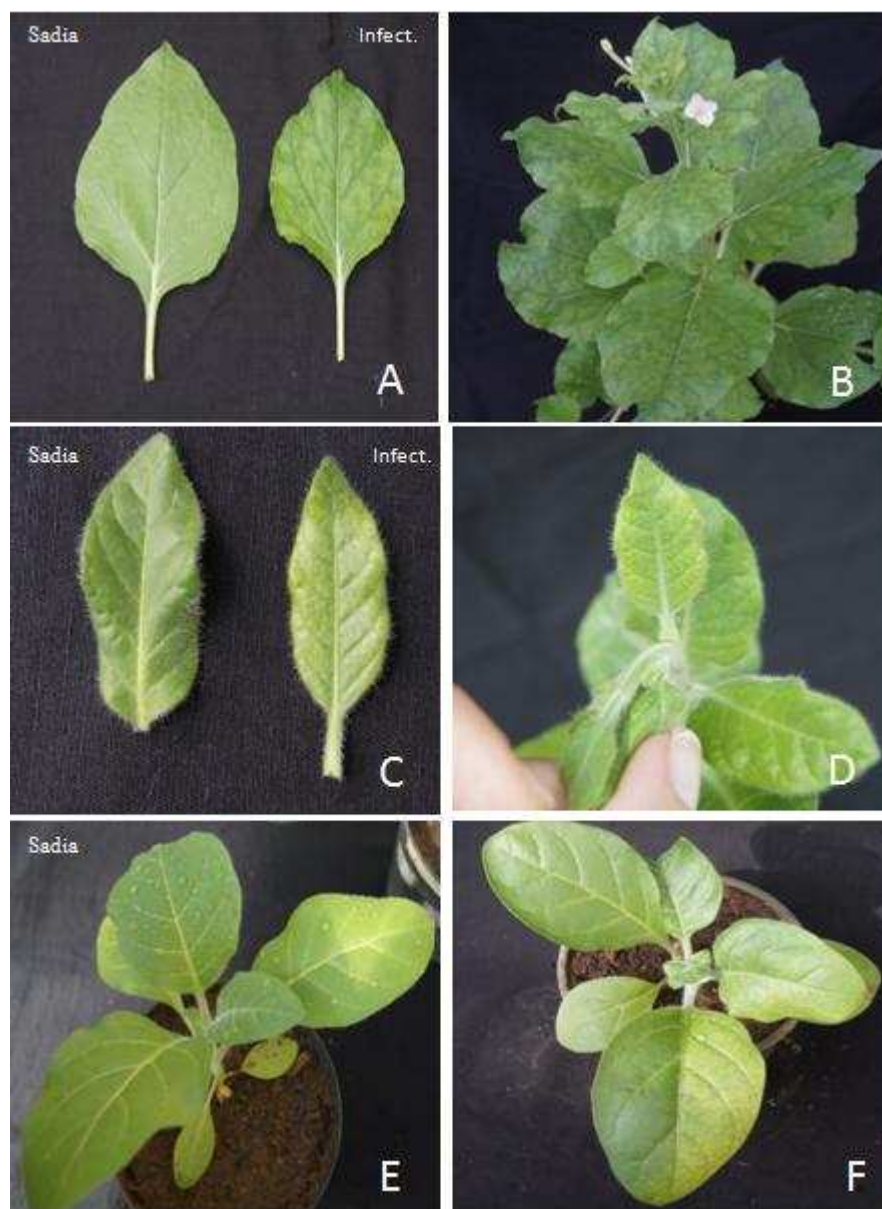


Figura 24. Sintomas observados em plantas de *N. benthamiana*, *N. rustica* e *N. debneyi*, inoculadas via biobalística com os clones infecciosos de SoCSV DNA-A e DNA-B (pUFV1591 e pUFV1592). **A-B**, *N. benthamiana*; **C-D**, *N. debneyi*; **E-F**, *N. rustica*.

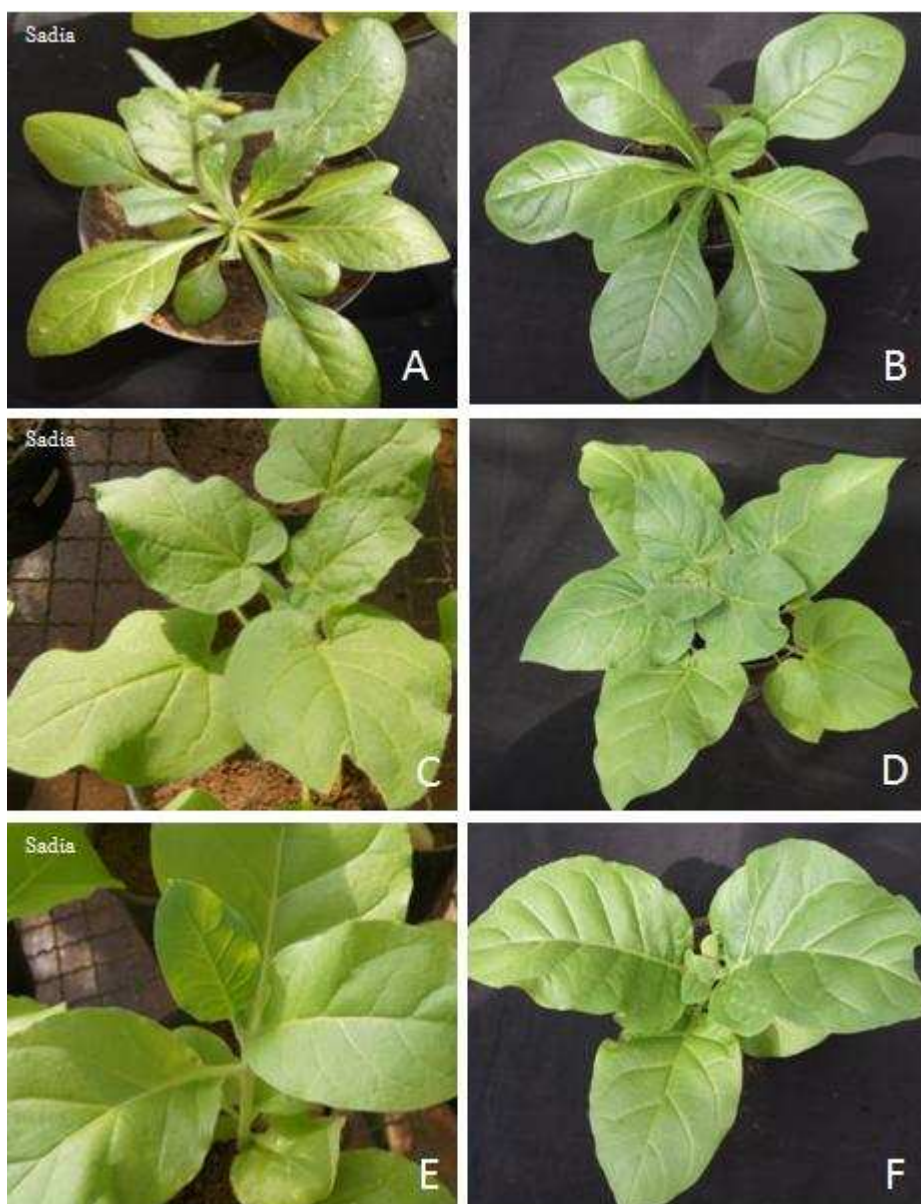


Figura 25. Plantas nas quais a infecção por SoCSV (pUFV1591 e pUFV1592) foi confirmada via PCR, porém sem sintomas macroscópicos. **A-B**, *N. cleavelandii* ; **C-D**, *N. glutinosa*; **E-F**, *N. tabacum*.

Nesta investigação, descreveu-se a identificação, clonagem e caracterização de uma nova espécie de begomovírus que infecta soja, designada SoCSV, isolada de folhas de soja na região de Jaíba-MG. Foi demonstrado que SoCSV possui uma ampla gama de hospedeiros, incluindo inúmeras espécies da família *Solenaceae* e espécies cultivadas da família

Fabaceae, como soja e feijão. Entretanto, baseado em sintomatologia, SoCSV causou uma infecção mais severa na leguminosa *Phaseolus vulgaris* do que em *Glycine max* propriamente dita. Estes dados podem refletir uma melhor adaptação de SoCSV em *Phaseolus vulgaris* e, portanto, a eminência de infecções por SoCSV em plantações de feijão no Brasil. Similarmente, BGMV, que é considerado uma limitação séria à produtividade do feijão nas regiões tropicais, produzindo sintomas devastadores no feijoeiro, em soja, provoca sintomas leves e não limita a produtividade agrícola (Fernandes *et al.*, 2009).

