

DANIELLE RIBEIRO DE BARROS

ANÁLISE COMPARATIVA DO GENOMA DE DOIS ISOLADOS DE *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) PROVENIENTES DE DIFERENTES HOSPEDEIROS

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

DANIELLE RIBEIRO DE BARROS

ANÁLISE COMPARATIVA DO GENOMA DE DOIS ISOLADOS DE *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) PROVENIENTES DE DIFERENTES HOSPEDEIROS

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

APROVADA: 27 de setembro de 2007.

Prof. Murilo Geraldo de Carvalho
(Co-orientador)

Pesq. Poliane Alfenas Zerbini
(Co-orientadora)

Pesq. Eduardo Chumbinho de Andrade

Prof. Olinto Liparini Pereira

Prof. Francisco Murilo Zerbini Júnior
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À meu pai Nilton de Barros Junior por acreditar em mim em todos os momentos da minha vida e tornar possível a realização de um sonho;

A Talita Barros amiga de todas as horas e torcedora fiel pelo meu sucesso;

Aos meus irmãos Sergius Vinicius, Giselle Jean Pierre Ana Luisa Pedro Luis e Nilton César por me apoiarem nesta jornada e demonstrarem todo seu carinho e atenção ao longo destes anos;

Aos amigos Renata, Ricardo, Verônica, Daniela, Liliane e Pedro que participaram ativamente da minha vida em Viçosa, fazendo com que eu pudesse crescer tanto pessoal quanto profissionalmente;

Aos amigos, Giselle, Renatinha, Mara, Kiriaque, Josefina, Cassinha, e Simone pela amizade e companheirismo;

Ao professor Murilo Zerbini, orientador e amigo de todas as horas, que me deu a oportunidade de me encontrar e amar a minha profissão;

Aos amigos do Laboratório e da vida, Jose Evando, Eduardo; Poliane, Gloria e Sandra por me ajudarem com suas experiências a realizar o trabalho da melhor forma possível;

Aos companheiros do Laboratório de Virologia Vegetal Molecular, Alison, Alvaro, Ana Verônica, Bruno, Carlos, Carol, Fernanda, Fabio, Jorge, Lidiane, Renan, Riani e Sávio por ajudarem de alguma forma para o bom andamento do trabalho;

Ao professor Murilo Geraldo de Carvalho por toda atenção e ensinamentos passados ao longo destes anos;

A Universidade Federal de Viçosa por possibilitar a minha formação;

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Fitopatologia da UFV por seus ensinamentos;

Aos funcionários Joaquim, Fizinho e Délio pelo apoio para a realização deste trabalho e à amizade durante este tempo;

A CAPES pelo suporte financeiro ao projeto;

A todos que de uma forma direta ou indireta fizeram o trabalho acontecer.

Obrigada a todos.

BIOGRAFIA

DANIELLE RIBEIRO DE BARROS, natural do Rio de Janeiro, RJ, nascida a 16 de outubro de 1972, filha de Nilton de Barros Junior e Marilena Ribeiro de Barros. Conclui o primeiro grau no colégio Municipal Albert Einstein em 1987, e o segundo grau na Escola Técnica Federal de Química do Rio de Janeiro em 1994, ambos em seu Município Natal.

Em 1996 ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, onde se graduou como Engenheira Agrônoma em março de 2001. Em abril do mesmo ano ingressou no curso de mestrado do programa de Pós-Graduação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. Em agosto de 2003, ingressou no curso de Doutorado do programa de Pós-Graduação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa na cidade de Viçosa, Minas Gerais. Em 27 setembro de 2007, concluiu o doutorado com a defesa da tese.

SUMÁRIO

Resumo.....	vi
Abstract	viii
Introdução.....	1
Revisão de Literatura	5
1. Aspectos gerais do maracujazeiro	5
2. O endurecimento dos frutos do maracujazeiro.....	6
3. A família <i>Potyviridae</i>	9
3.1. Ciclo de infecção de potyvírus.....	13
3.1.1. Tradução do RNA genômico e produção das proteínas virais.....	13
3.1.2. Replicação do genoma	16
3.1.3. Movimento do vírus na planta	20
4. Taxonomia de potyvírus	24
Material e Métodos.....	28
1. Manutenção dos isolados virais.....	28
2. Clonagem e sequenciamento do genoma dos isolados BR1 e MG-Avr.....	28
3. Comparações de sequências e análise filogenética	32
Resultados e Discussão	33
Referências Bibliográficas	47

RESUMO

BARROS, Danielle Ribeiro de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2007.
Análise comparativa do genoma de dois isolados de *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) obtidos de diferentes hospedeiros. Orientador: Francisco Murilo Zerbini Júnior. Co-orientadores: Elizabeth Pacheco Batista Fontes e Murilo Geraldo de Carvalho.

No Brasil e em outros países onde se cultiva o maracujazeiro à doença viral denominada “endurecimento dos frutos” é um fator limitante à produção. Durante muitos anos esta virose esteve associada a uma única espécie de potyvirus, o *Passion fruit woodiness virus* (PWV). No entanto, estudos conduzidos ao longo dos últimos 20 anos demonstraram que duas outras espécies de potyvirus, o *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) e o *East Asian Passiflora virus* (EAPV), também podem causar a mesma doença. As plantas infectadas apresentam mosaico e endurecimento do pericarpo dos frutos. No Brasil, foi demonstrado recentemente, através de caracterização molecular, que isolados de potyvirus causando endurecimento dos frutos anteriormente classificados como PWV com base em características biológicas e sorologia são na verdade isolados de CABMV. Os diversos isolados analisados foram capazes de infectar espécies de leguminosas como o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) e o caupi (*Vigna unguiculata*). Até o momento, somente um isolado de CABMV (CABMV-Zimbábue, obtido de caupi) teve seu genoma completamente sequenciado. Para alguns isolados brasileiros, a sequência correspondente à região codificadora da proteína capsidial e a região 3' não traduzida foram determinadas. A análise destas sequências não foi capaz de fornecer informações capazes de explicar as diferenças biológicas observadas entre os isolados. O objetivo deste trabalho foi obter a sequência de nucleotídeos completa de dois isolados de CABMV do Brasil, um deles provenientes de plantas de maracujá-amarelo apresentando sintomas de endurecimento dos frutos (isolado MG-Avr, que também infecta

feijão e caupi), e outro proveniente de amendoim (isolado BR1, também infecta feijão e caupi porém não infecta maracujá). Os isolados virais foram mantidos e multiplicados em plantas de caupi cv. Pitiúba. O RNA viral foi purificado a partir de preparações virais concentradas e utilizado como molde para a síntese de cDNAs, que por sua vez foram utilizados como molde para reações de PCR longo utilizando-se uma DNA polimerase com atividade de correção de erro e diferentes combinações de oligonucleotídeos degenerados e específicos. As seqüências de nucleotídeos dos isolados BR1 e MG-Avr são 95% idênticas e apresentam 87 e 86% de identidade com o CABMV-Z, respectivamente. Ambos os isolados apresentam todas as características típicas de potyvírus, incluindo o potencial de codificar uma poliproteína que sofre autoproteólise gerando de 8 a 10 proteínas virais. Dessas proteínas, P3 e VPg são as mais conservadas entre os dois isolados, com 99% de identidade para a seqüência de aminoácidos, e a CP é a menos conservada, com 85% de identidade. A análise filogenética das seqüências completas de nucleotídeos indicou que os dois isolados brasileiros se agruparam juntamente com o isolado Z, no grupo de espécies de potyvírus que infectam leguminosas, no subgrupo do *Bean common mosaic virus* (BCMV). Estudos de mutagênese e análise do fenótipo poderão identificar de forma definitiva possíveis regiões ou aminoácidos que possam estar envolvidos na diferenciação biológica dos dois isolados.

ABSTRACT

BARROS, Danielle Ribeiro de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September 2007.
Comparative analysis of the genome of two isolates of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) obtained from different hosts. Advisor: Francisco Murilo Zerbini Júnior. Co-Advisers: Elizabeth Pacheco Batista Fontes and Murilo Geraldo de Carvalho.

In Brazil and in other countries where passionfruit is grown, the viral disease known as passionfruit woodiness is a limiting factor for production. For many years this disease was associated with a single potyvirus, *Passion fruit woodiness virus* (PWV). However, studies conducted over the last 20 years demonstrated that two additional potyviruses, *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) and *East Asian Passiflora virus* (EAPV) can also cause passionfruit woodiness. Plants infected by either one of these three viruses display mosaic in the leaves and woodiness of the pericarp of the fruit. In Brazil, molecular analysis has shown that several potyvirus isolates previously classified as PWV based on biological and serological properties are actually CABMV isolates. These isolates are capable of infecting legume crops such as common bean (*Phaseolus vulgaris*) and cowpea (*Vigna unguiculata*). To this date, only one CABMV isolate (CABMV-Zimbabwe, obtained from cowpea) has been completely sequenced. For some Brazilian isolates, the capsid protein (CP) coding region and the 3'-untranslated region have been sequenced. Sequence analysis did not indicate any features that could be correlated with biological differences among the isolates. The objective of this work was to determine the complete genomic sequence of two CABMV isolates from Brazil, one obtained from passionfruit with woodiness symptoms (isolate MG-Avr, which also infects bean and cowpea), and one obtained from peanut (isolate BR1, which also infects bean and cowpea, but does not infect passionfruit). Both isolates were maintained in cowpea plants of the cultivar Pitiúba. Viral RNA was purified from concentrated virions

and used as a template for cDNA synthesis, which was then used as a template for long range PCR using a high fidelity DNA polymerase and different combinations of degenerate and specific primers. The nucleotide sequences of isolates BR1 and MG-Avr are 95% identical and display 87 and 86% identity with CABMV-Z, respectively. Both isolates have the typical potyvirus genome features, including the potential to encode a polyprotein which can generate 8 to 10 putative viral proteins by autoproteolysis. Among these putative viral proteins, P3 and VPg are the most conserved between the two isolates, with 99% amino acid sequence identity, and the CP is the least conserved, with 85% identity. Phylogenetic analysis indicates that the two Brazilian isolates group with CABMV-Z in the legume-infecting species cluster, and in the *Bean common mosaic virus* (BCMV) subgroup. Mutagenesis studies and phenotypic analysis could identify genomic regions or amino acids involved in the biological differences between the two isolates.

INTRODUÇÃO

A produção de maracujá possui grande importância econômica no Brasil. Atualmente, o Brasil aparece nas primeiras posições em termos de produção mundial, e a cultura está presente em quase todos os estados brasileiros.

A família *Passifloraceae* está dividida em duas tribos: *Paropsieae* e *Passiflorieae*. A tribo *Passiflorieae* está representada no continente americano por quatro gêneros: *Ancistrothyrsus* Harms, *Dilkea* Mast., *Mitostemma* Mast. e *Passiflora* L. O gênero *Passiflora* possui aproximadamente 520 espécies, distribuídas principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Dessas, cerca de 150 são nativas do Brasil. As espécies mais difundidas e cultivadas comercialmente são *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. (maracujá-amarelo), *P. edulis* f. *edulis* Sims (maracujá-roxo), *P. alata* Dryand (maracujá-doce), *P. ligularis* Juss. e *P. quadrangularis* L. (Bruckner, 1997; Silva & São José, 1994; Souza & Meletti, 1997).

O endurecimento dos frutos do maracujazeiro é a virose mais importante da cultura em todo o mundo. Foi descrito pela primeira vez na Austrália em 1901 por Allen, citado por Cobb (1901) e Noble (1928). Até pouco tempo acreditava-se que era causado somente pelo *Passionfruit woodiness virus* (PWV), porém o seqüenciamento

do gene da proteína capsidial demonstrou que a estirpe da África do Sul do PWV constituía na verdade em uma outra espécie do gênero *Potyvirus*, originalmente denominada *South African passiflora virus* (SAPV) (McKern *et al.*, 1994). Análises posteriores determinaram que o SAPV consistia na verdade um isolado do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) (Sithole-Niang *et al.*, 1996). Recentemente, uma terceira espécie de potyvírus designada *East Asian Passiflora virus* (EAPV) foi identificada no Japão causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro (Iwai *et al.*, 2006b). Desta forma, o EAPV, juntamente com o PWV e o CABMV, são as espécies reconhecidas até o momento como causadoras da doença.

Os sintomas característicos do endurecimento dos frutos causado tanto pelo PWV quanto pelo CABMV ou EAPV são praticamente idênticos, e incluem mosaico, deformação foliar e principalmente má-formação dos frutos, que apresentam-se deformados e com o pericarpo endurecido (Bruckner *et al.*, 2002). No Brasil, até meados dos anos 90, isolados virais causando endurecimento dos frutos em maracujazeiro haviam sido identificados exclusivamente com base em características biológicas e sorológicas, e em todos os casos o PWV havia sido relatado como agente causal (Chagas *et al.*, 1981; Inoue *et al.*, 1995). Entretanto, a análise molecular da região codificadora da proteína capsidial de diversos isolados brasileiros, inclusive de alguns anteriormente identificados como PWV, demonstrou que o CABMV é o principal, senão o único, agente associado à doença no país (Nascimento *et al.*, 2006; Nascimento *et al.*, 2004).

As três espécies virais causadoras do endurecimento dos frutos do maracujazeiro (PWV, CABMV e EAPV) pertencem ao gênero *Potyvirus* da família *Potyviridae*, possuindo partículas alongadas e flexuosas medindo aproximadamente 715×13 nm e genoma composto por uma única molécula de RNA de fita simples, com

aproximadamente 10.000 nucleotídeos. O RNA genômico possui uma única fase aberta de leitura (*open reading frame*, ORF) cuja tradução gera uma proteína que sofre autoproteólise, gerando de 8 a 10 produtos finais (Berger *et al.*, 2005). A transmissão natural dos potyvírus se dá por meio de afídeos, com uma relação vírus-vetor do tipo não-circulativa (Berger *et al.*, 2005; Dipiero *et al.*, 2006; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001), além de serem transmitidos por extrato vegetal tamponado e por enxertia (Costa *et al.*, 1995; McKern *et al.*, 1994). Os três vírus infectam naturalmente plantas de diversas espécies de leguminosas, e artificialmente alguns membros das famílias *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Solanaceae* e *Cucurbitaceae* (Taylor & Greber, 1973; Teakle & Widermuth, 1967).

A caracterização biológica, sorológica e molecular de 14 isolados de potyvírus causadores de endurecimento dos frutos do maracujazeiro, provenientes de sete estados brasileiros, indicou que todos pertenciam à espécie CABMV (Nascimento *et al.*, 2006; Nascimento *et al.*, 2004). Todos os isolados foram capazes de infectar duas cultivares de caupi (Pitiúba e Clay). Entretanto, foram encontradas diferenças nos sintomas induzidos pelos isolados em plantas de feijoeiro e caupi. Essa variabilidade biológica refletiu-se na variabilidade molecular entre os isolados: as seqüências de aminoácidos de suas proteínas capsidiais apresentaram de 6 a 15% de diferenças. A análise filogenética baseada na proteína capsidial demonstrou que os isolados se agrupam principalmente com base na origem geográfica, e não com base em suas gamas de hospedeiros. Assim, o isolado CABMV-BR1, obtido de planta de amendoim coletada no estado da Paraíba e que não infecta maracujá, agrupou-se juntamente com os isolados brasileiros de CABMV obtidos de maracujá. Já o isolado CABMV-SAP, obtido de maracujá amarelo na África do Sul, apresentou um relacionamento mais distante com os isolados brasileiros (Nascimento *et al.*, 2006).

A região seqüenciada até o presente para os isolados brasileiros (proteína capsidial e 3'-NTR) corresponde a aproximadamente 10% do genoma viral. A análise dessas regiões não permitiu a identificação de fatores que possam estar relacionados com as diferenças biológicas entre os isolados (Nascimento *et al.*, 2006).