Ao contrário da alta variabilidade genética de espécies de begomovírus que infectam tomateiros e pimentão (Castillo-Urquiza *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2003), a diversidade genética de begomovírus associados com feijoeiro é relativamente baixa e um número reduzido de espécies tem sido descritas (Fauquet *et al.*, 2008; Brown *et al.*, 1999). Particularmente no caso do Brasil, apenas a espécie BGMV (*Bean golden mosaic virus*) tem sido encontrada em feijoeiros e parece existir uma pressão seletiva forte contrária à emergência de novas espécies de begomovírus infectando feijoeiro. De fato, um levantamento em sete estados brasileiros correspondendo as regiões principais produtoras de feijão no país revelou uma predominância total da espécie BGMV-BZ nas amostras coletadas, representando uma população singular (Faria e Maxwell, 1999). Este cenário parece não ter sido modificado nos últimos anos (Faria JC, comunicação pessoal). Embora não tenha sido conduzida nenhuma experimentação que fundamentasse uma explicação para a baixa variabilidade genética observada, acredita-se que a falta de variabilidade se deve a ausência de cultivares de feijão resistentes que poderiam direcionar uma pressão seletiva para emergência de espécies mais patogênicas. Se este for o caso, com a introdução de feijoeiros geneticamente modificados imunes a BGMV no território brasileiro, a

possibilidade de uma mudança de cenário quanto à variabilidade genética de geminivírus que infectam feijoeiros deve ser considerada (Aragão e Faria, 2009).

Embora a ocorrência de begomoviroses em soja no Brasil tem sido esporádica, recentemente foi identificado três espécies de begomovírus associados com soja na região centro oeste do Brasil, causando sintomas leves (Fernandes *et al.*, 2009). Estas incluem, BGMV, cuja incidência em soja já havia sido previamente relatada (Faria e Maxwell, 1999), *Sida micrantha mosaic virus*, originalmente isolada de erva daninhas da família Malvacea (Jovel *et al.*, 2004) e *Okra mottle virus*, uma nova espécie que infecta quiabo reportada no Brasil (Aranha, 2008; Fernandes *et al.*, 2009). Estes vírus foram identificados em uma amostragem relativamente pequena de sojas infectadas, sugerindo que, ao contrário do feijoeiro, soja parece ser hospedeira de uma grande diversidade de espécies de begomovírus. Consequentemente, a hipótese de que soja seja um excelente reservatório para infecções múltiplas que possam direcionar a emergência de novas espécies mais patogênicas com a capacidade de infectar feijoeiros não pode ser descartada dentro do cenário agrícola brasileiro. Provavelmente, a presença de um cultivar transgênico imune a BGMV liberado para plantio no Brasil pode acelerar este processo evolutivo.

4.3. Construção do vetor de silenciamento derivado de SoCV

4.3.1. A proteína do capsídeo não é essencial para a infecção sistêmica de SoCSV em soja

O gene da proteína do capsídeo foi interrompido em pUFV1591, por meio de digestão com a enzima *Eco*NI e subsequente preenchimento das extremidades coesivas com DNA polimerase. Este procedimento promoveu a mudança do quadro de leitura da proteína do capsídeo na posição 27 da sequência de aminoácidos. A inativação do gene CP foi feita baseado-se no princípio de que os begomovírus não requerem a proteína capsidial para causar infecção sistêmica (Saunders *et al.*, 1991). Para confirmar se a CP realmente não é requerida para a infecção viral sistêmica, o DNA plasmidial do clone pUFV1712, juntamente com o DNA plasmidial do clone pUFV1592, foram inoculados em cotilédones de soja via biobalística. O diagnóstico da infecção foi confirmado por PCR de DNA de folhas sistêmicas 21dpi (dias pós-inoculação) e desenvolvimento de sintomas. Em todas as sete plantas inoculadas, foi detectado o acúmulo do DNA viral (Figura 26) e pontos cloróticos foram observados, mostrando sintomas característicos da infecção viral (Figura 27).

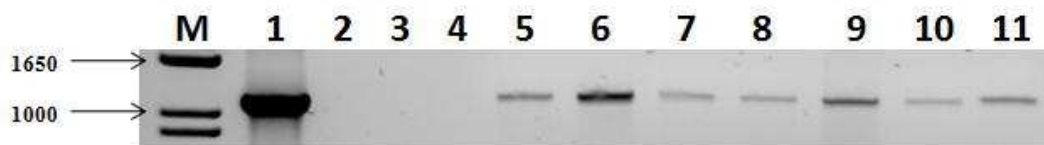


Figura 26. Padrão eletroforético em gel de agarose (1%) da confirmação da infecção viral das plantas inoculadas com DNA dos clones pUFV1712 + pUFV1592 via PCR. DNA total extraído de folhas sistêmicas de plantas inoculadas com pUFV1712 + pUFV1592 foi utilizado como molde em reações de PCR. **M**, marcador de comprimento (“1Kb plus DNA ladder”, em nt); **1**, controle positivo, resultado do PCR a partir do DNA plasmidial do clone pUFV1591; **2-4**, controle negativo, resultado do PCR do DNA total de plantas inoculadas com partículas de tungstênio sem DNA viral; **5-7**, resultado do PCR do DNA total de

plantas inoculadas com partículas de tungstênio contendo o DNA plasmidial do clone pUFV1712, juntamente com o DNA plasmidial do clone pUFV1592.

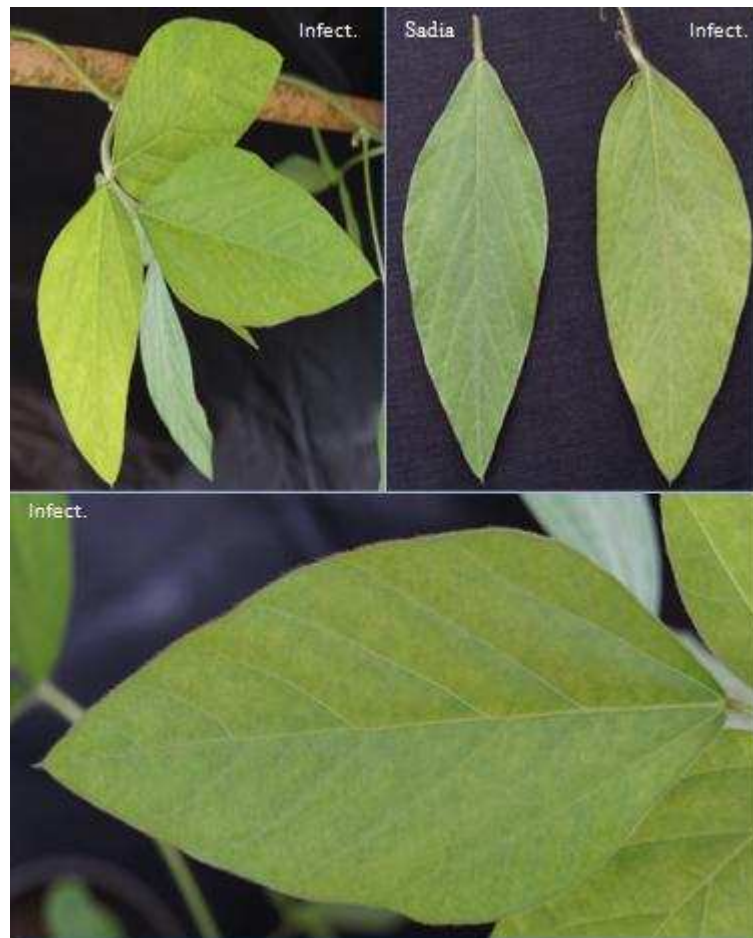


Figura 27. Sintomas observados em plantas de *Glycine max* 'Conquista' inoculadas via biobalística com o clone pUFV1712, juntamente com o DNA plasmidial do clone pUFV1592.

4.3.2. Construção do vetor de silenciamento viral baseado em SoCSV

A estratégia para construção do vetor de silenciamento derivado do componente A de SoCSV foi descrita em detalhes na seção material e métodos. Resumidamente, o fragmento *NcoI* de 1726 bp, contendo sequências da proteína do capsídeo e sequências parciais de Ren e Trap, foi removido de pUFV1591. Em seguida as sequências de Ren e Trap foram refeitas no vetor de silenciamento com a inserção de um fragmento amplificado contendo extensões com sítios múltiplos de clonagem, resultando no clone pUFV1713, vetor de silenciamento, cujo mapa é mostrado na Figura 28. No mapa do vetor de silenciamento, esta indicado o sítio múltiplo de clonagem nas extremidades da proteína do capsídeo truncada, a direção e extensão das ORFs virais é indicada pelas setas, o stem loop esta destacado em duplicata, mostrando que as sequências virais foram clonadas entre duas origens de replicação do vírus. Consequentemente, nas células vegetais, um episome circular é liberado do plasmídeo recombinante por replicação ou recombinação e replica independentemente do genoma do hospedeiro, podendo ser detectado por PCR como mostrado na Figura 26.

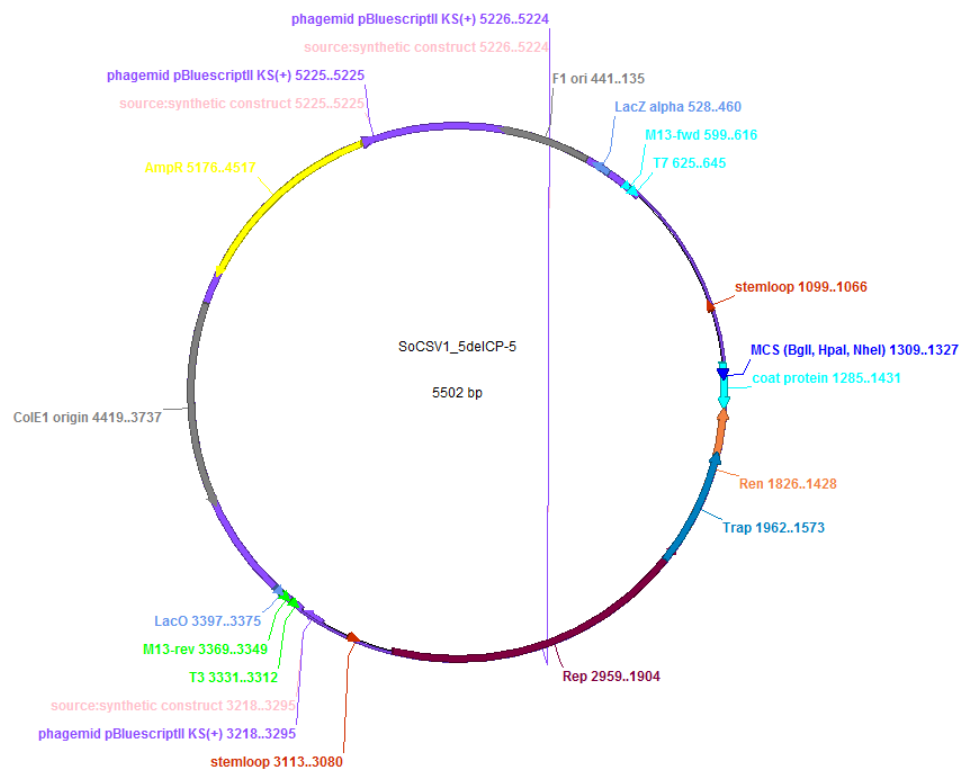


Figura 28. Mapa do vetor de silenciamento viral (clone pUFV1713) utilizando o programa ApE-A Plasmid Editor. O sítio múltiplo de clonagem esta indicado na extremidade da proteína do capsídeo truncada, a direção e extensão das ORFs virais é indicada pelas setas, o stem loop esta destacado em duplicata, mostrando que as sequências virais foram clonadas entre duas origens de replicação do vírus.

4.4. Silenciamento do gene *ChlI* (*magnesium chelatase subunit I*) da soja induzida pelo vetor pUFV1713

A eficiência de pequenas sequências para induzir o silenciamento de genes endógenos tem sido descritas por diferentes autores (Miles *et al.*, 2005). Por exemplo, um experimento utilizando VIGS já demonstrou que o gene fitoeno dessaturase pode ser silenciado com insertos de até 23 nucleotídeos (Thomas *et al.*, 2001). Porém, o silenciamento não é tão amplo e é mais transiente do que quando são utilizados fragmentos de 150 a 500 nt. Insertos de tamanhos maiores também podem ser usados, entretanto normalmente são mais instáveis em vetores virais e não levam a um aumento no fenótipo de silenciamento (Lu *et al.*, 2003). Assim sendo, um fragmento de aproximadamente 350pb do gene *ChlI* de soja foi amplificado e inserido no sítio múltiplo de clonagem do vetor de silenciamento pUFV1713. A hipótese levantada seria que este vetor de silenciamento produziria siRNA de *ChlI* em soja para eliminar a expressão do gene de referência, tal que ocorreria amarelecimento das folhas de soja, um fenótipo típico do silenciamento do gene *ChlI* (Jeddeloh *et al.*, 1998). Nove plantas de soja foram inoculadas com o DNA plasmidial da construção pUFV1732 (DNA-A do vetor de silenciamento contendo o fragmento do gene *ChlI*) e pUFV1592 (DNA-B de SoCSV). A infecção viral foi confirmada via PCR 21 dpi (Figura 29). Das nove plantas inoculadas, o acúmulo do DNA viral foi detectado em apenas quatro (canaletas 5, 6, 9 e 11-Figura 29). Provavelmente, o baixo número de plantas infectadas se deu por uma ineficiência no processo de inoculação ou alta eficiência do vetor baseado em SoCSV em induzir silenciamento em folhas de soja, comprometendo o acúmulo do DNA viral. Seria interessante comprovar esta hipótese através da detecção de siRNAs de sequências dos componentes virais por northern blot.

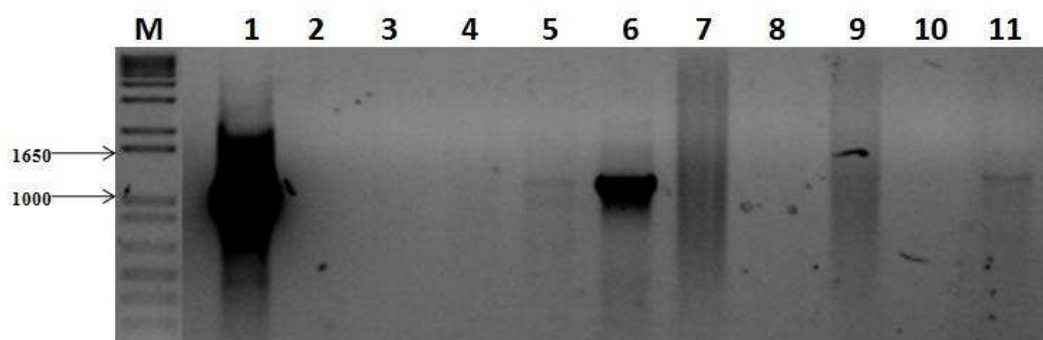


Figura 29. Padrão eletroforético em gel de agarose (1%) da confirmação da infecção viral via PCR. DNA de folhas sistêmicas foi extraído e utilizado como molde em PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para o DNA-A de SoCSV. **M**, marcador de comprimento (“1Kb plus DNA ladder”, em nt); **1**, controle positivo, amplificação a partir do DNA plasmidial do clone pUFV1591; **2**, controle negativo, amplificação a partir do DNA total de plantas inoculadas com partículas de tungstênio sem DNA viral; **3-11**, amplificação do DNA total de plantas inoculadas com partículas de tungstênio contendo o DNA plasmidial dos clones pUFV1732 e pUFV1592.

O silenciamento do gene *Chl* foi inicialmente avaliado nas plantas infectadas por PCR em tempo real (Figura 30). Todas as quatro plantas em que a infecção viral foi confirmada apresentaram diminuição dos níveis de expressão do mRNA do gene *Chl* em comparação com os níveis de expressão de uma planta não infectada. Contudo, o vetor VIGS induziu níveis diferentes de silenciamento do gene *Chl* em plantas inoculadas. Torna-se necessário avaliar se o nível de decaimento dos transcritos de *Chl* está relacionado com o acúmulo de siRNA de 21pb correspondente, para confirmar que o fenômeno de silenciamento está de fato sendo induzido pelo vetor VIGS baseado em SoCSV.