Atualmente, dentre todos os isolados de CABMV descritos, somente um isolado obtido de planta de caupi coletada no Zimbábue (África) encontra-se completamente seqüenciado (Mlotshwa *et al.*, 2002). Desta forma, o presente trabalho teve como objetivos seqüenciar o genoma completo de dois isolados de CABMV provenientes dos estados da Paraíba (isolado CABMV-BR1) (Pio-Ribeiro *et al.*, 2000) e Minas Gerais (isolado MG-Avr) (Costa, 1996; Nascimento *et al.*, 2006), a fim de realizar uma análise comparativa entre eles e verificar possíveis diferenças que possam identificar regiões genômicas ou até mesmo aminoácidos diferentes responsáveis pelas diferentes propriedades biológicas destes isolados.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Aspectos gerais do maracujazeiro

Os maracujazeiros (*Passiflora* spp.) são plantas da família *Passifloraceae* originárias da América Tropical. O Brasil é o centro de origem de um grande número de espécies da família. A família *Passifloraceae* está dividida em duas tribos: *Paropsieae* e *Passiflorieae*. A tribo *Passiflorieae* está representada no continente latino-americano por quatro gêneros: *Ancistrothyrsus* Harms, *Dilkea* Mast., *Mitostemma* Mast. e *Passiflora* L. O gênero *Passiflora* possui aproximadamente 520 espécies (Cervi, 2005).

O maracujá-amarelo, *P. edulis* f. *flavicarpa*, é a espécie comercialmente mais cultivada no Brasil. Acredita-se que tenha sido resultado do cruzamento entre *P. edulis* e uma espécie próxima, possivelmente *P. ligularis*, ou uma mutação em *P. edulis*, ou ainda seria uma forma mutante originária da Austrália (Oliveira & Ferreira, 1991).

A partir do final da década de 60 ocorreu grande expansão da cultura do maracujazeiro no Brasil. Atualmente o plantio de maracujá-amarelo está presente em quase todos os estados, destacando-se como uma cultura que requer uso intensivo de mão-de-obra. Em 1975, Bahia e Minas Gerais eram responsáveis por 55% da produção nacional. Em 1993, os principais estados produtores eram Pará, São Paulo, Minas

Gerais, Bahia, Rio de Janeiro e Sergipe, que representavam 97% de toda a produção nacional (revisado por Nascimento *et al.*, 2006). Em 2003, os estados da Bahia, Espírito Santo, São Paulo e Rio de Janeiro eram os principais produtores, representando aproximadamente 57% da produção nacional. Esses dados demonstram uma dificuldade no estabelecimento da cultura de forma economicamente viável a longo prazo, o que ocorre principalmente devido à incidência de doenças de difícil controle.

2. O endurecimento dos frutos do maracujazeiro

No Brasil, as doenças constituem o principal fator que impede uma maior expansão e produtividade dos cultivos de maracujá-amarelo e de maracujá-doce. Um dos principais problemas é a doença conhecida como endurecimento dos frutos, que constitui a virose mais importante da cultura em todo o mundo. Após o primeiro relato da doença na Austrália (Cobb, 1901), outros relatos ocorreram na África (McKern *et al.*, 1994) e Américas (Chagas *et al.*, 1981). A caracterização biológica e sorológica dos isolados virais indicava que todos pertenciam à mesma espécie do gênero *Potyvirus*, denominada *Passion fruit woodiness virus* (PWV). Entretanto, com o advento das técnicas moleculares, verificou-se que pelo menos duas outras espécies do gênero estão associadas à doença: *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), presente na África e no Brasil, e *East Asian Passiflora virus* (EAPV), presente no Japão (Iwai *et al.*, 2006b; McKern *et al.*, 1994; Nascimento *et al.*, 2006; Nascimento *et al.*, 2004; Sithole-Niang *et al.*, 1996). Embora apresentem propriedades biológicas e sorológicas muito semelhantes, as três espécies possuem seqüências de nucleotídeos bastante distintas. É interessante notar que, embora a seqüência do genoma completo esteja disponível para isolados de CABMV (Mlotshwa *et al.*, 2002) e EAPV (Iwai *et al.*, 2006a), até hoje nenhum isolado de PWV foi completamente seqüenciado.

As espécies virais causadoras do endurecimento dos frutos do maracujazeiro (PWV, CABMV e EAPV) pertencem ao gênero *Potyvirus* da família *Potyviridae*. Possuem partículas alongadas e flexuosas medindo aproximadamente 715 x 13 nm e genoma composto por uma única molécula de RNA de fita simples, sentido positivo, com aproximadamente 10.000 nucleotídeos. Suas gamas de hospedeiros incluem essencialmente espécies das famílias *Passifloraceae* e *Fabaceae*, além de alguns membros das famílias *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Solanaceae* e *Cucurbitaceae* (Iwai *et al.*, 1996; Nascimento *et al.*, 2006; Taylor & Greber, 1973). Os sintomas foliares incluem mosaico de intensidade variada, bolhosidade e distorção foliar. Os frutos são freqüentemente deformados, de tamanho reduzido e com o pericarpo endurecido e espesso em comparação com frutos de plantas sadias (Bruckner *et al.*, 2002). A diminuição do ciclo produtivo das plantas aliada à deformação dos frutos e à redução na produção da polpa ocasiona queda drástica da produtividade e produção de frutos sem valor comercial. Conseqüentemente, a viabilidade econômica do pomar é reduzida (Bruckner *et al.*, 2002; Gioria *et al.*, 2000; Rezende, 1994). Na maioria dos estados brasileiros, o maracujá-amarelo é cultivado durante apenas um ano devido à incidência do endurecimento dos frutos, quando apresenta potencial para exploração comercial durante 3 a 4 anos.

O endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Brasil apresenta características semelhantes às da doença descrita originalmente na Austrália. A doença já foi relatada nos principais estados produtores, e em todos os casos o agente etiológico foi identificado como PWV, com base em características biológicas e sorológicas (Bezerra *et al.*, 1995; Chagas *et al.*, 1981; Chagas *et al.*, 1992; Costa, 1996; Inoue *et al.*, 1995; Trindade *et al.*, 1999). No entanto, análises da sequência de aminoácidos da CP de diversos isolados previamente identificados como PWV demonstraram que na verdade

esses isolados pertencem à espécie CABMV (Nascimento *et al.*, 2006; Nascimento *et al.*, 2004). No Brasil, além de diversos relatos em caupi e em outras espécies de leguminosas (Lima *et al.*, 1979; Sousa *et al.*, 1996), o CABMV já havia sido relatado em plantas de amendoim coletadas no estado da Paraíba (Pio-Ribeiro *et al.*, 2000). A comparação da sequência correspondente à CP e à região 3'-não traduzida (3'NTR) do genoma viral mostrou um alto grau de identidade entre este isolado (denominado BR1) e outros isolados de CABMV de outros países, incluindo Zimbábue, EUA e África do Sul.

Em 2006, Nascimento *et al.* caracterizaram isolados de potyvírus obtidos a partir de amostras foliares de plantas de maracujá-amarelo com sintomas típicos de endurecimento dos frutos, coletadas em sete estados brasileiros e no Distrito Federal. A infecção viral foi comprovada através de sorologia e gama de hospedeiros. Foram analisados quatorze isolados virais capazes de infectar várias espécies de plantas, porém apresentando diferenças na intensidade dos sintomas induzidos nessas hospedeiras. O teste sorológico (ELISA indireto) mostrou que os isolados eram relacionados entre si e com o potyvírus CABMV. A sequência de aminoácidos da proteína capsidial foi determinada para todos isolados, e sua comparação com outros potyvírus indicou uma identidade máxima com isolados de CABMV (86 a 94%), e identidade de apenas 68 a 76% com isolados de PWV. A análise filogenética a partir destas sequências confirmou que os isolados obtidos são relacionados a isolados de CABMV, e distintos de isolados de PWV. Esses resultados confirmaram que o endurecimento dos frutos do maracujazeiro, no Brasil, é causado primariamente pelo CABMV. Dentre os isolados caracterizados por Nascimento *et al.* (2006) inclui-se o isolado MG-Avr, obtido a partir de planta coletada no município de Areia Vermelha, MG. Sua gama de hospedeiros inclui, além do maracujá-amarelo, as espécies *Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*,

feijão cv. Preto 153 e caupi cvs. Pitiúba e Clay. Já o isolado CABMV-BR1, obtido originalmente de planta de amendoim, induziu sintomas de mosaico severo nas cultivares de caupi e feijão cv. Preto 153, porém não infectou maracujá. Esses resultados indicam a existência de um grau significativo de variabilidade entre isolados brasileiros de CABMV, e sugerem que a capacidade de um determinado isolado em infectar maracujá evoluiu de forma independente na África e no Brasil (Nascimento *et al.*, 2006).

3. A Família *Potyviridae*

A família *Potyviridae* é uma das maiores e economicamente mais importante entre as famílias de vírus que infectam plantas, contendo cerca de 16% das espécies descritas (Fauquet *et al.*, 2005). Está dividida em seis gêneros (*Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Potyvirus*, *Rymovirus* e *Tritimovirus*), de acordo com o agente vetor e a organização do genoma (Berger *et al.*, 2005). Os potyviridae são encontrados em todo o mundo, infectando mais de 2.000 espécies de plantas. Todos os potivirus formam corpos de inclusões cilíndricas no citoplasma de células infectadas, também denominadas “cata-ventos”, sendo esta uma característica relevante para a identificação de espécies pertencentes à família. Membros dessa família são facilmente transmitidos experimentalmente de plantas infectadas para plantas sadias, pela inoculação via extrato vegetal infectado ou utilizando preparações virais purificadas ou concentradas (Berger *et al.*, 2005).

O gênero *Potyvirus* é o mais numeroso da família *Potyviridae*, com mais de 100 espécies descritas. Em conjunto, essas espécies infectam uma ampla gama de plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas em diferentes regiões climáticas, causando grandes danos econômicos em várias culturas. Esses vírus são transmitidos de maneira não-

circulativa por afídeos (Bock & Conti, 1974; Dipiero *et al.*, 2006; Fauquet *et al.*, 2005). As partículas virais são alongadas, flexuosas, com 680-900 nm de comprimento e 11-13 nm de diâmetro. Seu genoma é constituído de uma única molécula de RNA de fita simples, sentido positivo, com aproximadamente 10.000 nucleotídeos. O RNA genômico é envolto por um capsídeo formado por cerca de 2.000 cópias da proteína capsidial (CP), que possui massa molecular de aproximadamente 34 kDa.

A proteína capsidial dos potyvírus apresenta uma região amino-terminal altamente variável em tamanho e seqüência, uma região central altamente conservada contendo de 215 a 227 aminoácidos, e uma região carboxi-terminal com 18-20 aminoácidos. As regiões amino e carboxi-terminal estão voltadas para o exterior da partícula viral, e são responsáveis pelas propriedades antigênicas da proteína e, conseqüentemente, da partícula viral (Shukla *et al.*, 1991). O RNA dos potyvírus é covalentemente ligado a uma proteína de origem viral (*genome-linked viral protein*, VPg) em sua extremidade 5' (Riechmann *et al.*, 1989) e apresenta uma cauda poliadenilada, de origem viral, em sua extremidade 3' (Allison *et al.*, 1986). O RNA genômico apresenta uma única fase aberta de leitura (*open reading frame*, ORF) localizada entre duas regiões não codificadoras denominadas 5'NTR e 3'NTR. A tradução da ORF origina potencialmente uma poliproteína com peso molecular de aproximadamente 350 kDa (Allison *et al.*, 1986), que é processada por meio da atividade proteolítica de três proteases (P1, HC-Pro e NIa) contidas na própria seqüência, dando origem a 8-10 produtos finais (Carrington *et al.*, 1990) (Figura 1). As proteases P1 e HC-Pro catalisam unicamente suas próprias clivagens em *cis*. A protease NIa, além de catalisar sua própria clivagem em *cis*, catalisa seis clivagens adicionais em *trans* (Daros & Carrington, 1997). Uma característica das proteínas sintetizadas pelos potyvírus é o seu caráter multifuncional. Cada proteína é geralmente responsável por

várias funções durante o ciclo de infecção (revisado por Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001).

Um resumo das funções de cada uma destas proteínas encontra-se na Tabela 1.

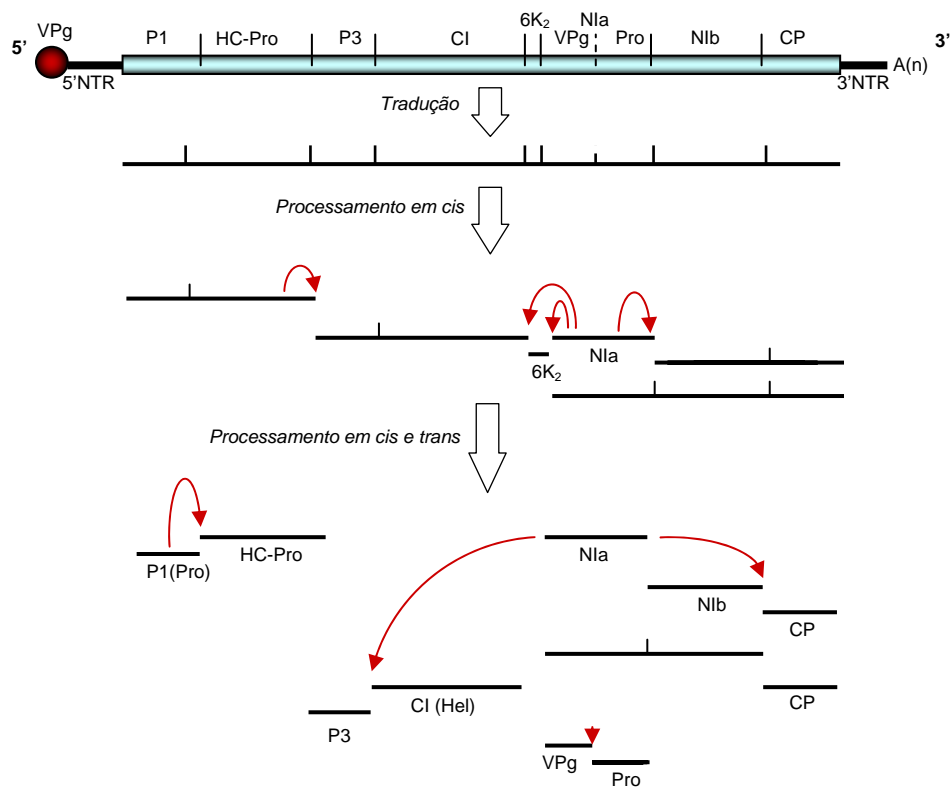


Figura 1. Representação esquemática da organização e expressão do genoma de um potyvírus. O RNA viral possui uma proteína viral (VPg) ligada à sua extremidade 5' e uma cauda poli-A em sua extremidade 3'. A única fase aberta de leitura dá origem a uma poliproteína que sofre autoproteólise gerando diferentes intermediários e, finalmente, 8 proteínas virais (P1, HC-Pro, P3, CI, 6K₂, NIa, NIb e CP). A proteína NIa pode sofrer uma clivagem adicional gerando VPg e Pro, dependendo da espécie viral. Em alguns potyvírus, a proteína P3 sofre clivagem adicional gerando as proteínas P3 e 6K₁. Adaptado de Shukla *et al.* (1994).

Tabela 1. Funções associadas às regiões não traduzidas e à proteínas dos potyvírus. Reproduzido de Krause-Sakate (2001).