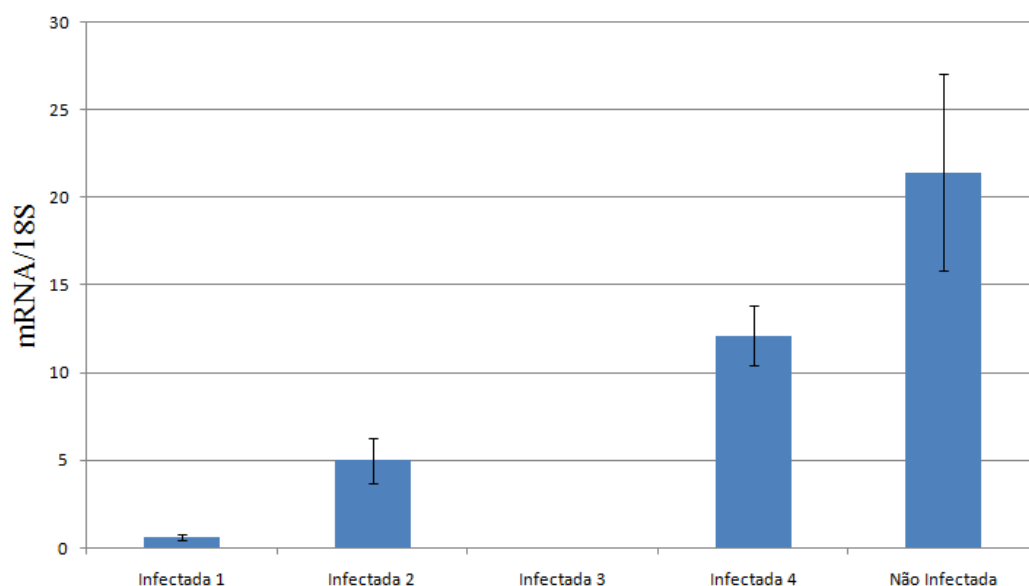


Figura 30. Quantificação por PCR em tempo real do mRNA do gene *magnesium chelatase subunidade I (ChII)*. Cotilédones de soja foram inoculadas com os vetores pUFV1732 (DNA-A + *ChII*) e pUFV1592 (DNA-B) e aos 28 dpi, RNA total foi extraído de folhas infectadas e a expressão do gene *ChII* foi determinada por RT-PCR quantitativo, utilizando o gene 18S como controle endógeno. **Infectada 1-4**, quantificação a partir do cDNA sintetizado do RNA total de plantas de soja bombardeadas com o vetor de silenciamento viral contendo um fragmento do gene *ChII*; **Não infectada**, quantificação a partir do cDNA sintetizado do RNA total de plantas inoculadas com partículas de tungstênio sem DNA viral. Os resultados estão plotados com o intervalo de confiança segundo o test t com 95% de confiança.

As plantas em que a infecção viral tinha sido confirmada foram observadas quanto ao aparecimento de sintomas característicos do silenciamento (Figura 31), correspondente ao fenótipo de amarelecimento foliar resultante do silenciamento do gene *ChII* (Tuttle *et al.*, 2008; Jeddeloh *et al.*, 1998). Foi constatado um maior amarelecimento das folhas em plantas

inoculadas com o vetor VIGS (Figura 28), fenótipo mais intenso que o amarelecimento provocado por SoCSV (Figura 21).

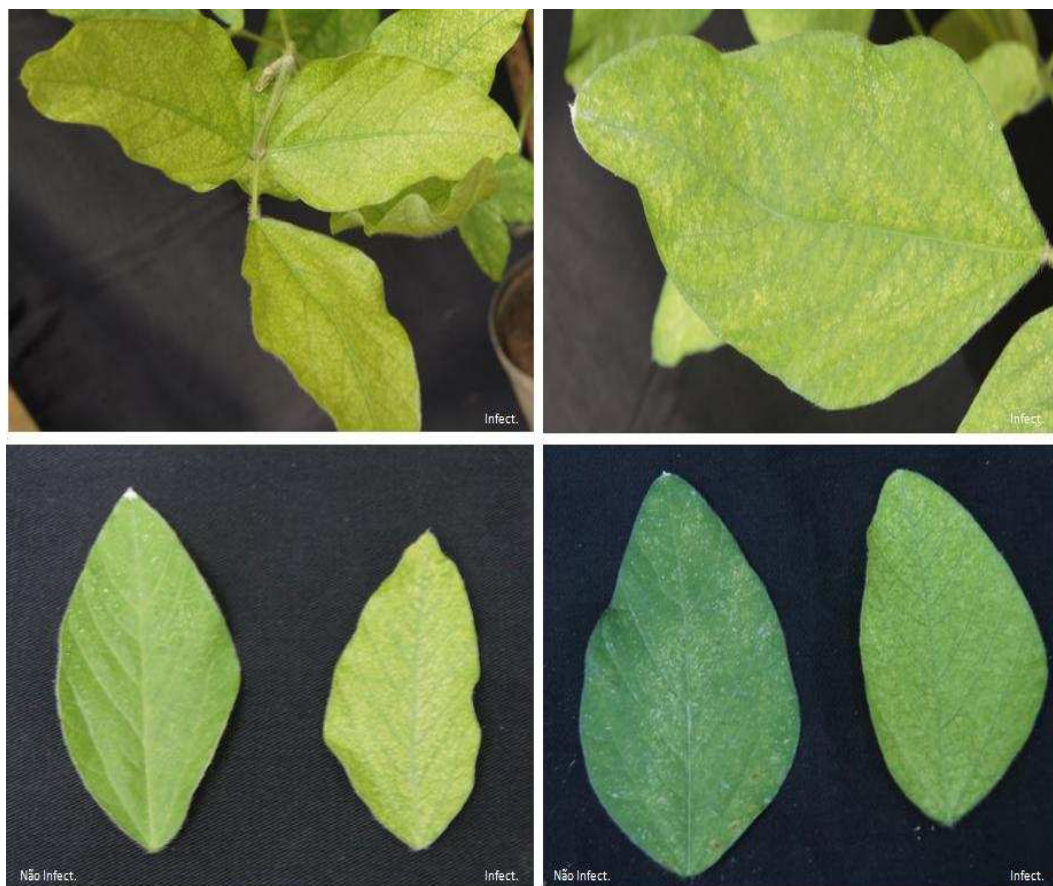


Figura 31. Fotos dos sintomas observados em folhas de *Glycine max* 'Conquista' inoculadas via biobalística com partículas de tungstênio contendo o DNA plasmidial dos clones pUFV1732 e pUFV1592.

Apesar de ter sido verificado a ocorrência de ácaros nas plantas usadas no experimento, a coloração prateada ou esbranquiçada nas folhas causada por ácaro também não interferiu no desenvolvimento do fenótipo amarelado intenso causado pelo silenciamento de *ChII*. Coletivamente, estes resultados sugerem que o vetor baseado em SoCSV é eficiente em silenciar genes endógenos, como *ChII*, da planta hospedeira soja e, consequentemente, funciona como um vetor VIGS. Uma vez que SoCSV é capaz de infectar feijão com alta eficiência, muito provavelmente o vetor VIGS derivado de SoCSV também funciona em feijão.

Ambas as leguminosas, feijão e soja, são recalcitrantes e difíceis de serem transformadas e conseqüentemente, o desenvolvimento de tecnologias para silenciamento transiente de genes nestas culturas aumenta a extensão do uso de genética reversa para elucidação de função gênica. Contudo, torna-se necessário avaliar o tropismo de tecido do referido vírus a fim de avaliar quais as limitações tecido-específica devem ser levadas em consideração nos estudos de silenciamento gênico. Para o caso de *Cotton leaf crumple virus* (CLCrV) que infecta apenas células no tecido vascular, silenciamento induzido pelo vírus parece ser efetivo apenas para genes que expressam nas células infectadas (Tuttle *et al.*, 2008). Por outro lado, tem sido demonstrado que sinais de silenciamento são sistemicamente propagados de vetores VIGS baseados em BCTV (*Beet curly top virus*) que são capazes de silenciar genes em meristemas (Golenberg *et al.*, 2009). Similarmente, tem sido demonstrado que em *N. benthamiana* silenciamento de genes endógenos induzido por begomovírus pode ser fisicamente separado da infecção viral (Peele *et al.*, 2001)

Ao contrário de VIGS mediado por geminivírus em *Arabidopsis*, tomate e *N. benthamiana* que produzem sintomas severos (Turnage *et al.*, 2002; Peele *et al.*, 2001; Golenberg *et al.*, 2009), o sistema de VIGS por SoCSV é menos sintomático reduzindo a interferência de sintomas causados pela infecção viral nos resultados de silenciamento. Mesmo que os sintomas de SoCSV pareçam atenuados, na avaliação de fenótipos associados com perda de função gênica, torna-se necessário incluir o vetor VIGS vazio como controle para eliminar os possíveis efeitos na mudança de expressão gênica devido ao vetor VIGS. Esta observação torna-se relevante para o uso do sistema VIGS descrito nesta investigação em projetos de grande escala que visam identificar função para um conjunto de ESTs de soja por meio de associação de fenótipos por genética reversa.

Dois sistemas VIGS para soja foram desenvolvidos recentemente. O primeiro refere-se à *Bean pod mottle virus* (BPMV) que se mostrou um vetor VIGS efetivo para soja. Entretanto, o vetor BPMV requer transcrição *in vitro* e inoculação de RNA, o que limita a sua aplicação em projetos de amplitude genômica (Zhang e Ghabrial, 2006). Mais recentemente, BPMV foi modificado pela incorporação do promotor 35S de CaMV resultando em um vetor baseado no DNA do BPMV. Isto possibilitou o uso de uma estirpe moderada de BPMV para VIGS em soja o que diminuiu a interferência causada por sintomas severos em folhas resultante da infecção pelo vírus (Zhang *et al.*, 2008). Contudo, a eficiência de inoculação permaneceu baixa. O vetor VIGS baseado no SoCSV descrito nesta investigação possui o potencial maior para aplicações em genômica funcional de soja, principalmente devido à facilidade de inoculação do DNA viral, eficiência de infecção e produção de sintomas leves em soja. Entretanto, uma melhor caracterização do processo de silenciamento induzido pelo vetor VIGS de SoCSV através da determinação da cinética de indução de VIGS induzida por SoCSV e do acúmulo de siRNA alvos são necessários para definir estratégias para aumento de eficiência do silenciamento. Por exemplo, mutações nas proteínas supressoras de silenciamento, Trap e AC4, podem ser efetivas para aumentar a eficiência do silenciamento de genes endógenos induzido pelo vetor SoCSV. Recentemente, a introdução de uma mutação na ORF AC2 (supressora de silenciamento) aumentou a eficiência de silenciamento de um vetor VIGS derivado de *Tomato leaf curl virus* (ToLCV, Pandey *et al.*, 2009). Estratégia similar pode ser empregada para aumento de eficiência do vetor de silenciamento descrito nesta investigação.

5-CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi construído um vetor viral baseado no DNA-A do begomovírus Soybean chlorotic spot virus para ser utilizado na indução do silenciamento de genes em plantas de soja. Com este propósito, inicialmente foi isolado uma nova espécie de begomovírus que infecta soja, designada provisoriamente de Soybean chlorotic spot virus (SoCSV). O DNA-A de SoCSV apresentou maior nível de conservação de sequência com o *Macropodium yellow spot virus* (85% de identidade), mas suficientemente dissimilar (menos que 89%) para ser considerado uma nova espécie do gênero *Begomovirus*. Além disso, SoCSV mostrou uma gama de hospedeiro própria e induziu sintomas em plantas indicadoras e cultivadas. SoCSV causou sintomas mais severos nas espécies *Phaseolus vulgaris* 'Pérola', e 'Ouro Negro', o que pode refletir numa maior adaptabilidade do vírus no feijão do que na soja. Dado o cenário agrícola brasileiro, estes resultados indicam o risco de possíveis eclosões de begomovíruses atenuados em soja para espécies patogênicas em feijão.

Um vetor de silenciamento baseado em SoCSV (pUFV1732) foi construído por meio de substituição de sequências da proteína do capsídeo por um sítio múltiplo de clonagem no clone infeccioso que contém uma cópia e meia do genoma viral. A capacidade do vetor viral em induzir o silenciamento de genes endógenos de soja foi avaliada com a clonagem de um fragmento do gene *magnesium chelatase subunit I* (*ChII*) de soja no sítio múltiplo de clonagem. O silenciamento induzido do gene endógeno foi confirmado pelo amarelecimento das folhas causado pela inativação de *ChII* e por decaimento dos transcritos correspondentes em plantas infectadas com o DNA-A VIGS e o DNA-B de SoCSV. Para melhor avaliar a eficiência do vetor na indução do silenciamento de RNA, como experimento futuro, torna-se necessário comprovar por análise molecular o acúmulo de siRNAs. Uma vez comprovado o seu potencial de uso

como vetor VIGS, o clone pUFV1713 poderá ser utilizado em estudos de genômica funcional, para a análise genes envolvidos em diversos processos biológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alabi, O.J., Kumar, P.L., Mgbechi-Ezeri, J.U., Naidu, R.A. (2010) Two new 'legumoviruses' (genus Begomovirus) naturally infecting soybean in Nigeria. *Archives of Virology*, 155:643-56.
- Angel, S.M. e Baulcombe, D.C. (1999) Potato virus X amplicon mediated silencing of nuclear genes. *Plant Journal*, 3:357-362.
- Aragão, F.J.L., Barros, L.M.G., Brasileiro, A.C.M., Ribeiro, S.G., Smith, F.D., Stanford, J.C., Faria, J.C., Rech, E.L. (1996) Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theoretical and Applied Genetics*, 93:142-150.
- Aragão, F.J.L. e Faria, J.C. (2009) First transgenic geminivirus resistant plant in the field. *Nature biotechnology*, v.27, N°12.
- Aranha, S.A. (2008) Mosaico do quiabeiro: etiologia, caracterização molecular e biológica e diversidade genética do patógeno. Dissertação M.S, Universidade de Brasília, UNB.
- Arguello-Astorga, G., Guevara-Gonzalez, R.G., Herrera-Estrella, L.R., Rivera Bustamante, R.F (1994) Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: a model for replication. *Virology*, 203:90-100.
- Baulcombe, D.C. (1999). Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 109-113.
- Baulcombe, D.C. (2004) RNA silencing in plants. *Nature*, 431:356-363.
- Bender, J., e Fink, G.R. (1995) Epigenetic control of an endogenous gene family is revealed by a novel blue fluorescent mutant of *Arabidopsis*. *Cell*, 83:725-34.
- Briddon, R.W., Bull, S.E., Amin, I., Idris, A.M., Mansoor, S., Bedford, I.D., Dhawan, P., Rishi, N., Siwatch, S.S., Abdel-Salam, A.M., Brown, J.K., Zafar, Y., Markham, P.G. (2003) Diversity of DNA beta, a satellite molecule associated with some monopartite begomoviruses. *Virology*, 312:106-121.
- Briddon, R.W. e Stanley, J. (2006) Subviral agents associated with plant single-stranded DNA viruses. *Virology*, 344:198-210.
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y.Y., Sieburth, L., Voinnet, O. (2008) Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science*, 320:1185-1190.

- Brown, J.K., Ostrow, K.M., Idris, A.M., Stenger, D.C. (1999) Biotic, molecular, and phylogenetic characterization of *Bean calico mosaic virus*, a distinct *Begomovirus* species with affiliation in the Squash leaf curl virus cluster. *Virology*, 89:273-280.
- Burch-Smith, T.M., Anderson, J.C., Martin, G.B., Dinesh-Kumar, S.P (2004) Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *Plant Journal*, 39:734-746.
- Carvalho, C.M., Machado, J.P.B., Zerbini, F.M., Fontes, E.P.B. (2008) NSP-interacting GTPase: A cytosolic protein as cofactor for nuclear shuttle proteins. *Plant Signaling & Behavior*, 39:752-754.
- Castillo-Urquiza, G.P., Beserra, J.E.A. Jr., Bruckner, F.P., Lima, A.T.M., Varsani A., Alfenas-Zerbini, P., Zerbini, F.M. (2008) Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Archives of Virology*, 153:1985–1989.
- Chakraborty, S., Vanitharani, R., Chattopadhyay, B., Fauquet, C.M. (2008) Supervirulent pseudorecombination and asymmetric synergism between genomic components of two distinct species of begomovirus associated with severe tomato leaf curl disease in India. *Journal of General Virology*, 89:818-828.
- Chen, X. (2009) Small RNAs and their roles in plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25:21–44.
- Constantin, G.D., Krath, B.N., MacFarlane, S.A., Nicolaisen, M., Johansen, I.E., Lund, O.S. (2004) Virus-induced gene silencing as a tool for functional genomics in a legume species. *Plant Journal*, 40:622–31.
- Costa, A.S. (1955) Studies on Abutilon mosaic in Brazil. *Phytopathologische Zeitschrift*, 24:97-112.
- Costa, A.S (1965) Three Whitefly-transmitted virus diseases of beans in São Paulo, Brazil. *FAO Plant Protection Bulletin*, 13:2-12.
- Costa, A.S., Miranda, M.A.C., Almeida, A.M.R (1979) Ocorrência de infecção natural de certas cultivares de soja com o vírus do mosaico dourado do feijoeiro. *Semin. Nac. De Pesq. de Soja*, I, Anais. Vol.II, p. 145-150.
- Dalmay, T., Hamilton, A., Mueller, E., Baulcombe, D.C (2000) Potato virus X amplicons in *Arabidopsis* mediate genetic and epigenetic gene silencing. *Plant Cell*, 12:369-379.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. e Hicks, J.B. (1983) A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1:19-21.