Proteína ou região	Funções	Referências
5' NTR	Promotor da tradução Promotor da replicação do RNA viral Competitividade e adaptação viral Local de início do encapsidamento	Carrington & Freed, 1990 Carrington & Freed, 1990 Simón-Buela <i>et al.</i> , 1997b Wu & Shaw, 1998
P1	Protease Fator acessório para a replicação do genoma viral	Verchot <i>et al.</i> , 1991 Verchot & Carrington, 1995b
HC-Pro	Transmissão por afídeos Protease Movimento à longa distância Fator acessório para a replicação do genoma viral Movimento célula-a-célula Transmissão por semente Inibição da resposta de defesa da planta Sinergismo viral Determinante de sintomatologia	Thornbury <i>et al.</i> , 1985 Carrington <i>et al.</i> , 1989 Cronin <i>et al.</i> , 1995 Kasschau & Carrington, 1998 Cronin <i>et al.</i> , 1995; Rojas <i>et al.</i> , 1997; Kasschau <i>et al.</i> , 1997 Johansen <i>et al.</i> , 1996 Anandalakshmi <i>et al.</i> , 1998; Brigneti <i>et al.</i> , 1998; Kasschau & Carrington, 1998) Pruss <i>et al.</i> , 1997 Sáenz <i>et al.</i> , 2001
P3	Fator auxiliar para replicação do genoma viral	Klein <i>et al.</i> , 1994
CI	Replicação (Helicase, ATPase) Movimento célula-a-célula	Laín <i>et al.</i> , 1991 Carrington <i>et al.</i> , 1998
6K ₂	Manter o complexo de replicação ancorado à membrana plasmática	Restrepo-Hartwig & Carrington, 1994; Schaad <i>et al.</i> , 1997a
NIa (Pro-VPg)	Protease (Pro) Iniciador para a replicação do RNA viral (VPg)	Carrington & Dougherty, 1987 Schaad <i>et al.</i> , 1996
NIb	RNA polymerase dependente de RNA	Hong & Hunt, 1996
CP	Encapsidação do genoma Transmissão por afídeos Movimento célula-a-célula Movimento a longa distância Replicação Determinante de sintomatologia	Allison <i>et al.</i> , 1986; Varrelmann & Maiss, 2000 Atreya <i>et al.</i> , 1991 Dolja <i>et al.</i> , 1995 Dolja <i>et al.</i> , 1995; Dolja <i>et al.</i> , 1994 Mahajan <i>et al.</i> , 1996; Haldeman-Cahill <i>et al.</i> , 1998
3' NTR	Promotor de replicação do RNA viral Determinante de sintomatologia Fator acessório à replicação	Haldeman-Cahill <i>et al.</i> , 1998 Mahajan <i>et al.</i> , 1996 Rodríguez-Cerezo & Shaw, 1991 Mahajan <i>et al.</i> , 1996

3.1. Ciclo de infecção de potyvírus

3.1.1. Tradução do RNA genômico e produção das proteínas virais

O primeiro evento que ocorre após um potyvírus alcançar o interior de uma célula vegetal é o desencapsidamento do vírion, seguido da tradução da única ORF em uma poliproteína que será processada produzindo uma quantidade suficiente de proteínas virais para serem utilizadas nos processos subsequentes de replicação, montagem e obtenção das partículas virais.

Todos os mRNAs celulares eucarióticos possuem uma estrutura “capeada” em seu terminal 5’ (um nucleotídeo modificado, quase sempre m⁷GpppN), essencial para que ocorra a tradução e para a manutenção da integridade do mRNA (Niepel & Gallie, 1999). O RNA genômico dos potyvírus não possui tal estrutura, e sua tradução é independente de sua presença (Carrington & Freed, 1990). Dois elementos regulatórios fundamentais para a tradução independente da capa (*cap-independent regulatory elements*, CIREs) foram identificados na região 5’NTR do *Tobacco etch virus* (TEV), e a combinação destes dois elementos resulta em um efeito multiplicativo da tradução (Niepel & Gallie, 1999). No caso do TEV, as regiões 5’ e 3’ do genoma viral (cauda poli-A) agem de forma sinérgica na regulação da tradução, ou seja, a tradução é estimulada pela presença da cauda poli-A (Gallie *et al.*, 1995).

Existem controvérsias quanto à maneira pela qual ocorre o processo de tradução dos potyvírus. Para o *Turnip mosaic virus* (TuMV) evidências indicam que a tradução ocorre por meio de iniciação interna (Basso *et al.*, 1994). Posicionando-se uma estrutura em forma de grampo à frente da 5’NTR do TuMV verificou-se que não foi alterada a expressão do gene repórter para β-glucuronidase (GUS), situado logo em seguida, o que seria esperado caso o processo de tradução fosse o *leaky-scanning*. Entretanto, trabalhos realizados com o *Plum pox virus* (PPV) indicaram que para esse vírus a tradução se

inicia pelo mecanismo de *leaky scanning* e não por iniciação interna, pois o primeiro ATG localizado na posição 36 (₃₆AUG) não é reconhecido pelo ribossomo, por não estar em um contexto favorável. O ribossomo irá escanear o RNA viral até atingir o próximo códon de iniciação (₁₄₇AUG), este em contexto favorável, e então iniciará a tradução. Quando o primeiro AUG é colocado em um contexto favorável por meio de mutações sítio-específicas, a tradução passa a ocorrer a partir deste códon. Este modelo pode ser explicado pela ausência de estruturas secundárias fortes na 5'NTR. É possível que potyvírus distintos utilizem estratégias diferentes para a tradução do genoma, ou que ambas estratégias sejam utilizadas em conjunto.

Uma outra função desempenhada pela estrutura capeada do terminal 5' é o recrutamento de fatores de tradução antes da chegada dos ribossomos. Nos potyvírus, portanto, essa função deverá ser desempenhada pela VPg ou pela 5'NTR. A VPg é capaz de se associar aos fatores de iniciação de tradução eIF4E ou eIF(iso)4E (Nicaise *et al.*, 2003; Ruffel *et al.*, 2002). Ensaio realizados utilizando o sistema duplo-híbrido de leveduras demonstraram que a VPg do TuMV interage com o fator eucariótico de tradução eIF(iso)4E de *Arabidopsis thaliana* (Wittmann *et al.*, 1997) e de aveia (*Triticum aestivum*) (Léonard *et al.*, 2000). A VPg do TEV interage com o fator eIF4E de tomateiro e tabaco, e esta interação é estirpe-específica (Schaad *et al.*, 2000). Impedida esta interação por meio de mutação de um único resíduo no domínio de interação da VPg do TuMV, a produção de partículas virais em *Brassica perviridis* foi altamente comprometida. O fato de terem sido encontradas interações VPg/eIF(iso)4E em diferentes patossistemas envolvendo potyvírus (revisado por Robaglia & Caranta, 2006) reflete a importância desta interação para o ciclo de infecção viral. Curiosamente, transcritos sintetizados a partir de um clone infeccioso do PPV sem a VPg ligada ao terminal 5' foram traduzidos em nível suficiente para iniciar a infecção, indicando que a

VPg não é essencial, pelo menos, para os primeiros eventos de tradução do genoma do PPV na planta (Riechmann *et al.*, 1990) e nem para a infectividade do RNA viral (Hari, 1981). De fato, a relevância biológica da interação VPg-eIF4E ainda não foi determinada (Robaglia & Caranta, 2006)

O produto da tradução dos potyvírus é uma poliproteína, processada por meio de clivagens proteolíticas realizadas pelas três proteases (P1, HC-Pro e NIa), originando as proteínas virais (Dougherty *et al.*, 1988). A proteína NIa, que consiste de dois polipeptídeos com funções distintas (a VPg na porção amino e a protease na porção carboxílica) cataliza as clivagens entre todos os polipeptídeos que compõem a poliproteína, com exceção de P1/HC-Pro e HC-Pro/P3, que são realizadas pelas proteases P1 e HC-Pro, respectivamente (Dougherty & Parks, 1991).

A protease NIa, que atua em *cis* e *trans*, é do tipo cisteína e todos os cinco sítios de clivagens apresentam a sequência conservada Glu-X-X-Tyr-X-Gln/Ser,Gly, Ala, Val, com o local de clivagem localizado após o resíduo de glutamina. As posições X são ocupadas por aminoácidos neutros ou hidrofóbicos (Carrington & Dougherty, 1988; Dougherty *et al.*, 1988). Por se tratar de uma sequência degenerada, as clivagens das diferentes regiões são processadas com eficiências distintas, dependendo do contexto de aminoácidos da sequência, e esta regulação é essencial para a replicação viral. O sítio de clivagem localizado entre as porções VPg e Pro da própria NIa é processado de maneira imperfeita, pois não possui a sequência ideal de reconhecimento. A sequência neste sítio para o TEV é Glu-Asp-Leu-Thr-Phe-Glu/Gly, o que prejudica o reconhecimento da sequência. É interessante notar, entretanto, que mutações que aceleram a clivagem deste sítio são prejudiciais à amplificação do genoma viral (Schaad *et al.*, 1996).

A protease P1, responsável pela proteólise da junção P1/HC-Pro, é do tipo serina e o sítio ativo, Gli-X-Ser-Gli é conservado em todos os potyvírus cuja sequência de P1

já foi determinada (Adams *et al.*, 2005a). A proteína HC-Pro, responsável pela clivagem entre HC-Pro e P3, é dependente de cisteína e no caso do TEV a clivagem ocorre entre os dois resíduos de glicina da sequência Tyr-X-Val-Gly-Gly (Carrington *et al.*, 1989).

Uma consequência da estratégia de expressão do genoma dos potyvírus é a produção em quantidades estequiometricamente idênticas de todas as proteínas virais, independentemente da necessidade de cada uma delas. Deste modo, diversas proteínas acumulam-se na célula infectada na forma de inclusões. As proteínas NIa e NIb acumulam-se no núcleo das células infectadas, devido ao sinal de localização nuclear presente em suas seqüências (Restrepo *et al.*, 1990). Embora não exista regulação da quantidade de proteínas produzidas, ocorre regulação temporal com base na eficiência de clivagem dos sítios de reconhecimento da protease NIa, conforme mencionado anteriormente.

3.1.2. Replicação do genoma

Uma vez ocorrida a tradução do RNA viral, o vírus dispõe de todas as proteínas necessárias para a replicação do genoma. A replicação da fita positiva é catalizada pela RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) viral (a proteína NIb) em conjunto com proteínas do hospedeiro. A replicação é iniciada pela síntese de uma fita complementar negativa a partir da fita de RNA viral (positiva). As novas fitas positivas são em seguida sintetizadas utilizando-se as fitas negativas como molde, sendo a especificidade do complexo replicativo assegurada pelo reconhecimento de sinais *cis* presentes em ambas as fitas (Simón-Buela *et al.*, 1997a). A VPg atua como iniciadora da síntese de fitas de RNA negativo, por meio do grupamento hidroxil presente em um resíduo conservado de tirosina (Murphy *et al.*, 1996).

A sequência da 3'NTR é essencial para a amplificação viral, uma vez que ela contém o promotor para a síntese da fita negativa. Foi demonstrado que a 3'NTR do TEV apresenta estruturas secundárias essenciais para a replicação do genoma, que pareiam com outras sequências dentro da própria 3'NTR e também com sequências localizadas na região codificadora da proteína capsidial. Mutações afetando a estrutura secundária destas sequências reduzem o nível de replicação viral, porém se a sequência é alterada, mas a estrutura secundária mantida, a replicação é restaurada a nível normal (Haldeman-Cahill *et al.*, 1998). Desta maneira, a região codificadora da proteína capsidial e a 3'NTR estão implicadas na amplificação do genoma viral por meio da formação de estruturas secundárias que serão reconhecidas pelo complexo replicativo. Foi demonstrado que plantas transgênicas expressando a proteína capsidial e a 3'NTR do LMV sintetizam fitas de RNA negativo para estas sequências quando co-infectadas com potyvírus distintos como o TEV, *Tobacco vein mottling virus* (TVMV) ou *Pepper mottle virus* (PepMoV) (Teycheney *et al.*, 2000). Isto evidencia a presença de elementos essenciais na sequência codificadora da proteína capsidial e na 3' NTR que permitem o reconhecimento específico do RNA viral pela polimerase de potyvírus distintos.

A maioria das proteínas codificadas pelos potyvírus é necessária, direta ou indiretamente para a replicação viral. Dentre estas, as proteínas CI, NIa e NIb formam o núcleo replicativo, catalisando processos enzimáticos essenciais durante a replicação. A proteína CI possui atividades de helicase, ATPase e ligação a RNA (Laín *et al.*, 1991). A proteína NIb é a RNA polimerase dependente de RNA e possui a sequência de aminoácidos Gln-Asp-Asp característica das RdRp's virais (Hong & Hunt, 1996). O processo de replicação ocorre em associação com o retículo endoplasmático das células infectadas (Schaad *et al.*, 1997a). A proteína 6K₂ funciona como uma âncora, graças à presença de um domínio central hidrofóbico de 19 aminoácidos que lhe confere a

propriedade de associação a membranas (Restrepo-Hartwig & Carrington, 1994; Schaad *et al.*, 1997a). Como o sítio de clivagem entre 6K₂ e NIa possui baixa afinidade pela protease, essas proteínas permanecem como um único polipeptídeo por um tempo relativamente longo, ancoradas ao retículo endoplasmático (Restrepo-Hartwig & Carrington, 1992). A proteína NIB é recrutada para o retículo endoplasmático por meio de interações proteína-proteína (NIa/NIB). Estudos *in vitro* utilizando o sistema duplo-híbrido de levedura demonstraram que a proteína NIa interage com NIB, possivelmente estimulando sua atividade de RNA polimerase (Fellers *et al.*, 1998). Observou-se que a interação NIB/NIa do TVMV diminui quando são feitas mutações no domínio VPg, concluindo que a porção VPg é responsável pela interação (Fellers *et al.*, 1998). Entretanto, outros autores concluíram que o domínio protease é o responsável pela interação NIa/NIB do TEV (Li *et al.*, 1997). A VPg se liga à extremidade 5' do RNA viral por meio de um resíduo de tirosina situado na porção amino terminal da proteína, onde irá exercer sua função de iniciadora da replicação (Murphy *et al.*, 1996). Ao final da replicação, o complexo é liberado do retículo endoplasmático por meio da autoproteólise entre as porções VPg e Pro da proteína NIa.

As proteínas P1, P3 e HC-Pro também participam do processo de replicação como ativadores ou reguladores. A P1 atua como fator de amplificação do genoma (Verchot & Carrington, 1995b) e pode estar envolvida na infectividade e acúmulo viral (Rajamaki *et al.*, 2005). Um mutante do TEV no qual foi deletada a sequência codificadora para a proteína P1 possui a capacidade de se movimentar na planta, porém o nível de replicação foi muito inferior quando comparado ao vírus selvagem. A complementação a partir da expressão da P1 em plantas transgênicas demonstra sua atividade em *trans* (Verchot & Carrington, 1995a). Mutantes de inserção na proteína P3 são incapazes de se replicar em protoplastos (Klein *et al.*, 1994). Tanto a proteína P1

(Rodriguez-Cerezo *et al.*, 1993) como P3 (Arbatova *et al.*, 1998) foram encontradas associadas à proteína CI em células infectadas, e a interação entre as proteínas P1/CI e P3/NiB foi demonstrada utilizando o sistema duplo-híbrido de levedura (Merits *et al.*, 1999).