- Demmig-Adams, B., Adams, W.W. (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology*, 43: 599-626.
- Ding, S.W., Li, H., Lu, F., Li, F., Li, W.X (2004) RNA silencing: A conserved antiviral immunity of plants and animals. *Virus Research*, 102:109-115.
- Ding, S.W. e Voinnet, O (2007) Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*, 130:413-426.
- Faria, J.C (1994) Mosaico Dourado. In: Sartorato, A., Rava, C. A. (Ed). *Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle*. Brasil. Embrapa, p. 263-284.
- Faria, J.C., e Maxwell, D.P. (1999) Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. *Phytopathology*, 89: 262–268.
- Fauquet C.M., Briddon R.W., Brown J.K., Moriones E., Stanley J., Zerbini M., Zhou X (2008) Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology*, 153:783-821.
- Fernandes, F.R., Cruz, A. R. R., Faria, J. C., Zerbini, F. M., Aragão, F. J. L. (2009). Three distinct begomoviruses associated with soybean in central Brazil. *Archives Virology*, 154:1567–1570.
- Fernandes, F.R, De Albuquerque, L.C., De Britto Giordano, L., Boiteux, L.S., De Avila, A.C, Inoue-Nagata, A.K. (2008) Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes*, 36:251-258.
- Ferreira, S.S., Barros, D.R, Almeida, M.R, Zerbini, F.M. (2010) Characterization of Passionfruit severe leaf distortion virus, a novel begomovirus infecting passionfruit in Brazil, reveals a close relationship with tomato-infecting begomoviruses . *Plant Pathology*, 59:221–230.
- Fofana I, Sangare A, Collier R, Taylor C, Fauquet C (2004) A geminivirus-induced gene silencing system for gene function validation in cassava. *Plant Molecular Biology*, 56:613–24.
- Fontenelle, M.R., Luz, D.F., Gomes, A.P., Florentino, L.H., Zerbini, F.M., Fontes., E.P. (2007) Functional analysis of the naturally recombinant DNA-A of the bipartite begomovirus *Tomato chlorotic mottle virus*. *Virus Research*, 126:262-267.
- Fontes, E.P.B., Eagle, P.A., Sipe, P.S., Luckow, V.A., Hanley-Bowdoin, L (1994) Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. *Journal of Biological Chemistry*, 269:8459-8465.

- Fontes, E.P.B., Luckow, V.A., Hanley-Bowdoin, L. (1992) A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. *Plant Cell*, 4:597-608.
- Frischmunth, T., Wege, C., Hulser, D., Jeske, H. (2007) The movement protein BC1 promotes redirection of the nuclear shuttle protein BV1 of Abutilon mosaic geminivirus to the plasma membrane in fission yeast. *Protoplasma*, 230:117-123.
- Galvão, R.M., Mariano, A.C., Luz, D.F., Alfenas, P.F., Andrade, E.C., Zerbini, F.M., Almeida, M.R., Fontes, E.P.B (2003) A naturally occurring recombinant DNA-A of a typical bipartite begomovirus does not require the cognate DNA-B to infect *Nicotiana benthamiana* systemically. *Journal of General Virology*, 84:715-726.
- Gilbertson, R.L., Sudarshana, M., Jiang, H., Rojas, M.R., Lucas, W.J. (2003) Limitations on geminivirus genome size imposed by plasmodesmata and virus-encoded movement protein: Insights into DNA-A trafficking. *Plant Cell*, 15:2578-2591.
- Godge, M.R., Purkayastha, A., Dasgupta, I., Kumar, P.P (2008) Virus induced gene silencing for functional analysis of select genes. *Plant Cell Reports*, 27:209-219.
- Golenberg, E.M., Sather, D. N., Hancock, L.C., Buckley, K.J., Villafranco, N.M., Bisaro, D.M. (2009) Development of a gene silencing DNA vector derived from a broad host range geminivirus. *Plant Methods*, 5:9.
- Gutierrez, C. (1999) Geminivirus DNA replication. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 56:313-329.
- Gutierrez, C., Ramirez-Parra, E., Castellano, M.M., Sanz-Burgos, A.P., Luque, A., Missich, R. (2004) Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. *Veterinary Microbiology*, 98:111-119.
- Hanley-Bowdoin, L., Settlage, S.B., Orozco, B.M., Nagar, S., Robertson, D (1999) Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18:71-106.
- Hanley-Bowdoin, L., Settlage, S.B., Robertson, D. (2004) Reprogramming plant gene expression: a prerequisite to geminivirus DNA replication. *Molecular Plant Pathology*, 5:149-156.
- Harrison, B.D. e Robinson, D.J. (1999) Natural genomic and antigenic variation in white-fly transmitted geminiviruses (begomoviruses). *Annual Review of Phytopathology*, 39:369-398.
- Hofgen, R., Axelsen, K.B., Kannangara, C.G., Schuttke, I., Pohlenz. H.D. (1994) A visible marker for antisense mRNA expression in plants:

- inhibition of chlorophyll synthesis with a glutamate-1-semialdehyde aminotransferase antisense gene. *PNAS*, 91:1726–30.
- Holzberg, S., Brosio, P., Gross, C., Pogue, G.P. (2002) Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant. *Plant*, 30:315–27.
- Jeddeloh, J.A., Bender, J., Richards, E.J. (1998) The DNA methylation locus DDM1 is required for maintenance of gene silencing in *Arabidopsis*. *Genes e Development.*, 12:1714–25.
- Jovel, J., Reski, G., Rothenstein, D., Ringel, M., Frischmuth, T. Jeske, H. (2004) *Sida micrantha* mosaic is associated with a complex infection of begomoviruses different from *Abutilon* mosaic virus. *Archives Virology*, 149:829-841.
- Kleinow, T., Holeiter, G., Nischang, M., Stein, M., Karayavuz, M., Wege, C., Jeske, H. (2008) Post-translational modifications of *Abutilon* mosaic virus movement protein (BC1) in fission yeast. *Virus Research*, 131:86-94.
- Kjemtrup, S., Sampson, K.S., Peele, C.G., Nguyen, L.V., Conkling, M.A. (1998) Gene silencing from plant DNA carried by a Geminivirus. *Plant Journal*, 14:91–100.
- Kumagai, M.H., Donson, J., Della-Cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K. and Grill, L.K. (1995). Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *PNAS*, 92:1679-1683.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M. (2004) MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5:150-163.
- Kusaba M (2004) RNA interference in crop plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 15:139–143.
- Laufs, J., Schumacher, S., Geisler, N., Jupin, I., Gronenborn, B. (1995) Identification of the nicking tyrosine of geminivirus Rep protein. *FEBS Letters*, 377:258-262.
- Lazarowitz, S.G. (1992) Geminiviruses: genomes structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Science*, 11:327-349.
- Levy, A. e Tzfira, T. (2010) Bean dwarf mosaic virus: a model system for the study of viral movement. *Molecular Plant Pathology*, 11:451-461.
- Liu, Y., Schiff, M., Serino, G., Deng, X.W., Dinesh-Kumar, S.P. (2002) Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the N gene-mediated resistance response to Tobacco mosaic virus. *Plant Cell*, 14:1483–1496.