O papel da proteína HC-Pro durante a replicação é complexo, envolvendo no mínimo as regiões central e carboxi-terminal. O processamento da proteína HC-Pro é essencial para a replicação. Mutantes que suprimem a atividade proteolítica de HC-Pro não são viáveis e esta atividade não pode ser complementada por HC-Pro selvagem produzida em plantas transgênicas, indicando a sua atividade exclusivamente em *cis* (Kasschau & Carrington, 1995). Mutantes para a região central da proteína apresentam capacidade proteolítica, porém exibem um fenótipo de supressão da amplificação viral, demonstrando que não somente a atividade proteolítica é importante para a amplificação do genoma (Kasschau *et al.*, 1997). Mutantes para a região central da proteína HC-Pro podem ser complementados em *trans*. A afinidade da HC-Pro do *Potato virus Y* (PVY) e *Potato virus A* (PVA) ao RNA viral foi demonstrada *in vitro* (Maia & Bernardi, 1996). Dois domínios independentes localizados na região central, denominados “domínio A” (aminoácidos 89-230) e “domínio B” (aminoácidos 234-321) são responsáveis pela ligação de HC-Pro de maneira não específica a ácidos nucleicos, preferencialmente RNA, e o domínio B apresenta um motivo ribonucleoprotéico (RNP) que é encontrado em uma grande família de proteínas envolvidas no processamento e transporte de RNA, expressão gênica e desenvolvimento celular (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2000). A provável forma ativa da HC-Pro é um homodímero, uma vez que esta é a forma purificada a partir de plantas infectadas (Thornbury *et al.*, 1985). Utilizando o sistema duplo-híbrido de levedura, foram obtidas evidências da capacidade das HC-Pro's do LMV e do PVY em auto-interagir, verificando-se também a possibilidade de uma interação heteróloga

entre estas HC-Pro's e demonstrando-se que 72 aminoácidos presentes na região amino-terminal da proteína são responsáveis pela interação (Urcuqui-Inchima *et al.*, 1999).

A região do RNA viral que codifica a proteína capsidial (CP) também está envolvida na replicação viral. Mutantes do TEV nos quais ocorre terminação prematura da tradução apresentam replicação deficiente, enquanto mutantes nos quais a fase de leitura foi modificada, porém sem terminação prematura, replicaram normalmente. Estes resultados indicam que a tradução completa da região codificadora da CP, porém não a proteína propriamente dita, é essencial para a replicação (Mahajan *et al.*, 1996).

3.1.3. Movimento do vírus na planta

O movimento de vírus de plantas no hospedeiro pode ser dividido em duas etapas: movimento célula-a-célula (curta distância) e movimento sistêmico (longa distância) (Lucas, 2006). Inicialmente, a partir da célula infectada, o vírus deverá se movimentar célula-a-célula por meio das conexões citoplasmáticas denominadas plasmodesmas, que permitem a continuidade do citoplasma e do sistema de endomembranas entre as células. Como o limite de exclusão passivo dos plasmodesmas em células do mesófilo é de aproximadamente 1 kDa, os vírus de plantas produzem proteínas capazes de alterar esse limite de exclusão, ligando-se ao RNA viral e permitindo a passagem deste pelos plasmodesmas na forma de um complexo RNA viral-proteína de movimento ou na forma de vírions (Lucas, 2006).

Os potyvírus, ao contrário de todos os outros vírus de plantas já estudados, não possuem proteína com função exclusiva no movimento célula-a-célula. Diversas proteínas dos potyvírus já foram implicadas no movimento célula-a-célula, incluindo CP, HC-Pro, CI e VPg.

Evidências genéticas demonstram que a função da CP do TEV no movimento célula-a-célula é independente da formação de vírions (Dolja *et al.*, 1994). Mutantes na região central da CP do TEV não foram capazes de se movimentar célula-a-célula, e deleções na região amino-terminal da CP também implicaram em uma redução do movimento, podendo esta região atuar de forma acessória (Dolja *et al.*, 1995; Dolja *et al.*, 1994).

O envolvimento da proteína HC-Pro no movimento foi demonstrado por meio de ensaios genéticos e de microinjeção. Mutantes na HC-Pro do TEV apresentam movimento célula-a-célula reduzido quando comparado ao vírus selvagem (Cronin *et al.*, 1995; Kasschau *et al.*, 1997), indicando possível envolvimento da proteína como fator acessório ao movimento. Estudos de microinjeção de proteínas dos potyvírus *Bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV) e LMV expressas em *Escherichia coli* demonstraram a capacidade das proteínas CP e HC-Pro de se movimentarem célula-a-célula, aumentarem o limite de exclusão dos plasmodesmas e facilitarem o movimento de RNA viral. Mutações na região central da CP e na região carboxi-terminal de HC-Pro aboliram o movimento célula-a-célula destas proteínas. Os experimentos indicaram uma interação entre CP, HC-Pro e os plasmodesmas, sugerindo que os potyvírus codificam duas proteínas com características de proteínas de movimento (Rojas *et al.*, 1997). A proteína CI não demonstrou capacidade de aumentar o limite de exclusão dos plasmodesmas (Rojas *et al.*, 1997). Porém, análises ultraestruturais de folhas de tabaco recém-infectadas com o TVMV e do ‘front’ de infecção de cotilédones de ervilha infectados com o *Pea seed borne mosaic virus* (PSbMV) revelaram a co-localização das proteínas CI e CP próximas ou sobre a abertura dos plasmodesmas (Rodríguez-Cerezo *et al.*, 1997). Estudos genéticos da proteína CI do TEV demonstraram que mutantes na região amino-terminal desta proteína não são capazes de se movimentar célula-a-célula,

mesmo com nível de replicação equivalente ao do vírus selvagem (Carrington & Whitham, 1998).

A proteína VPg também parece estar implicada no movimento célula-a-célula. Por meio da construção de vírus quiméricos, o determinante de virulência do TVMV em plantas de *Nicotiana tabacum* cv. TN86 (que contém o gene de resistência *va*) foi identificado como sendo a VPg (Nicolas *et al.*, 1997). Verificou-se que a inserção da VPg do isolado TVMV-WT, incapaz de infectar plantas contendo o gene de resistência, no genoma do isolado TVMV-S, confinava a infecção às células iniciais, indicando deficiência no movimento célula-a-célula.

Pelo menos três proteínas virais parecem estar envolvidas no movimento a longa distância dos potyvírus: CP, HC-Pro e VPg. Para a proteína CP, foi verificado que mutantes do TEV-GUS apresentando deleções nas porções amino- e carboxi-terminais da CP apresentavam restrições no movimento a longa distância (Dolja *et al.*, 1995; Dolja *et al.*, 1994). O movimento a longa distância destes mutantes não pôde ser restabelecido pela expressão da CP a partir de plantas transgênicas. No caso do PSbMV, verificou-se por meio da análise genética de quimeras que a substituição de uma serina na posição 47 da CP era suficiente para permitir o movimento a longa distância em *Chenopodium quinoa* de um isolado normalmente restrito às folhas inoculadas (Andersen & Johansen, 1998). O resíduo de ácido aspártico na sequência Asp-Ala-Gli da CP do TVMV também confere ao vírus habilidade de se movimentar em plantas de tabaco (Atreya *et al.*, 1995; Lopez-Moya & Pirone, 1998).

O envolvimento de HC-Pro no movimento a longa distância foi demonstrado por diversos autores. Mutantes do TEV-GUS na sequência Cys-Cys-Cys-Glu, localizada na região central da proteína, são deficientes no movimento a longa-distância e este é restabelecido pela expressão da HC-Pro do TEV em plantas transgênicas (Cronin *et al.*,

1995). Analisando-se o comportamento deste mutante em diferentes combinações de enxerto e porta-enxerto, transgênicos ou não, verificou-se que o movimento a longa distância só ocorre na presença da combinação enxerto e porta-enxerto transgênicos, indicando a necessidade da HC-Pro tanto nos tecidos inoculados como não inoculados (Kasschau *et al.*, 1997). Mutações na porção amino-terminal da HC-Pro do TVMV resultaram em ausência de movimento sistêmico (a longa distância) do vírus (Klein *et al.*, 1994).

Estudos envolvendo recombinantes entre duas estirpes do TEV demonstraram o envolvimento da VPg no movimento a longa distância. Analisando-se as estirpes TEV-HAT, restrita às células inoculadas na cultivar de tabaco V20, mas capaz de infectar sistemicamente a cultivar Havana, e TEV-Oxnard, que causa infecção sistêmica em ambas as cultivares, verificou-se que o híbrido TEV-HAT contendo a VPg do TEV-Oxnard era capaz de se mover a longa distância na cultivar V20 (Schaad *et al.*, 1997b).

Ecotipos de *Arabidopsis thaliana* que restringem o movimento à longa distância do TEV sem envolver a resposta de hipersensibilidade foram selecionados para se estudar a restrição ao movimento do TEV. Verificou-se que pelo menos dois genes dominantes, *RTM1* e *RTM2*, presentes nos ecotipos Columbia-0 (Col-0) e Wassilewskija-2 (Ws-2) são responsáveis pela restrição do movimento a longa distância, permitindo a replicação e movimento célula-a-célula do vírus (Mahajan *et al.*, 1998). Ambos foram clonados, verificando-se que *RTM1* codifica uma proteína similar às lecitinas e a uma família de proteínas contendo domínios repetidos do tipo jacalina (Chisholm *et al.*, 2000). O produto do gene *RTM2* é uma proteína apresentando multidomínios contendo uma região amino-terminal de alta similaridade com *small heat shock proteins* (HSPs) (Whitham *et al.*, 2000). Proteínas relacionadas às jacalinas parecem estar envolvidas na resistência de plantas contra insetos e fungos, enquanto que

lecitinas geralmente conferem resistência contra bactérias, fungos e insetos (Chisholm *et al.*, 2000). A expressão de HSPs de plantas é geralmente induzida por temperatura, mas este não é o caso para a proteína codificada pelo gene *RTM2*, que além disso não confere termotolerância às plantas (Whitham *et al.*, 2000).

O mecanismo pelo qual os genes *RTM1* e *RTM2* cooperam no mecanismo de restrição ao movimento à longa distância do TEV não está estabelecido. A restrição pode ser um bloqueio físico para entrada ou passagem do vírus pelo floema, ou inibição de algum fator necessário durante o movimento do vírus nos elementos de tubo crivados. Em experimentos de co-infecção do TEV-GUS com outros vírus como o *Cucumber mosaic virus* (CMV) ou TVMV verificou-se que estes vírus não eram capazes de auxiliar o movimento à longa distância do TEV no ecotipo Col-0, descartando uma resposta de defesa generalizada. O CMV e o TEV codificam respectivamente as proteínas 2b e HC-Pro, envolvidas na supressão do silenciamento gênico pós-transcricional. Em plantas de *Nicotiana* spp. o TEV ocasiona um aumento do acúmulo do CMV, porém este efeito sinérgico não é verificado em plantas Col-0 (*RTM1/RTM2*), indicando que nessas plantas a HC-Pro do TEV não é eficaz na supressão do silenciamento (Whitham *et al.*, 2000). É possível, embora ainda não existam evidências experimentais nesse sentido, que a incapacidade de HC-Pro em suprimir a resposta de silenciamento seja a responsável pela restrição ao movimento a longa distância do vírus em plantas contendo os genes *RTM1* e *RTM2*.

4. Taxonomia de potyvírus

Características como gama de hospedeiros, sintomatologia, morfologia de inclusões citoplasmáticas e sorologia constituíram durante vários anos os principais critérios para a classificação de espécies e estirpe de potyvírus. Apesar destas

características terem desempenhado papel significativo na determinação do relacionamento taxonômico entre muitos potyvírus, elas por si só não fornecem uma solução adequada para a identificação de espécies e estirpes no gênero como um todo, devido à intensa variação biológica e antigênica observada entre membros do gênero (Shukla *et al.*, 1994). Atualmente, um dos principais critérios adotados pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) para a designação de novas espécies para o gênero *Potyvirus* é a comparação da seqüência de aminoácidos da poliproteína e da proteína capsidial (Berger *et al.*, 2005). A seqüência de nucleotídeos da 3'NTR também pode ser utilizada na classificação (Adams *et al.*, 2005b). De um modo geral, espécies distintas apresentam identidade de até 53% para as seqüências de aminoácidos da CP, enquanto estirpes de um mesmo vírus apresentam de 83 a 99 % de identidade. Comparações das seqüências do genoma completo de espécies da família *Potyviridae* demonstraram que a maioria das espécies em um mesmo gênero possui de 50 a 55% de identidade entre as seqüências de nucleotídeos da ORF completa (Adams *et al.*, 2005b). O nível de identidade para demarcação de espécies foi proposto em 76% para seqüências de nucleotídeos, e 82% para seqüências de aminoácidos. A análise com base na seqüência de nucleotídeos da região codificadora da proteína capsidial indica um valor de 76-77% de identidade para demarcação de espécies. A análise comparativa das seqüências de aminoácidos da CP de diversos potyvírus reflete adequadamente o relacionamento entre espécies. A aplicação desse modelo levou à determinação do posicionamento taxonômico do *Passionfruit woodiness virus* (PWV), *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), *South African passiflora virus* (SAPV) e *Sesame mosaic virus* (SeMV) (Berger *et al.*, 1997; McKern *et al.*, 1994; Pappu *et al.*, 1997; Sithole-Niang *et al.*, 1996). A porcentagem de identidade entre as seqüências de aminoácidos da CP de isolados de PWV e de CABMV é inferior a 70%, indicando claramente que esses

vírus constituem espécies distintas. Entretanto, isolados de CABMV, SAPV e SeMV apresentaram identidade em torno de 85%, indicando tratar-se de estirpes do mesmo potyvírus. Como o CABMV foi o primeiro desses vírus a ser descrito, foi recomendado que o SAPV e SeMV passassem a ser considerados estirpes do CABMV (Sithole-Niang *et al.*, 1996).

Avanços substanciais ocorreram recentemente no conhecimento da biologia molecular da interação entre potyvírus e seus hospedeiros. Isso se deve em grande parte à clonagem do genoma completo destes vírus, proporcionando estudos com clones infecciosos, utilização de técnicas de mutagênese e construção de vírus híbridos recombinantes (Revers *et al.*, 1999). Em alguns casos, a simples comparação entre as seqüências de isolados biologicamente distintos pode indicar as diferenças moleculares correspondentes. O exemplo clássico foi a identificação da seqüência de três aminoácidos (Asp-Ala-Gli) na região amino-terminal da CP essenciais para a transmissão de potyvírus por afídeos, feita com base na comparação entre as seqüências de isolados normais e de mutantes que haviam perdido a capacidade de serem transmitidos pelo vetor (Atreya *et al.*, 1995). Em outro estudo, Takaki *et al.* (2006) clonaram e sequenciaram dois isolados (fraco e forte) do potyvírus *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) e demonstraram que eles possuíam como característica diferencial na sua seqüência genômica uma deleção de 92 aminoácidos na região N-terminal da proteína HC-Pro, que determinava um fenótipo atenuado. Isolados de *Potato virus A* (PVA) que infectam plantas de *Nicotiana benthamiana* sistemicamente causando mosaico severo e distorção foliar também foram estudados. O isolado PVA-B11 difere de PVA-U por não ser capaz de infectar plantas de batata. Vírus recombinantes foram obtidos a partir dos clones infecciosos de ambos os isolados. Curiosamente, um dos recombinantes induziu um fenótipo atípico de amarelecimento das nervuras sem causar distorção foliar em *N.*

benthamiana. Apesar da diferença fenotípica, comparações dos genomas dos dois isolados revelaram identidade elevada, exceto para as regiões codificadoras de 6K₁ e da proteína capsidial, com 95,5 e 96,8% de identidade, respectivamente. Aparentemente um evento de recombinação entre isolados semelhantes deu origem a um novo isolado capaz de induzir um fenótipo distinto, sugerindo que diferentes partes do genoma agem coordenadamente favorecendo a adaptabilidade de novos isolados (Paalme *et al.*, 2004). Entretanto, em outros casos a comparação da seqüência, por si só, não permite a identificação de regiões do genoma viral associadas a determinadas propriedades biológicas dos vírus. Por exemplo, a comparação das seqüências de nucleotídeos dos genomas completos de dois isolados de *Lettuce mosaic virus* (LMV), um deles (LMV-E) capaz de infectar plantas com o gene de resistência *moI¹*, e outro (LMV-0) incapaz de infectar tais plantas, identificou mais de 200 diferenças ao longo de todo o genoma (Revers *et al.*, 1999). Nesses casos, a estratégia mais comumente empregada é a produção de recombinantes contendo porções dos genomas dos dois isolados, seguida de análise fenotípica (Krause-Sakate *et al.*, 2005; Palanichelvam *et al.*, 1998; Tribodet *et al.*, 2005).

MATERIAL E MÉTODOS

1. Manutenção dos isolados virais

Os dois isolados de CABMV utilizados no trabalho são provenientes dos estados de Minas Gerais (isolado MG-Avr, obtido de planta de maracujá) (Costa, 1996) e Paraíba (isolado BR1, obtido de planta de amendoim) (Pio-Ribeiro *et al.*, 2000). Os isolados foram mantidos em plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Preto 153, caupi (*Vigna unguiculata* (L.) subsp. *unguiculata* Walp.) cv. Pitiúba e *Nicotiana benthamiana* Domin., por meio de inoculações sucessivas via extrato vegetal tamponado em fosfato de potássio 0,05 M, pH 7.2, contendo sulfito de sódio a 0,1% (p/v). Os isolados também foram armazenados *in vitro* a -20° C na forma de material foliar dessecado.

2. Clonagem e sequenciamento do genoma dos isolados BR1 e MG-Avr

Folhas de feijoeiro 'Preto 153' apresentando infecção sistêmica foram coletadas e utilizadas para a obtenção de uma preparação viral concentrada (Lane, 1992). O RNA viral dos isolados BR1 e MG-Avr, foi extraído a partir das preparações concentradas conforme descrito anteriormente (Krause-Sakate *et al.*, 2001). O RNA viral foi

empregado como molde para a síntese de cDNA via transcrição reversa, utilizando-se um oligonucleotídeo específico para o CABMV (p2: 5'-AGC GAG TTT TCA TAC ACA AAT C-3'), cuja sequência foi determinada a partir da sequência da região codificadora da proteína capsial do isolado MG-Avr (disponível no GenBank, número de acesso DQ397525), e o kit "ThermoScript RT-PCR System" (Invitrogen), de acordo com instruções do fabricante. Em seguida, o cDNA foi empregado como molde em reações de PCR, utilizando-se o mesmo oligonucleotídeo 3' (p2) em conjunto com um oligonucleotídeo universal para potyvírus HC2+ (5'-GCI GAR YTI CCI MGI ATW YTR GTK GAY CA3'), cuja sequência foi determinada a partir dos motivos conservados presente na região C-terminal da região codificadora da proteína HC-Pro (Mlotshwa *et al.*, 2002). Nesta etapa de amplificação foi utilizada a enzima "Platinum High Fidelity *Taq* DNA Polymerase" (Invitrogen), que possui atividade de correção de erro.

Inicialmente foram amplificados dois fragmentos a partir do isolado MG-Avr, que foram clonados no plasmídeo vetor pGEM-T-Easy (Promega), de acordo com as instruções do fabricante, originando os clones M1 e M2 (Figura 2). A partir da sequência destes clones foram desenhados oligonucleotídeos utilizados para amplificar o restante do genoma dos dois isolados de CABMV em estudo. Utilizando-se o cDNA obtido com o oligonucleotídeo p2 foram realizadas amplificações via PCR para os dois isolados, da mesma forma descrita anteriormente, com os oligonucleotídeos CP (5'-CTG AGC TGT GTC TTT GAT GC-3', a partir da sequência do isolado MG-Avr disponível no GenBank) e NIa-2 (5'-CGT ACC TGC ACC TAA CG-3', a partir da sequência do clone M1), e NIa-1 (5'-CTG TGA GGT GTT AAG TCC-3', a partir da sequência do clone M1) e P3-2 (5'-GAT TTG TGA GTG CGT GC-3', a partir da sequência do clone M2). Os insertos foram clonados em pGEM-T-easy originando,

respectivamente, os clones Ca1-BR/Ca1-MG e Ca2-BR/Ca2-MG (Figura 2). Para a obtenção dos clones Ca3-BR/Ca3-MG foi realizada uma nova reação de transcrição reversa utilizando-se o kit “SuperScript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase” (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante, e o oligonucleotídeo específico P3-1 (5'-CCC AGT TGT TCA AGG AG-3', a partir da sequência do clone M2). O novo cDNA obtido foi empregado como molde em reações de PCR utilizando-se o mesmo oligonucleotídeo P3-1 em conjunto com o oligonucleotídeo 5'CABMV (5'-CTA GCT GGA CAC TAG TTG-3'), cuja sequência foi determinada a partir da sequência da região 5' do isolado CABMV-Z. Todas as amplificações foram realizadas utilizando-se a enzima “Platinum High Fidelity *Taq* DNA Polymerase” (Invitrogen).

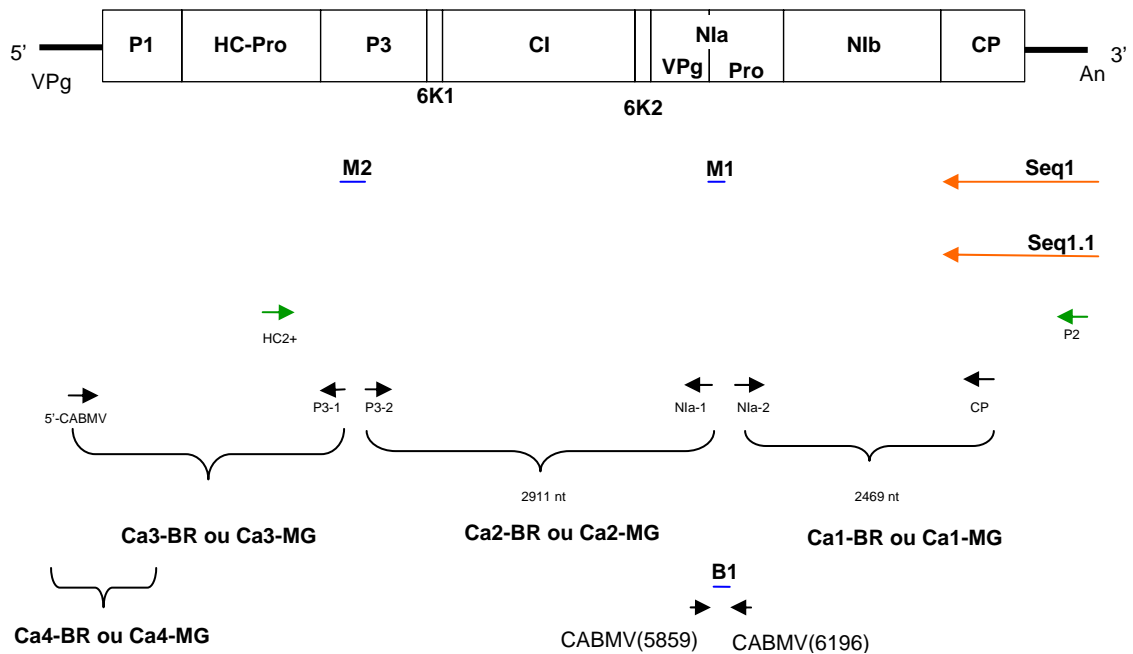


Figura 2. Estratégia empregada para a clonagem do genoma completo dos isolados CABMV-BR1 e CABMV-MG-Avr. As posições de alinhamento dos oligonucleotídeos (com base na sequência do isolado CABMV-Z) estão indicadas por setas pretas. As setas vermelhas indicam a região do genoma previamente seqüenciada (Seq1, para o isolado BR1, número de acesso no GenBank AF241233, e Seq1.1, para o isolado MG-Avr, número de acesso DQ397525). As chaves indicam a região correspondente a cada clone.

Para a obtenção dos clones Ca4-BR e Ca4-MG, foi realizada uma nova extração de RNA para os dois isolados a partir de folhas de feijoeiro, utilizando-se o reagente Brazol (LGC Biotecnologia), de acordo com instruções do fabricante. Estes RNAs serviram de molde para a síntese de cDNA utilizando-se o kit “SuperScript II RNase H Reverse Transcriptase” (Invitrogen) e o oligonucleotídeo específicos GSP1(5’) (5’-TCT TAC CTC CCT CAT GCG GAA G-3’) cuja a sequência foi determinada a partir

da sequência do clone Ca3-BR. Os cDNAs, em conjunto com o oligonucleotídeo GSP1 e o oligonucleotídeo GSP2 (5'- CGC AAG TTG CAC AAC TTG TC-3'), cuja sequência também foi determinada a partir da sequência do clone Ca3-BR, foram empregados em reações de amplificação com o kit "5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends" (Invitrogen), de acordo com instruções do fabricante. Por fim, a sequência do isolado BR1 correspondente ao clone M1 foi amplificada utilizando-se o cDNA sintetizado com o oligonucleotídeo p2 e os oligonucleotídeos CABMV-5859 (5'-GCA AGA TGA GAT CGG AG-3') e CABMV-6196 (5'-GTA CAC CCA TCA GAA GCG-3'), cujas sequências foram determinadas a partir das sequências dos clones Ca1-BR e Ca2-BR, obtendo-se o clone B1.

O sequenciamento de todos os clones foi realizado pela MacroGen Inc., na Coreia do Sul (www.macrogen.com).

3. Comparações de sequências e análise filogenética

As sequências de nucleotídeos e aminoácidos correspondentes aos isolados BR1 e MG-Avr foram comparadas com sequências de potyvírus relacionados disponíveis no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank). Alinhamentos múltiplos foram obtidos utilizando-se o programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). A partir dos alinhamentos foram preparadas árvores filogenéticas utilizando-se o programa MEGA, versão 3.1 (Kumar *et al.*, 2004), utilizando-se o método de *neighbour-joining* com correção Poisson. Os ramos das árvores foram testados por *bootstrap*, com 2.000 repetições.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seqüência obtida para o isolado BR1 inclui desde a região N-terminal da região codificadora da proteína P1 até a extremidade 3' do genoma viral, e a seqüência do isolado MG-Avr inclui desde a região C-terminal da região codificadora da proteína HC-Pro até a extremidade 3' do genoma viral. A seqüência do isolado BR1 possui 9141 nucleotídeos, incluindo a região 3'-NTR com 231 nucleotídeos. A seqüência do isolado MG-Avr possui 7332 nucleotídeos, incluindo a região 3'-NTR com 228 nucleotídeos. As duas seqüências possuem uma única fase aberta de leitura (ORF), com o códon de iniciação não determinado, pois deve estar localizado na região cuja seqüência ainda não foi obtida. As seqüências deduzidas de aminoácidos dos dois isolados foram alinhadas com a seqüência do isolado CABMV-Z. Utilizando a seqüência deste isolado como referência pode-se inferir que os genomas dos isolados MG-Avr e BR1 codificam poliproteínas com 3079 e 3078 aminoácidos, respectivamente (Figura 3).

Para o isolado BR1 nove sítios de clivagem da poliproteína foram identificados, enquanto que para o isolado MG-Avr foram identificados oito sítios de clivagem (Tabela 2). Destes, sete são totalmente conservados entre os dois isolados, e três (HC-Pro/P3, 6K₂/VPg e NIb/CP) são totalmente conservados entre os dois isolados

brasileiros e o isolado Z. A única diferença observada entre os sítios de clivagem dos isolados brasileiros é a presença de ácido aspártico, ao invés de glutamina, na posição -5 do sítio de clivagem N1a-VPg/N1a-Pro do isolado MG-Avr. Na comparação entre os três isolados (BR1, MG-Avr e Z), as diferenças observadas nos sítios 6K₁/CI e CI/6K₂ envolvem aminoácidos que provavelmente não afetam o reconhecimento da seqüência pela protease N1a-Pro. Entretanto, as seqüências dos sítios P3/6K₁ e N1a-Pro/N1b diferem em vários aminoácidos, incluindo o resíduo de valina presente na posição -4, altamente conservado entre todos os potyvírus. É possível que a seqüência do isolado Z contenha erros nessas posições. As seqüências dos isolados brasileiros são idênticas para ambos os sítios (E-H-V-E-T-Q/A para P3/6K₁, e D-G-V-A-T-Q/S para N1a-Pro/N1b), e estão em total conformidade com a seqüência consenso de clivagem pela protease N1a-Pro, X-X-V-X-X-Q/E//S/G/A/V (Carrington *et al.*, 1993; Martín *et al.*, 1990).

Com os sítios de clivagem mapeados pode-se montar o mapa genômico de cada isolado, identificando-se o início da seqüência de cada região codificadora (Figura 3).

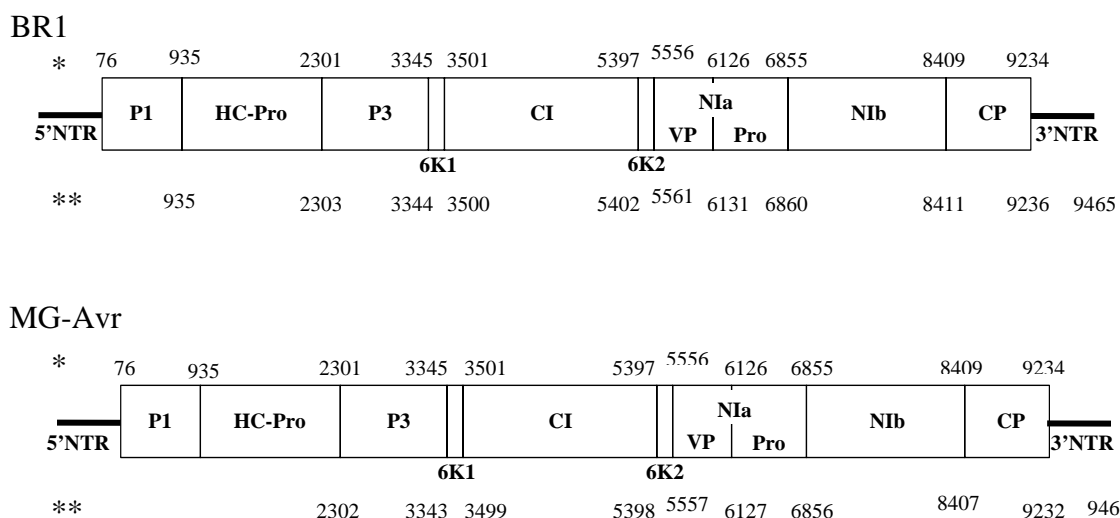


Figura 3. Representação esquemática da organização genômica dos isolados CABMV-BR1 e CABMV-MG-Avr. *, numeração das posições de nucleotídeos do isolado CABMV-Z (AF348210). **, numeração das posições de nucleotídeos do início das regiões codificadoras dos isolados brasileiros, com base na seqüência obtida até o presente.

Tabela 2. Alinhamento dos oito sítios de clivagem da poliproteína identificados nas seqüências deduzidas de aminoácidos dos isolados MG-Avr e BR1 com os sítios correspondentes no isolado CABMV-Z (AF348210). As letras em **negrito** indicam os aminoácidos diferentes entre os isolados.