- Llave, C., Kasschau, K.D., Rector, M.A., Carrington, J.C. (2002) Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell*, 14:1605–1619.
- Lu, R., Martin-Hernandez, A.M., Peart, J.R., Malcuit, I., Baulcombe, D.C. (2003) Virus-induced gene silencing in plants. *Methods*, 30:296–303.
- Mariano, A.C., Andrade, M.O., Santos, A.A., Carolino, S.M.B., Oliveira, M.L., Baracat-Pereira, M.C., Brommonshenkel, S.H., Fontes, E.P.B. (2004) Identification of a novel receptor-like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein. *Virology*, 318:24-31.
- Meister, G. e Tuschl, T. (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431:343-349.
- Mello, R.N., Cotrim, M.A.A., Lopes, E.F., Moreira, A.G., Contin, F.S., Fontes, E.P.B., Almeida A.M.R., Zerbini, F.M. (2002) Survey of begomoviruses associated with soybean and identification of Sida mottle virus (SiMoV) infecting this crop in Brazil. *Virus Research*, 7:157.
- Menten, J.O., Roston, A.J (1980) Mosaico dourado e a necessidade da regionalização da cultura do feijoeiro no Estado de São Paulo. *Revista da Agricultura*, 55:287-300.
- Meza, T.J., Kamfjord, D., Hakelien, A.M., Evans, I., Godager, L.H. (2001) The frequency of silencing in *Arabidopsis thaliana* varies highly between progeny of siblings and can be influenced by environmental factors. *Transgenic Research*, 10:53–67.
- Miles, G.P., Samuel, M.A., Zhang, Y., Ellis, B.E. (2005) RNA interference-based (RNAi) suppression of AtMPK6, an *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase, results in hypersensitivity to ozone and misregulation of AtMPK3. *Environmental Pollution*, 138:230-237.
- Monci, F., Sanchez-Campos, S., Navas-Castillo, J., Moriones, E. (2002) A natural recombinant between the geminiviruses Tomato yellow leaf curl Sardinia virus and Tomato yellow leaf curl virus exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Virology*, 303: 317-326.
- Naidu, R.E., Gowda, S., Satyanarayana, T., Boyko, V., Reddy, A.S., Dawson, W.O., Reddy, D.V.R (1998) Evidence that whitefly-transmitted cowpea mild mottle virus belongs to the genus *Carlavirus*. *Archives of Virology*, 143:769-780.
- Nawaz-ul-Rehman, M.S., Nahid, N., Mansoor, S., Briddon, R.W., Fauquet, C.M. (2010) Post-transcriptional gene silencing suppressor activity of two non-pathogenic alpha-satellites associated with a begomovirus. *Virology*, 405:300–308.

- Noueiry, A.O., Lucas, W.J., Gilbertson, R.L. (1994) Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmatal transport. *Cell*, 76:925–932.
- Orozco, B.M. e Hanley-Bowdoin, L. (1998) Conserved sequence and structural motifs contribute to the DNA binding and cleavage activities of a geminivirus replication protein. *Journal of Biological Chemistry*, 273:24448-24456.
- Palmer, K.E. e Rybicki, E.P. (1998) The molecular biology of mastreviruses. *Advances in Virus Research*, 50:118-234.
- Pandey, P., Choudhury, N.R., Mukherjee, S.K. (2009) A geminiviral amplicon (VA) derived from *Tomato leaf curl virus* (ToLCV) can replicate in a wide variety of plant species and also acts as a VIGS vector. *Virology*, 6:152.
- Paprotka, T., Metzler, V., Jeske, H. (2010) The first DNA 1-like α satellites in association with New World begomoviruses in natural infections. *Virology*, 404:148–157.
- Peele, C., Jordan, C.V., Muangsan, N., Turnage, M., Egelkrout, E., Eagle, P., Hanley-Bowdoin, L., Robertson, D. (2001). Silencing of a meristem gene using geminivirus-derived vectors. *Plant Journal*, 27:357-366.
- Pita, J.S., Fondong, V.N., Sangare, A., Otim-Nape, G.W., Ogwal, S., Fauquet, C.M. (2001) Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. *Journal of General Virology*, 82:655-665.
- Potter, J.L., Nakha, M.K., Mejia, L., Maxwell, D.P. PCR and DNA hybridization methods for specific detection of bean-infecting begomoviruses in the Americas and Caribbean. *Plant Disease*, 87:1205-1212.
- Ramos, P.L., Guevara-Gonzalez, R.G., Peral, R., Ascencio-Ibanez, J.T., Polston, J.E., Arguello-Astorga, G.R., Veja-Arreguin, J.C., Rivera-Bustamante, R.F. (2003) Tomato mottle Taino virus pseudorecombines with PYMV but not with ToMoV: Implications for the delimitation of cis- and trans- acting replication specificity determinants. *Archives of Virology*, 148:1697-1712.
- Ratcliff, F., Harrison, B.D., Baulcombe, D.C. (1997) A similarity between viral defence and gene silencing in plants. *Science*, 276:1558-1560.
- Ratcliff, F., Martin-Hernandez, A.M., Baulcombe, D.C. (2001). Technical advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant Journal*, 25:237–45.

- Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B., Bartel, D.P. (2002) MicroRNAs in plants. *Genes e Development*, 16: 1616–1626.
- Ribeiro, S.G., Ambrozevicius, L.P., Ávila, A.C., Bezerra, I.C., Calegario, R.F., Fernandes, J.J., Lima, M.F., Mello, R.N., Rocha, H., Zerbini, F.M. (2003) Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives Virology*, 148:281–295.
- Robertson, D. (2004) VIGS vectors for gene silencing: many targets, many tools. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 495–519.
- Rodríguez-Pardina, P.E., Ploper, D., Laguna, I.G., Truol, G.A., Hanada, K., Rivas-Plastero, G.G., Ramirez, P., Herrera, P.S (1998) Presencia de um geminivirus em cultivos de soja del Noroeste Argentino. *Avance Agroindustrial*, 19:38-41.
- Rodríguez-Pardina, P.E., Zerbini, F.M., Ducasse, D.A (2006) Genetic diversity of begomoviruses infecting soybean, bean and associated weeds in Northwestern Argentina. *Fitopatologia Brasileira*, 31: 342-348.
- Rojas, M.R., Gilbertson, R.L., Russel, D.R., Maxwell, D.P. (1993). Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detection whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease*, 77:340-347.
- Rojas, M.R., Hagen, C., Lucas, W.J., Gilbertson, R.L (2005) Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology*, 43:361-394.
- Rojas, M.R., Jiang, H., Salati, R., Xoconostle-Cazares, B., Sudarshana, M.R., Lucas, W.J., Gilbertson, R.L. (2001) Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, *Tomato yellow leaf curl virus*. *Virology*, 291, 110–125.
- Rojas, M.R., Noueiry, A.O., Lucas, W.J., Gilbertson, R.L. (1998) Bean dwarf mosaic geminivirus movement proteins recognize DNA in a form- and size specific manner. *Cell*, 95, 105–113.
- Romay, G., Chirinos, D., Geraud-Pouey, F., Desbiez, C. (2010) Association of an atypical alphasatellite with a bipartite New World begomovirus. *Archives Virology*, 155:1843–1847.
- Ruiz, M.T., Voinnet, O., Baulcombe, D.C. (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing . *Plant Cell*, 10:937.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (2001) *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sanderfoot, A.A., Lazarowitz, S.G. (1995) Cooperation in viral movement: the geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery. *Plant Cell*, 7:1185-1194.
- Sakai, J, Rodríguez-Pardina, P.E., Onuki, M., Usugi, T., Shohara, K., Hanada, K (1997) Nucleotide sequence of a geminivirus isolate detected from soybean showing yellow and roguess symptoms in Argentina. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 63:270.
- Saunders, K., Bedford, I.D., Briddon, R.W., Markham, P.G., Wong, S.M., Stanley, J. (2000) A unique virus complex causes *Ageratum* yellow vein disease. *PNAS*, 97:12.
- Saunders, K., Lucy, A., Stanley, J. (1991) DNA forms of the geminiviruses African cassava mosaic virus are consistent with a rolling circle mechanism of replication. *Nucleic Acids Research*, 19:2325-2330.
- Saunders, K., Salim, N., Mali, V.R., Malathi, V.G., Briddon, R., Markham, P.G., Stanley, J. (2002) Characterisation of Sri Lankan cassava mosaic virus and Indian cassava mosaic virus: evidence for acquisition of a DNA B component by monopartite begomovirus. *Virology*, 293:63–74.
- Sediyama, T., Kuhl, R.A.S., Almeida, L.A (1981) Genética e melhoramento da soja. In: Meyasaka, S., Medina, J.C. (Ed.). *Cultura da Soja no Brasil*. Campinas: Ital. p. 209-240.
- Senthil-Kumar, M., Gowda, H.V.R., Hema, R., Mysore, K.S., Udayakumar, M. (2008) Virus-induced gene silencing and its application in characterizing genes involved in water-deficit-stress tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 165:1404-1421.
- Senthil-Kumar, M., Mysore, K.S. (2011) Virus-induced gene silencing can persist for more than 2 years and also be transmitted to progeny seedlings in *Nicotiana benthamiana* and tomato. *Plant Biotechnology Journal*, 1–10.
- Stanley, J., (1995) Analysis of African cassava mosaic virus recombinants suggest strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. *Virology*, 206: 707-712.
- Stanley, J., Bisaro, D.M., Briddon, R.W., Brown, J.K., Fauquet, C.M., Harrison, B.D., Rybicki, E.P. & Stenger, D.C (2005) Family *Geminiviridae*. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Ed.). *Virus Taxonomy*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press, p. 301-326.