Sítios de clivagem	HC-Pro/ P3	P3/6K1	6K1/CI	CI/6K2	6K2/NIa- VPg	VPg/NIa- Pro	NIa/NIb	NIb/CP
MG-Avr	KFYKVG/G	EHVETQ/A	EEVRMQ/S	NTVCLQ/S	EEVTTQ/G	ENVGVE/S	DGVATQ/S	EDVVLQ/S
BR1	KFYKVG/G	EHVETQ/A	EEVRMQ/S	NTVCLQ/S	EEVTTQ/G	EDVGVE/S	DGVATQ/S	EDVVLQ/S
Z	KFYKVG/G	RVGRHQ/A	EEVRVQ/G	NTVCLQ/G	EEVTTQ/G	EDVGVE/S	DRGCTQ/S	EDVVLQ/S

O alinhamento das seqüências deduzidas de aminoácidos dos isolados MG-Avr, BR1 e Z permite mapear os motivos conservados presentes nas diferentes proteínas produzidas durante a infecção da planta por potyvírus (Figura 4). Na região codificadora da proteína CI foram encontrados os motivos conservados G-A-V-G-S-G-K-S-T, V-L-L-L-E-P-T-R-P-L, K-V-S-A-T, L-V-Y-V, L-E-P-T-R-P-L e V-A-T-N-I-I-E-N-G-V-T-L, relacionados com as atividades de ATPase, ligação a RNA e RNA helicase (Eagles *et al.*, 1994; Fernandez *et al.*, 1995; Laín *et al.*, 1991). Na região codificadora da proteína NIb observou-se a presença dos motivos S-L-K-A-E-L e G-D-D, ambos relacionados com atividade de RNA polimerase dependente de RNA (Hong & Hunt, 1996). Na região codificadora da CP, os motivos D-A-G, essencial para a transmissão por afídeos (Atreya *et al.*, 1991; Atreya *et al.*, 1995), e A-F-D-F, altamente conservado entre potyvírus, também foram encontrados (Figura 4).

```

MG -----
BR -----
Z YPSQVGTSTSTSWTLVDKKLVDDEGVKMIVDLKDVEEAAKVIQIQKDHTSYTRESKLLSD 60

MG -----
BR -----IAPSAKPRGARSSTVYLSRGHRSAMRHNS--WQTRN 34
Z YDEAQNKFTESELLQLPGMWAKLRIDAYSPIRKTKKGAIINRVSFRKAQERHEARLVADKE 120

MG -----
BR LLRFLLVNMRVQLTLVPPFRGWDPCNLESVSVFKIPYYRRTRKIQKQMKPKQVVGSSKVL 94
Z LAAFLAGEYESAAYIGSIQGLNNTARNSESISFKTPYYRRTPKIQKQRIKPKQVVGSSQVL 180

MG -----
BR GQVVQLAKQTGISLEFIERGKGRTLKLNIVKRYGSALPKIILPHEGGKTVHEEVNCDKYK 154
Z KQVMQLAQQTGISVEFIERGKGRTLKVNIVKRYGSVLPKIILPHEEGVHVHEEVNKNHK 240

MG -----
BR DTLLSLIKHSTYKPIHQNVFKGDSGLVYPTGKIKALPAHEKDVVVRGRLDGTLINALD 214
Z NTLFLIGHSSYKTIHQSVFRKGDVYPTQKIQSLPEHDKEVFVVRGRLDGSLINALD 300

MG -----
BR WCSEPAHVQHYSHQPEVQFFQGWKVFVDKLVPRTPDHECTVDYSNEQCCELAASLSQILY 274
Z WCSEPSHVQHYSHQLEVQFFQGWKVFVDKLVPRTPDHECTVDYSNEQCCELAASLSQILY 360

MG -----
BR PVKKLSCRQCRFRIKDLSWEEYKEFVT-----LVERAVSEDG 311
Z PVKKLSCRQCRFRIKDLSWEEYKEFVATHFGCCAEATLKEQQSVGFKNVQTLVERAVSEDG 420

MG -----
BR DMDLSLEIIRLTQNYTSTPMLQIQDINKALMKGSSASKQELDQALKQLLAMTQWWKNHMD 371
Z DMELSLEIIRLTQNYTSTPMLQIQDINKALMKGSSASKQELDQALKQLLAMTQWWKNHMD 480

MG -----
BR LTGEDALKAFRNKRASKAILNPSLLCDNQLDKNGNFIWGERGRHSKRFFSNFFEEIIPSE 431
Z LTGEDALKTFRNKRASKAILNPSLLCDNQLDKNGNFIWGERGRHSKRFFSNFFEEIIPSE 540

MG -----
BR GYSKYTIRRNPNQQRKLAIGSLVPLDLNRARVSMQGESVARNPLTKACVSI LRKNFVYP 491
Z GYSKYTIRRNPNQQRKLAIGSLVPLDLNRARVSMQGEVARKPLTKACVSVLEKNFVYP 600

MG -----
BR CCCVTLNNGQPLYSEYKSPTRHLLVVGSSGDPKYIDLPAADSDRMYIAKEGYCYLNIFLA 551
Z CCCVTLNNGQPLYSEYKSPTRHLLVVGSSGDPKYIDLPAADSDRMYIAKEGYCYLNIFLA 660

MG -----IAELPRILVDH 11
BR MLVNVNEEEAKDFTKMVRDVLVPLKGTWPTMMDVATAAYMLSVFHPETKSAELPRILVDH 611
Z MLVNVNEEEAKDFTKMVRDVLVPLKGTWPTMMDVATAAYMLSVFHPETKSAELPRILVDH 720
*****

HC-Pro/P3
MG ESQTMHVIDSFGSLNTGYHVLKAGTVNQLIQFASNDLDSEMKFYKVGGSIVQQRMKCXTAL 71
BR ESQTMHVIDSFGSLNTGYHVLKAGTVNQLIQFASNDLDSEMKFYKVGGSSVQQRMKCETAL 671
Z ESQTMHVIDSFGSLNTGYHVLKAGTVNQLIQFASNDLDSEMKFYKVGGSSVQQRMKCETAL 780
*****:***

```

Figura 4. Alinhamento das seqüências deduzidas de aminoácidos da poliproteína codificada pelo genoma dos isolados CABMV-BR1, CABMV-MG-Avr e CABMV-Z (AF348210). Os sítios de clivagem da poliproteína estão indicados em vermelho. Os motivos conservados presentes nas diferentes regiões codificadoras estão indicados em azul. Os aminoácidos que estão diferentes entre o isolado MG-Avr e BR1 estão destacados em amarelo. Os asteriscos indicam posições conservadas entre as três seqüências.

Fig. 4 (cont.)

MG	RYDAGFGRISASSTKISYTLSTEPTAIPRTIAIDHLISEEMMKNHFDTVASSLTGHS	1030
BR	RYDAGFGRISASSTKISYTLSTEPTAIPRTIAIDHLISEEMMKNHFDTVASSLTGHS	1630
Z	RYDAGFGRISASSTKISYTLSTEPTAIPRTIAIDHLISEEMMKNHFDTVASSLTGYS	1738
	*****;	
	CI/6K ₂	
MG	FSLSGIAEGIRKRYLRDYSTQNIETLQQARSQLEFNSNTVDVNLHEYEDLGILNTVCL	1090
BR	FSLSGIAEGIRKRYLRDYSTQNIETLQQARSQLEFNSNTVDVNLHEYEDLGILNTVCL	1690
Z	FSLSGIAEGIRKRYLRDYSTQNIETLQQARSQLEFNSNTVDVNLPEYEDLGILNTVCL	1798
	*****;	
	6K ₂ /VPg	
MG	QSKQEVAKYLGLKGKWDGSRRLRNDLLLVIFTIIGGGWMMWDYFSRCTQEEVTTQGGKRML	1150
BR	QSKQEVAKYLGLKGKWDGSRRLRNDLLLVIFTIIGGGWMMWDYFSRCTQEEVTTQGGKRML	1750
Z	QSKHEVAKYLGLKGKWDGSKFRNDFLLVVFITIIGGGWMMWDYFSKCTQEEVTTQGGKRMM	1858
	:**:***:***:*****:****:*****:*****;	
MG	QKLKFRDAHDRKVGREYVADDYTMHTFGEAYTKKGEKESHKTKGMGRKTRNFIMHYGV	1210
BR	QKLKFRDAHDRKVGREYVADDYTMHTFGEAYTKKGEKESHKTKGMGRKTRNFIMHYGV	1810
Z	QKLKFRNARDRKVGREYVADDYTMHTFGEAYTKKGEKESHKTKGMGRKTRNFIMHYGV	1918
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****;	
MG	EPENYATIRFVDPPLTGFTMDENPKVDIRLVQDEIGDVRNKFMDGKLDLDRQAIMYNPGVQA	1270
BR	EPENYATIRFVDPPLTGFTMDENPKVDIRLVQDEIGDVRNKFMDGKLDLDRQAIMYNPGVQA	1870
Z	EPENYSTIRFVDPPLTGFTMDEHPRVDIRLVQDEIGEVRGKLMDEGELDRQSIKHNPIQA	1978
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****;	
	VPg/Nla-Pro	
MG	YFLGRGTEKALKVDLTPHRPTLLCAHSNNIAGYPEREDELROTGLPQEVLDKDVAPNED	1330
BR	YFLGRGTEKALKVDLTPHRPTLLCAHSNNIAGYPEREDELROTGLPQEVLDKDVAPNED	1930
Z	YFFGKGTEKALKVDLTPHRPTLLCMSNNIAGYPERENELROTGLPQEVLDKDVAPNED	2038
	::*****:*****:*****:*****:*****:*****;	
MG	VGVESQSTYKGRDYSGISTLVCKIVNASDGCTETIFGIGYGSYIITNGHLFKRNNGTTLT	1390
BR	VGVESKSTYKGRDYSGISTLVCKIVNASDGCTETIFGIGYGSYIITNGHLFKRNNGTTLT	1990
Z	VGVESKSTYKGRDYSGISTLVCKIVNASDGCTETIFGIGYGSYIITNGHLFKRNNGTTLT	2098
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****;	
MG	VKTWHGEFVVPNTTQLRIHFIEGKDAILIRMPKDFPPFAQRNCFRSPKKEERVCMIGTNF	1450
BR	VKTWHGEFVVSNTTQLRIHFIEGKDAILIRVPKDFPPFAQRNCFRSPKKEERVCMIGTNF	2050
Z	VKTWHGEFVVSNTTQLKIHFIEGKDAILIRMPKDFPPFAQRNCFRSPKKEERVCMIGTNF	2158
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****;	
MG	QDKSLRSTVSESSMVIPEGKGSFWVHWISTQDGDGCLPLVSVNDGHIIVGFHGLASNTTSR	1510
BR	QDKSLRSTVSESSMVIPEGKGSFWVHWISTQDGDGCLPLVSVDDGHIIVGFHGLASNTTSR	2110
Z	QEKSLRSTVSESSMVIPEGKGSFWVHWISTQDGDGCLPLVSVDDGHIIVGFHGLASNTTSR	2218
	:**:*****:*****:*****:*****:*****:*****;	
MG	NFFVVPFIDEFKEKYLDCAETLEWNRHHLWQPKIAWGSNLVSNQPKEEFKIAKLITDLF	1570
BR	NFFVVPFIDGFKEKYLDCAETLEWNRHHLWQPKIAWGSNLVNNQPKEEFKIAKLITDLF	2170
Z	NFFVVPFIDGFKEKYLDCAETLEWNRHHLWQPKIAWGSNLVSNQPKEEFKIAKLITDLF	2278
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****;	
	Nla-Pro/Nlb	
MG	DDGVATQSKQEAWLNAMEGNLVACGKAESALVTKHVVKGKCRYFQQYLLSSNQSADFFK	1630
BR	DDGVATQSKQEAWLNAMEGNLVACGKAESALVTKHVVKGKCCYFQQYLLSSNQSADFFK	2230
Z	DDRGCTQSKQEAWLRSALIEGNLIACGKAESALVTKHVVKGKCSYFQQYLLSSNQSADFFK	2338
	** . ***** . * : ***** : ***** : ***** : ***** ;	
MG	PLMGFYQPSRLNKEAFKDFFKYKPKVTVGKVDFAFAQAVSGVKMMMIEFGFSECKYVT	1690
BR	PLMGFYQPSRLNKEAFKDFFKYKPKVTVGKVDFAFAQAVSGVKMMMIEFGFSECKYVT	2290
Z	PLMGFYQPSRLNREAFKDFFKYKPKVTVGKVDFAFAQAVNGVKMMMIEFCFSECKYVT	2398
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****;	
MG	DSEEIF-DSLNMKAAVGAQYKGGKQDYFATMDKFRERLVLSCERLFGYKGLWNGSLK	1749
BR	DSEEIF-DSLNMKAAVGAQYKGGKQDYFATMDEFDRERLVLSCERLFGYKGLWNGSLK	2349
Z	DSRRNFPDSLNMKAAVGAQYKGGKQDYFATMDKFRERLVLSCERLFGYKGLWNGSLK	2458
	*** . * *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****;	
MG	AELRPLEKVEANKTRTFTAAPIDTLGAKVCVDDFNNQFYFNLCQPWTVMGTMKFGYGGWD	1809
BR	AELRPLEKVEANKTRTFTAAPIDTLGAKVCVDDFNIHFNSNLQCPWTVMGTMKFGYGGWD	2409
Z	AELRPLEKVEANKTRTFTAAPIDTLGAKVCVDDFNNQFYFNLCQPWTVMGTMKFGYGLGD	2518
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****;	
MG	KLMRSLPEGWVYCHADGSQFSSLTPLLLNAVLDLRLFFMEDWWVGOEMLENLYAEIVFT	1869
BR	KLMRSLPEGWVYCHADGSQFSSLTPLLLNAVLDLRLFFMEDWWVGOEMLENLYAEIVFT	2469
Z	KLMRSLPEGWIYCHADGSQFSSLTPLLLNAVLDLRMFFMEDWWVGOEMLENLYAEIVFT	2578
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****;	

A comparação das seqüências deduzidas de aminoácidos das regiões codificadoras de cada proteína potencialmente codificada pelo genoma dos isolados BR1 e MG-Avr com os potyvírus do subgrupo do BCMV confirmou a classificação dos dois isolados brasileiros como CABMV, uma vez que a identidade das seqüências de nucleotídeos dos isolados BR1 e MG-Avr é de 87 e 86%, respectivamente, com o CABMV-Z (Tabela 3), valor bastante superior ao limite de 76% atualmente estabelecido para demarcação de espécies do gênero *Potyvirus* (Adams *et al.*, 2005b). As comparações indicaram ainda um alto nível de identidade entre os isolados brasileiros, que chegou a 100% no caso das regiões codificadoras da proteína 6K₂, e 99% para as proteínas P3 e VPg (Tabela 3). Todas as regiões codificadoras apresentaram identidade superior a 95%, exceto a proteína capsidial, que apresentou apenas 85% de identidade entre os dois isolados brasileiros (Tabela 3). É interessante ressaltar que a identidade entre as seqüências de aminoácidos da CP dos isolados Z e BR1 é de 91%, e entre os isolados Z e MG-Avr é de apenas 82% (Tabela 3). Esse resultado sugere que a CP pode estar envolvida na capacidade do isolado MG-Avr de infectar plantas de maracujá. Pelo alinhamento verificou-se também as diferenças nas seqüências de aminoácidos dos dois isolados.

Tabela 3. Porcentagem de identidade entre as regiões codificadoras e não codificadoras do genoma dos isolados de CABMV brasileiros (BR1 e MG-Avr) com o isolado CABMV-Z, e com outros potyvírus relacionados.

Isolado	Genoma completo*		Poliprot. completa**		P3**		6K1**		CI**		6K2**		Nia-VP _g **		Nia-Pro**		Nib**		CP**		3'NTR*	
	BR	MG	BR	MG	BR	MG	BR	MG	BR	MG	BR	MG	BR	MG	BR	MG	BR	MG	BR	MG	BR	MG
BR	-	94	-	94	-	99	-	98	-	97	-	100	-	99	-	95	-	96	-	85	-	95
MG	94	-	94	-	99	-	98	-	97	-	10	-	99	-	95	-	96	-	85	-	95	-
Z	87	86	93	91	89	89	92	94	96	94	86	86	89	88	97	94	94	93	91	82	96	96
SMV	67	66	71	70	53	52	67	69	74	73	62	62	75	75	74	75	80	81	73	63	50	47
BCMV	67	67	71	70	50	50	79	69	76	75	68	68	74	74	74	77	77	77	73	63	49	49
BCMN	69	68	74	73	54	54	74	76	77	76	60	60	78	78	81	82	78	78	83	73	60	60
EAPV	66	66	69	68	53	52	73	76	75	73	62	62	69	69	75	77	76	76	70	62	54	48

*sequências de nucleotídeos

**sequências de aminoácidos

Uma vez que a região codificadora mais variável entre os isolados brasileiros foi a CP, foi realizada uma comparação entre os isolados BR1 e MG-Avr com todos os isolados de CABMV, PWV e potyvírus relacionados depositados no GenBank (Tabela 4). Observou-se que a CP do isolado BR1 possui uma alta porcentagem de identidade (88-94%) com os demais isolados de CABMV, com exceção dos isolado PE-Bnt (81%) e MG-Avr (85%). Por outro lado, o isolado MG-Avr possui identidade relativamente baixa (79-87%) com os demais isolados de CABMV, exceto o isolado PE-Bnt (94%). Verifica-se portanto que, embora os isolados MG-Avr e PE-Bnt aparentemente possuam origem recombinante, com a região codificadora da CP proveniente de um vírus não identificado, não existe relação evidente entre a CP e a capacidade de isolados de CABMV de infectarem maracujá, uma vez que os demais isolados brasileiros (BA-Itb, BA-Jgr, DF-Brs, Es-Vni, PB-Alh, PB-Cnd, PE-Ptr, PE-Bcs1, PE-Bcs2, SE-Nps, SP-Vcz, SP-Prp, F101, F144, M2, M3 e SP) possuem alta identidade para essa sequência (88-94%) com o isolado BR1 (Tabela 4).

A análise filogenética realizada com base nas seqüências completas confirmou os resultados das comparações de seqüências. Os isolados brasileiros BR1 e MG-Avr se agruparam com o isolado CABMV-Z, e formaram um ramo monofilético, com 100% de valor *bootstrap*, com as espécies de potyvírus pertencentes ao subgrupo do BCMV (Figura 5). A análise filogenética com base na sequência codificadora da CP confirmou a origem comum entre os isolados MG-Avr e PE-Bnt (Figura 6). Além disso, indicou que a distância genética entre os isolados está mais relacionada a sua origem geográfica do que à gama de hospedeiros. Assim, os isolados brasileiros formaram um grupo monofilético, com 81% de valor de *bootstrap*, incluindo isolados que infectam ou não o maracujazeiro (Figura 6). O isolado SAP, que infecta esse hospedeiro, está mais distante dos isolados brasileiros (Figura 6).

Desta forma, estudos futuros com a obtenção de clones infecciosos e a utilização de mutagênese serão necessários para averiguar se os diferentes aminoácidos encontrados na seqüência dos isolados de CABMV BR1 e MG-Avr tem algum papel na diferenciação biológica existente entre eles.

Tabela 4. Porcentagem de identidade entre as seqüências deduzidas de aminoácidos da proteína capsial (CP) dos isolados de CABMV brasileiros (BR1 e MG-Avr) com os demais isolados de CABMV, PWV e outros potyvírus relacionados, disponíveis no GenBank.

Espécie -Isolado*	CABMV-MG-Avr	CABMV-BR1
CABMV-BA-Itb	84	91
CABMV-BA-Jgr	86	90
CABMV-DF-Brs	85	91
CABMV-ES-Vni	85	90
CABMV-PB-Alh	85	92
CABMV-PB-Cnd	85	92
CABMV-PE-Bnt	94	81
CABMV-PE-Ptr	85	92
CABMV-PE-Bcs1	85	92
CABMV-PE-Bcs2	83	88
CABMV-SE-Nps	87	93
CABMV-SP-Vcz	85	90
CABMV-SP-Prp	85	90
PWV-F101**	87	93
PWV-F144**	87	93
PWV-M2**	87	93
PWV-M3**	87	93
PWV-SP**	87	94
CABMV-BR1	85	-
CABMV-Z	82	91
CABMV-MG	-	85
CABMV-Ib	80	90
CABMV-Mor	80	89
CABMV-Mon	79	89
PWV-K	62	70
PWV-M	61	71
PWV-S	63	77
BCMV	70	72
BCMNV	73	83
SMV	63	71
EAPV	60	71

*BCMNV, AY138897; BCMV, U34972; CABMV-Br, AF241233; CABMV-SAP, D10053; CABMV-Z, NC_004013; CABMV-Ib, AJ132414; CABMV-Mor, Y18634; CABMV-Mon, Y17822; EAPV, AB246773; PWV-K, 1906186A; PWV-M, P32574; PWV-S, P32575; PWV-F101, AY433951; PWV-F144, AY505342; PWV-M2, AY433952; PWV-M3, AY434454; PWV-SP, AY433950; SMV, D00507.

** Isolados de CABMV incorretamente identificados como PWV no GenBank.

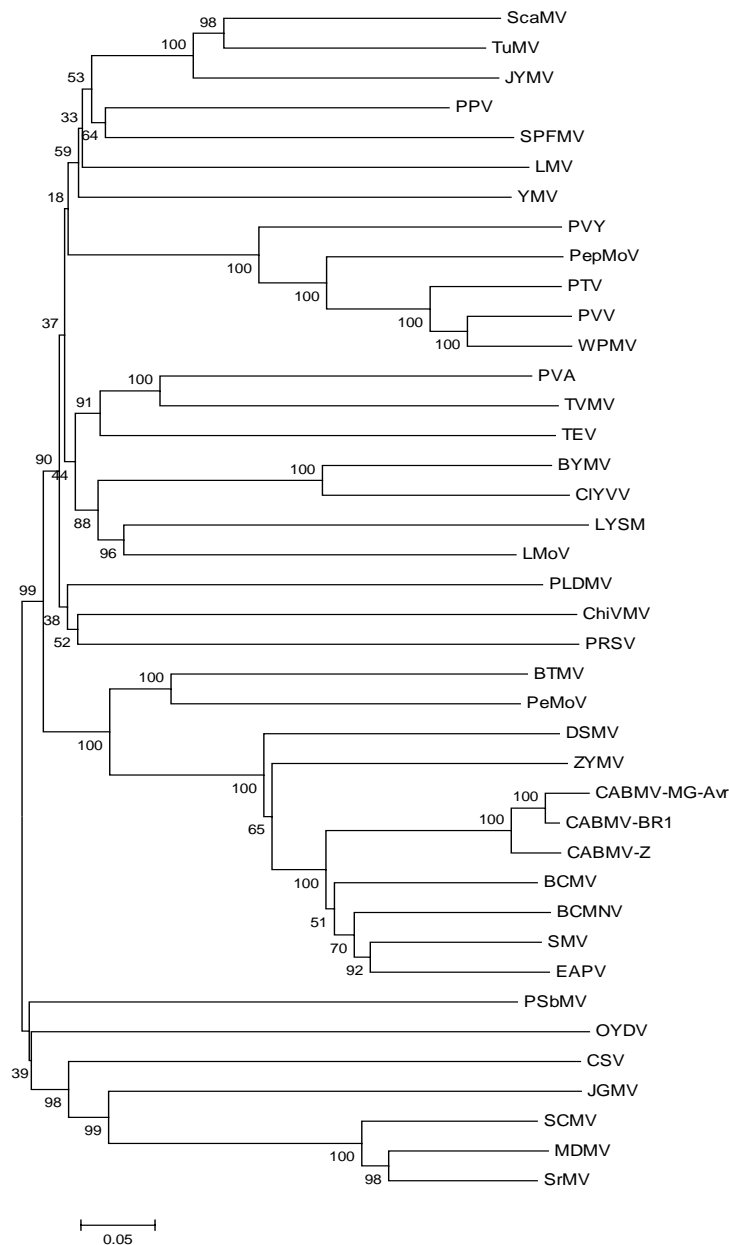


Figura 5. Árvore filogenética obtida a partir das seqüências deduzidas de aminoácidos da poliproteína dos isolados MG-Avr, BR1 e Z e mais 37 seqüências de potyvírus. Árvore gerada pelo método *neighbor-joining*, com correção por Poisson. Os números em cada ramo correspondem aos valores de *bootstrap* (2000 repetições). O comprimento dos ramos verticais é proporcional à distância genética entre os isolados. BCMNV, AY138897; BCMV, U34972; BYMV, U47033; BtMV, AY20639; ChiVMV, AJ237843; CIYVV, AB011819; CSV, AF499738; CABMV-Z, AF348210; DsMV, AJ298033; EAPV, AB246773; JYMV, AB016500; JGMV, Z26920; LYSV, AJ307057; LMV, X97704; LMoV, AJ564636; MDMV, AJ001691; OYDV, AJ510223; PLDMV, AB088221; PRSV, AY010722; PeMoV, AF023848; PepMoV, AF501591; PTV, AJ516010; PPV, X16415; PVA, AF543212; PVV, AJ243766; PVY, X12456; ScaMV, AJ316084; SrMV, AJ310197; SMV, D00507; SCMV, AJ297628; SPFMV, D86371; TEV, M11458; TVMV, X04083; TuMV, AF169561; WPMV, AJ437279; YMV, U42596; ZYMV, AJ307036.

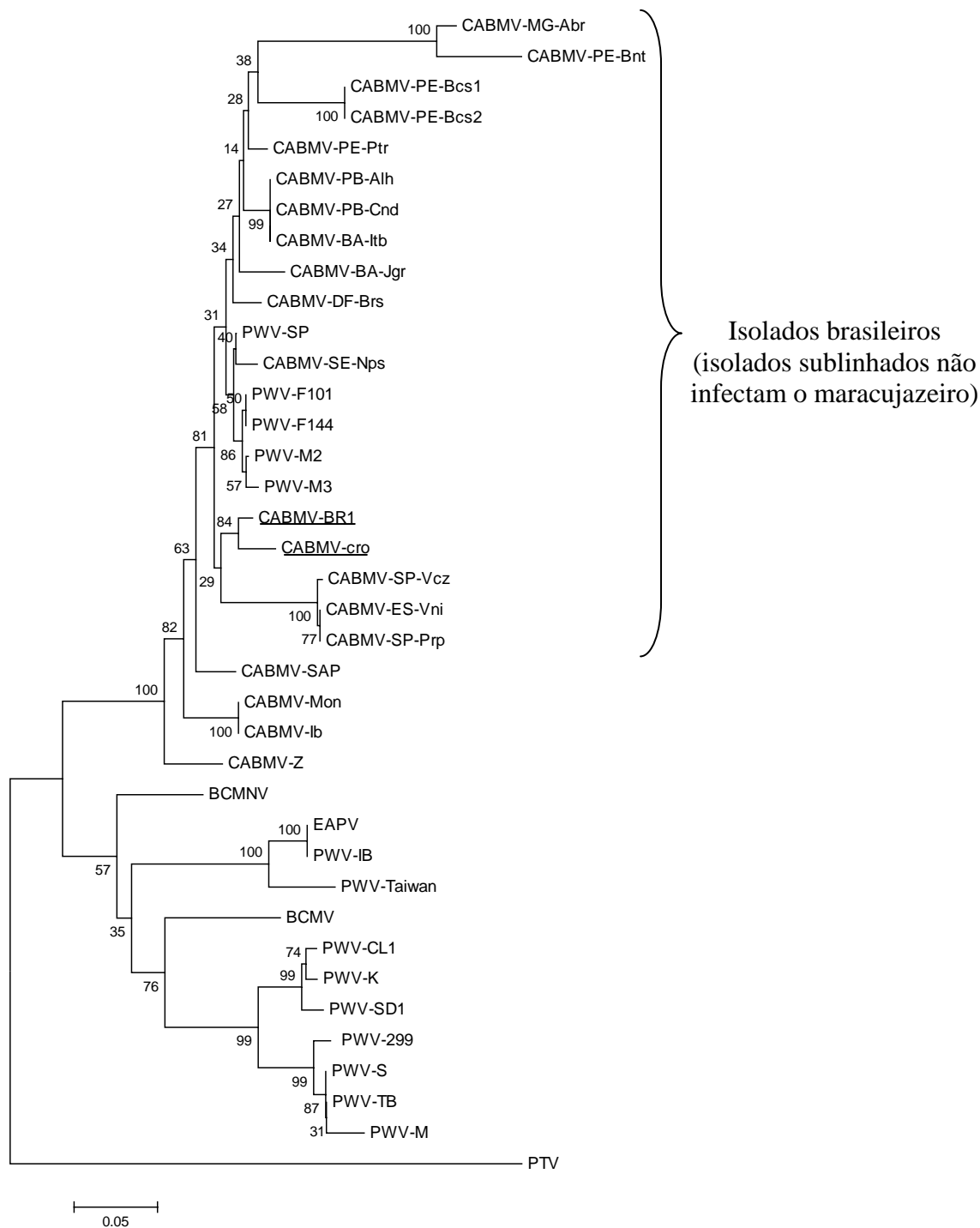


Figura 6. Árvore filogenética obtida a partir das seqüências deduzidas de aminoácidos da CP de isolados de CABMV, PWV e demais espécies de potyvírus do subgrupo do BCMV. Árvore gerada pelo método *neighbor-joining*, com correção de Poisson. Os números em cada ramo correspondem aos valores de *bootstrap* (2000 repetições). O comprimento dos ramos verticais é proporcional à distância genética entre os isolados. Os números de acesso das seqüências são os mesmos listados na Tabela 4.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M.J.; ANTONIW, J.F.; BEAUDOIN, F. Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family Potyviridae. *Molecular Plant Pathology*, v. 6, p. 471-487, 2005a.
- ADAMS, M.J.; ANTONIW, J.F.; FAUQUET, C.M. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. *Archives of Virology*, v. 150, p. 459-479, 2005b.
- ALLISON, R.; JOHNSTON, R.E.; DOUGHERTY, W.G. The nucleotide sequence of the coding region of tobacco etch virus genomic RNA: evidence for the synthesis of a single polyprotein. *Virology*, v. 154, p. 9-20, 1986.
- ANANDALAKSHMI, R.; PRUSS, G.J.; GE, X.; MARATHE, R.; MALLORY, A.C.; SMITH, T.H.; VANCE, V.B. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 95, p. 13079-13084, 1998.
- ANDERSEN, K.; JOHANSEN, I.E. A single conserved amino acid in the coat protein gene of Pea seed-borne mosaic potyvirus modulates the ability of the virus to move systemically in *Chenopodium quinoa*. *Virology*, v. 241, p. 304-311, 1998.
- ARBATOVA, J.; LEHTO, K.; PEHU, E.; PEHU, T. Localization of the P1 protein of potato Y potyvirus in association with cytoplasmic inclusion bodies and in the cytoplasm of infected cells. *Journal of General Virology*, v. 79, p. 2319-2323, 1998.
- ATREYA, P.L.; ATREYA, C.D.; PIRONE, T.P. Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. *Microbiology*, v. 88, p. 7887-7891, 1991.
- ATREYA, P.L.; LOPEZ-MOYA, J.J.; CHU, M.H.; ATREYA, C.D.; PIRONE, T.P. Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyvirus transmission by aphids. *Journal of General Virology*, v. 76, p. 265-270, 1995.
- BASSO, J.; DALLAIRE, P.; CHAREST, P.J.; DEVANTIER, Y.; LALIBERTE, J.F. Evidence for an internal ribosome entry site within the 5' non-translated region of turnip mosaic potyvirus RNA. *Journal of General Virology*, v. 75, p. 3157-3165, 1994.