- Susi, P., Hohkuri, M., Wahlroos, T., Kilby, N.J (2004) Characteristics of RNA silencing in plants: Similarities and differences across kingdoms. *Plant Molecular Biology*, 54:157-174.
- Szittyá, G., Silhavy, D., Molnár, A., Havelda, Z., Lovas, A., (2003) Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *EMBO Journal*., 22:633–40.
- Teng, K.L., Chen, H., Lai, J.B., Zhang, Z.H., Fang, Y.Y., Xia, R., Zhou, X.P., Guo, H.S., Xie, Q. (2010) Involvement of C4 protein of Beet severe curly top virus (Family *Geminiviridae*) in virus movement. *Plos One*, 5.
- Tenllado F, Llave C, Diaz-Ruiz JR (2004) RNA interference as a new biotechnological tool for the control of virus diseases in plants. *Virus Research*.,102: 85–96.
- Thomas, C.L., Jones, L., Baulcombe, D.C., Maule, A.J. (2001) Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector . *Plant Journal*, 25:417- 425.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680.
- Turnage, M.A., Muangsang, N., Peele, C.G., Robertson, D. (2002) Geminivirus-based vectors for gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 30:107-114.
- Tuttle, J.R., Idris, A.M., Brown, J.K., Candace, H.H., Robertson, D. (2008) Geminivirus-mediated gene silencing from cotton leaf crumple virus is enhanced by low temperature in cotton. *Plant Physiology*, 148:41–50.
- Valverde, R.A., Sim, J., Lotrakul, P (2004) Whitefly transmission of sweet potato viruses. *Virus Research*, 100:123-128.
- Vanitharani, R., Chellappan, P., Pita, J.S., Fauquet, C.M (2004) Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology*, 78:9487-98.
- Vizcarret, M.M (1999) La situación actual de las moscas blancas en la Argentina: Perspectivas de Manejo. *Anais, VII Encontro Latino-americano e do Caribe sobre Moscas Brancas e Geminivirus Recife, Brasil*, p.59-63.

- Voinnet, O., Pinto, Y.M., Baulcombe, D.C (1999) Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *PNAS*, 96:14147-14152.
- Voinnet, O. (2002) RNA silencing: small RNAs as ubiquitous regulators of gene expression. *Current Opinion Plant Biology*, 5:444-51.
- Zhang, C. e Ghabrial, S.A. (2006) Development of bean pod mottle virus based vectors for stable protein expression and sequence-specific virus-induced gene silencing in soybean. *Virology*, 344:401-411.
- Zhang, C., Yang, C., Whitham, S.A., Hill, J.H. (2008) Development and use of an Efficient DNA-based viral gene silencing vector for soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22: 2.
- Waterhouse, P.M. e Helliwell, C.A (2003) Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nature Reviews Genetics*, 4:29-38.
- Watson, J.M., Fusaro, A.F., Wang, M., Waterhouse, P.M. (2005) RNA silencing platforms in plants. *FEBS Letters*, 579: 5982–5987.
- Wu, P. e Zhou, X. (2005) Interaction between a nanovirus-like component and the *Tobacco curly shoot virus*/satellite complex. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37: 25–31.

ANEXOS

Tabela A1. Lista de abreviaturas e números de acesso dos genomas virais utilizados para a análise filogenética.

Espécie	Sigla Usada	N° de acesso no GenBank	
		DNA-A	DNA-B
<i>Abutilon Brazil virus</i>	AbBV	FN434438	FN434439
<i>Abutilon mosaic virus</i>	AbMV	X15983	X15984
<i>Bean calico mosaic virus</i>	BCaMV	AF110189	AF110190
<i>Bean dwarf mosaic virus</i>	BDMV	M88179	M88180
<i>Bean golden mosaic virus</i>	BGMV	M88686	M88687
<i>Bean golden yellow mosaic virus</i>	BGYMV	AF173555	AF173556
<i>Blainvillea yellow spot virus</i>	BIYSV	EU710756	EU710757
<i>Cabbage leaf curl virus</i>	CaLCuV	U65529	U65530
<i>Chino del tomate virus</i>	CdTV	AF101476	AF101478
<i>Cleome leaf crumple virus</i>	CILCrV	JF694461	JF694460
<i>Clerodendrum golden mosaic virus(outgroup)</i>	CIGMV		DQ641693
<i>Corchorus yellow spot virus</i>	CoYSV	DQ875868	DQ875869
<i>Cotton leaf crumple virus</i>	CLCrV	AF480940	AF480941
<i>Cucurbit leaf crumple virus</i>	CuLCrV	AF224760	AF224761
<i>Macropodium yellow mosaic Florida virus</i>	MaYMFV	AY044135	AY044136
<i>Macropodium yellow net virus</i>	MaYNV	JN418998	JN418999
<i>Macropodium yellow vein virus</i>	MaYVV	JN419021	n.d
<i>Macropodium yellow spot virus</i>	MaYSV	JN419018	n.d
<i>Okra mottle virus</i>	OMoV	EU914817	EU914818
<i>Okra yellow mosaic Mexico virus</i>	OYMMV	DQ022611	GU972604
<i>Passionfruit severe leaf distortion virus</i>	PSLDV	FJ972767	FJ972768
<i>Pepper golden mosaic virus</i>	PepGMV	U57457	AF499442
<i>Potato yellow mosaic virus</i>	PYMV	D00940	D00941
<i>Potato yellow mosaic Panama virus</i>	PYMPV	Y15034	Y15033
<i>Potato yellow mosaic Trinidad virus</i>	PYMTV	AF039031	AF039032
<i>Rhynchosia golden mosaic Yucatan virus</i>	RhGMYuV	EU021216	FJ792608
<i>Sida golden mosaic virus</i>	SiGMV	AF049336	AF039841
<i>Sida golden mosaic Costa Rica virus</i>	SiGMCRV	X99550	X99551
<i>Sida golden mosaic Florida virus-Malvastrum</i>	SiGMFV	HM003779	HM003778
<i>Sida golden mosaic</i>	SiGMHV	Y11097	Y11098

<i>Honduras virus</i>			
<i>Sida golden mottle virus</i>	SiGMoV	GU997691	GU997692
<i>Sida micrantha mosaic virus</i>	SimMV	AJ557451	AJ557453
<i>Sida mosaic Alagoas virus</i>	SiMAV	JF694471	JF694475
<i>Sida mottle virus</i>	SiMoV	AY090555	n.d
<i>Sida yellow mosaic virus</i>	SiYMV	AY090558	n.d
<i>Sida yellow mosaic Yucatan virus</i>	SiYMYuV	DQ875872	DQ875873
<i>Sida yellow vein virus</i>	SiYVV	Y11099	Y11100
<i>Solanum mosaic Bolivia virus</i>	SoMBoV	HM585435	HM585436
<i>Soybean blistering mosaic virus</i>	SbBMV	EF016486	n.d
<i>Squash leaf curl virus</i>	SqLCV	M38183	M38182
<i>Tobacco yellow crinkle virus</i>	TYCV	FJ213931	HQ896204
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i>	ToCMoV	AF491306	AF490004
<i>Tomato common mosaic virus</i>	ToCmMV	EU710754	EU710755
<i>Tomato golden mosaic virus</i>	TGMV	K02029	K02030
<i>Tomato interveinal chlorosis virus</i>	ToICV	JF803252	n.d
<i>Tomato Leaf Curl New Delhi virus (Outgroup)</i>	ToLCNDV	U15015	
<i>Tomato leaf curl Sinaloa virus</i>	ToLCSinV	AJ608286	AJ508783
<i>Tomato mild mosaic virus</i>	ToMIMV	EU710752	EU710753
<i>Tomato mosaic Havana virus</i>	ToMHV	Y14874	Y14875
<i>Tomato mottle Taino virus</i>	ToMoTV	AF012300	AF012301
<i>Tomato rugose mosaic virus</i>	ToRMV	AF291705	AF291706
<i>Tomato severe mottle Argentina virus</i>	TSMaV	JN564749	JN564750
<i>Tomato severe rugose virus</i>	ToSRV	DQ207749	EF534708
<i>Tomato yellow margin leaf curl virus</i>	TYMLCV	AY508993	AY508994
<i>Tomato yellow spot virus</i>	ToYSV	DQ336350	DQ336351
<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	ToYVSV	EF417915	EF417916
<i>Wissadula golden mosaic St Thomas virus</i>	WGMSTV	DQ395343	EU158095

n.d: não disponível