- BERGER, P.H.; ADAMS, M.J.; BARNETT, O.W.; BRUNT, A.A.; HAMMOND, J.; HILL, J.H.; JORDAN, R.L.; KASHIWAZAKI, S.; RYBICKI, E.P.; SPENCE, N.; STENGER, D.C.; OHKI, S.T.; UYEDA, I.; VAN ZAAYEN, A.; VALKONEN, J.P.; VETTEN, H.J. Family *Potyviridae*. pp.819-841 In: FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. (Eds.) *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier Academic Press. 2005.
- BERGER, P.H.; WYATT, S.D.; SHIEL, P.J.; SILBERNAGEL, M.J.; DRUFFEL, K.; MINK, G.I. Phylogenetic analysis of the Potyviridae with emphasis on legume-infecting potyviruses. *Archives of Virology*, v. 142, p. 1979-1999, 1997.
- BEZERRA, D.R.; LIMA, J.A.A.; XAVIER FILHO, J. Purificação e caracterização de um isolado cearense do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 20, p. 553-560, 1995.
- BOCK, K.R.; CONTI, M. Cowpea aphid-borne mosaic virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*, v. 134, p. 1974.
- BRIGNETI, G.; VOINNET, O.; LI, W.X.; JI, L.H.; DING, S.W.; BAULCOMBE, D.C. Viral pathogenicity determinants are suppressors of gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO Journal*, v. 17, p. 6739-6746, 1998.
- BRUCKNER, C.H. Perspectivas do melhoramento genético do maracujazeiro. pp.7-24 In: SÃO JOSÉ, A.R.; BRUCKNER, C.H.; MANICA, I.; HOFFMANN, M. (Eds.) *Maracujá: temas selecionados - Melhoramento, morte prematura, polinização, taxonomia*. Porto Alegre: Cinco Continentes. 1997.
- BRUCKNER, C.H.; MELLETTI, L.M.M.; OTONI, W.C.; ZERBINI, F.M. Maracujazeiro. pp.373-409 In: BRUCKNER, C.H. (Ed.) *Melhoramento de fruteiras tropicais*. Viçosa, MG: Editora UFV. 2002.
- CARRINGTON, J.C.; DOUGHERTY, W.G. Small nuclear inclusion protein encoded by a plant potyvirus genome is a protease. *Journal of Virology*, v. 61, p. 2540-2548, 1987.
- CARRINGTON, J.C.; DOUGHERTY, W.G. A viral cleavage site cassette: Identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 85, p. 3391-3395, 1988.
- CARRINGTON, J.C.; FREED, D.D. Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. *Journal of Virology*, v. 64, p. 1590-1597, 1990.
- CARRINGTON, J.C.; FREED, D.D.; OH, C.-S. Expression of potyviral polyproteins in transgenic plants reveals three proteolytic activities required for complete processing. *EMBO Journal*, v. 9, p. 1347-1353, 1990.
- CARRINGTON, J.C.; FREED, D.D.; SANDERS, T.C. Autocatalytic processing of the potyvirus helper component proteinase in *Escherichia coli* and *in vitro*. *Journal of Virology*, v. 63, p. 4459-4463, 1989.
- CARRINGTON, J.C.; HALDEMAN, R.; DOLJA, V.V.; RESTREPO-HARTWIG, M.A. Internal cleavage and trans-proteolytic activities of the VPg-proteinase (NIa) of tobacco etch potyvirus *in vivo*. *Journal of Virology*, v. 67, p. 6995-7000, 1993.

- CARRINGTON, J.C.; JENSEN, P.E.; SHAAD, M.C. Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. *Plant Journal*, v. 14, p. 393-400, 1998.
- CARRINGTON, J.C.; WHITHAM, S.A. Viral invasion and host defense: strategies and counter- strategies. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 1, p. 336-341, 1998.
- CERVI, A.C. Espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) publicadas e descritas nos últimos 55 anos (1950 –2005) na América do Sul e principais publicações Brasileiras. 2005
- CHAGAS, C.M.; KITAJIMA, E.W.; LIN, M.T. Grave moléstia em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) no Estado da Bahia causada por um isolado do vírus do "woodiness" do maracujá. *Fitopatologia Brasileira*, v. 6, p. 259-268, 1981.
- CHAGAS, C.M.; REZENDE, J.A.M.; COLARICCIO, A. Ocorrência do vírus do endurecimento do fruto do maracujazeiro no Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 14, p. 187-290, 1992.
- CHISHOLM, S.T.; MAHAJAN, S.K.; WHITHAM, S.A.; YAMAMOTO, M.L.; CARRINGTON, J.C. Cloning of the Arabidopsis RTM1 gene, which controls restriction of long-distance movement of tobacco etch virus. *Plant Biology*, v. 97, p. 489-494, 2000.
- COBB, N.A. Woodiness of passionfruit. *Agricultural Gazette of New South Wales*, v. 12, p. 407-418, 1901.
- COSTA, A.F. Comportamento de *Passiflora* spp. diante do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro e a relação entre a nutrição mineral e a interação vírus-*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. Tese de Doutorado, Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 129 p. 1996.
- COSTA, A.F.; BRAZ, A.S.K.; CARVALHO, M.G. Transmissão do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro por afídeos (Hemiptera-Aphididae). *Fitopatologia Brasileira*, v. 20, p. 376, 1995.
- CRONIN, S.; VERCHOT, J.; HALDEMAN-CAHILL, R.; SCHAAD, M.C.; CARRINGTON, J.C. Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell*, v. 7, p. 549-559, 1995.
- DAROS, J.A.; CARRINGTON, J.C. RNA binding activity of N1a proteinase of tobacco etch potyvirus. *Virology*, v. 237, p. 327-336, 1997.
- DIPIERO, R.M.; REZENDE, J.A.M.; YUKI, V.A.; PASCHOLATI, S.F.; DELFINO, M.A. Transmissão do Passionfruit woodiness virus por *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera: Aphididae) e colonização de maracujazeiro pelo vetor. *Neotropical Entomology*, v. 35, p. 139-140, 2006.
- DOLJA, V.V.; HALDEMAN CAHILL, R.; MONTGOMERY, A.E.; VANDENBOSCH, K.A.; CARRINGTON, J.C. Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. *Virology*, v. 206, p. 1007-1016, 1995.
- DOLJA, V.V.; HALDEMAN, R.; ROBERTSON, N.L.; DOUGHERTY, W.G.; CARRINGTON, J.C. Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO Journal*, v. 13, p. 1482-1491, 1994.

- DOUGHERTY, W.G.; CARRINGTON, J.C.; CARY, S.M.; PARKS, T.W. Biochemical and mutational analysis of a plant virus cleavage site. *EMBO Journal*, v. 7, p. 1281-1287, 1988.
- DOUGHERTY, W.G.; PARKS, D. Post-translational processing of the tobacco etch virus 49-kDa small nuclear inclusion polyprotein: identification of an internal cleavage site and delimitation of VPg and proteinase domains. *Virology*, v. 183, p. 449-456, 1991.
- EAGLES, R.M.; BALMORIMELIAN, E.; BECK, D.L.; GARDNER, R.C.; FORSTER, R.L.S. Characterization of NTPase, RNA-binding and RNA-helicase activities of the cytoplasmic inclusion protein of tamarillo mosaic potyvirus. *European Journal of Biochemistry*, v. 224, p. 677-684, 1994.
- FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. (Eds.) *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier Academic Press. 1259p. 2005.
- FELLERS, J.; WAN, J.; HONG, Y.; COLLINS, G.B.; HUNT, A.G. *In vitro* interactions between a potyvirus-encoded, genome-linked protein and RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of General Virology*, v. 79, p. 2043-2049, 1998.
- FERNANDEZ, A.; LAIN, S.; GARCIA, J.A. RNA helicase activity of the plum pox potyvirus CI protein expressed in *Escherichia coli*. Mapping of an RNA binding domain. *Nucleic Acids Research*, v. 23, p. 1327-1332, 1995.
- GALLIE, D.R.; TANGUAY, R.L.; LEATHERS, V. The tobacco etch viral 5' leader and poly(A) tail are functionally synergistic regulators of translation. *Gene*, v. 165, p. 233-238, 1995.
- GIORIA, R.; BOSQUÊ, G.G.; REZENDE, J.A.M.; AMORIM, L.; KITAJIMA, E.W. Incidência de viroses de maracujazeiro em Alta Paulista-SP e danos causados pelo Passion fruit woodiness virus. *Fitopatologia Brasileira*, v. 25, p. 182-189, 2000.
- HALDEMAN-CAHILL, R.; DAROS, J.A.; CARRINGTON, J.C. Secondary structures in the capsid protein coding sequence and 3' nontranslated region involved in amplification of the tobacco etch virus genome. *Journal of Virology*, v. 72, p. 4072-4079, 1998.
- HARI, V. The RNA of tobacco etch virus: Further characterization and detection of protein linked to RNA. *Virology*, v. 112, p. 391-399, 1981.
- HONG, Y.; HUNT, A.G. RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA polymerase. *Virology*, v. 226, p. 146-151, 1996.
- INOUE, A.K.; MELLO, R.N.; NAGATA, T.; KITAJIMA, E.W. Characterization of passionfruit woodiness virus isolates from Brasília and surrounding region, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 20, p. 479-487, 1995.
- IWAI, H.; OHMORI, T.; KUOKAWA, Y.; MUTA, T.; ARAI, K. New record of passionfruit woodiness virus in Japan. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, v. 62, p. 459-465, 1996.
- IWAI, H.; TERAHARA, R.; YAMASHITA, Y.; UEDA, S.; NAKAMURA, M. Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of an Amami-O-shima strain of East Asian Passiflora potyvirus. *Archives of Virology*, v. 151, p. 1457-1460, 2006a.

- IWAI, H.; YAMASHITA, Y.; NISHI, N.; NAKAMURA, M. The potyvirus associated with the dappled fruit of *Passiflora edulis* in Kagoshima prefecture, Japan, is the third strain of the proposed new species *East Asian passiflora virus* (EAPV) phylogenetically distinguished from strains of *Passion fruit woodiness virus*. *Archives of Virology*, v. 151, p. 811-818, 2006b.
- JOHANSEN, I.E.; DOUGHERTY, W.G.; KELLER, K.E.; WANG, D.; HAMPTON, R.O. Multiple viral determinants affect seed transmission of pea seedborne mosaic virus in *Pisum sativum*. *Journal of General Virology*, v. 77, p. 3149-3154, 1996.
- KASSCHAU, K.D.; CARRINGTON, J.C. Requirement of HC-Pro processing during genome amplification of tobacco etch potyvirus. *Virology*, v. 209, p. 268-273, 1995.
- KASSCHAU, K.D.; CARRINGTON, J.C. A counterdefensive strategy of plant viruses: Suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell*, v. 95, p. 461-470, 1998.
- KASSCHAU, K.D.; CRONIN, S.; CARRINGTON, J.C. Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. *Virology*, v. 228, p. 251-262, 1997.
- KLEIN, P.G.; KLEIN, R.R.; RODRÍGUEZ-CEREZO, E.; HUNT, A.G.; SHAW, J.G. Mutational analysis of the tobacco vein mottling virus genome. *Virology*, v. 204, p. 759-769, 1994.
- KRAUSE-SAKATE, R. Análise molecular da interação *Lettuce mosaic virus* (LMV)-alface, utilizando como modelo o isolado LMV-AF199. Tese DS, Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 178 p. 2001.
- KRAUSE-SAKATE, R.; MELLO, R.N.; ZAMBOLIM, E.M.; PAVAN, M.A.; CARVALHO, M.G.; LE GALL, O.; ZERBINI, F.M. Molecular characterization of two Brazilian isolates of *Lettuce mosaic virus* (LMV) with distinct biological properties. *Fitopatologia Brasileira*, v. 26, p. 153-157, 2001.
- KRAUSE-SAKATE, R.; REDONDO, E.; RICHARD-FORGET, F.; JADAO, A.S.; HOUVENAGHEL, M.C.; GERMAN-RETANA, S.; PAVAN, M.A.; CANDRESSE, T.; ZERBINI, F.M.; LE GALL, O. Molecular mapping of the viral determinants of systemic wilting induced by a *Lettuce mosaic virus* (LMV) isolate in some lettuce cultivars. *Virus Research*, v. 109, p. 175-180, 2005.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetic analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, v. 5, p. 150-163, 2004.
- LAÍN, S.; MARTIN, M.T.; RIECHMANN, J.L.; GARCÍA, J.A. Novel catalytic activity associated with positive-strand RNA virus infection - nucleic acid-stimulated ATPase activity of the plum pox potyvirus helicase-like protein. *Journal of Virology*, v. 65, p. 1-6, 1991.
- LANE, L.C. A general method for detecting plant viruses. pp.3-17 In: MARAMOROSCH, K. (Ed.) *Plant diseases of viral, viroid, mycoplasma and uncertain origin*. New Delhi: Oxford & IBH Publishing. 1992.
- LÉONARD, S.; PLANTE, D.; WITTMANN, S.; DAIGNEAULT, N.; FORTIN, M.G.; LALIBERTÉ, J.-F. Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *Journal of Virology*, v. 74, p. 7730-7737, 2000.

- LI, X.H.; VALDEZ, P.; OLVERA, R.E.; CARRINGTON, J.C. Functions of the tobacco etch virus RNA polymerase (NIb): subcellular transport and protein-protein interaction with VPg/proteinase (NIa). *Journal of Virology*, v. 71, p. 1598-1607, 1997.
- LIMA, J.A.A.; PURCUFFULL, D.E.; HIEBERT, E. Purification, partial characterization and serology of blackeye cowpea mosaic virus. *Phytopathology*, v. 69, p. 1252-1258, 1979.
- LOPEZ-MOYA, J.J.; PIRONE, T.P. Charge changes near the N terminus of the coat protein of two potyviruses affect virus movement. *Journal of General Virology*, v. 79, p. 161-165, 1998.
- LUCAS, W.J. Plant viral movement proteins: Agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology*, v. 344, p. 169-184, 2006.
- MAHAJAN, S.; DOLJA, V.V.; CARRINGTON, J.C. Roles of the sequence encoding tobacco etch virus capsid protein in genome amplification: Requirements for the translation process and a cis-active element. *Journal of Virology*, v. 70, p. 4370-4379, 1996.
- MAHAJAN, S.K.; CHISHOLM, S.T.; WHITHAM, S.; CARRINGTON, J.C. Identification and characterization of a locus (RTM1) in *Arabidopsis thaliana* that restricts long-distance movement of tobacco etch virus. *Plant Journal*, v. 14, p. 177-186, 1998.
- MAIA, I.G.; BERNARDI, F. Nucleic acid-binding properties of a bacterially expressed potato virus Y helper component-proteinase. *Journal of General Virology*, v. 77, p. 869-877, 1996.
- MARTÍN, M.T.; OTIN, C.L.; LAIN, S.; GARCÍA, J.A. Determination of polyprotein processing sites by amino terminal sequencing of nonstructural proteins encoded by plum pox potyvirus. *Virus Research*, v. 15, p. 97-106, 1990.
- MCKERN, N.M.; STRIKE, P.M.; BARNETT, O.W.; DIJKSTRA, J.; SHUKLA, D.D.; WARD, C.W. Cowpea aphid borne mosaic virus-Morocco and South African Passiflora virus are strains of the same potyvirus. *Archives of Virology*, v. 136, p. 207-217, 1994.
- MERITS, A.; GUO, D.; JÄRVEKÜLG, L.; SAARMA, M. Biochemical and genetic evidence for interactions between potato a potyvirus-encoded proteins P1 and P3 and proteins of the putative replication complex. *Virology*, v. 263, p. 15-22, 1999.
- MLOTSHWA, S.; VERVER, J.; SITHOLE-NIANG, I.; VAN KAMPEN, T.; VAN KAMMEN, A.; WELLINK, J. The genomic sequence of cowpea aphid-borne mosaic virus and its similarities with other potyviruses. *Archives of Virology*, v. 147, p. 1043-1052, 2002.
- MURPHY, J.F.; KLEIN, P.G.; HUNT, A.G.; SHAW, J.G. Replacement of the tyrosine residue that links a potyviral VPg to the viral RNA is lethal. *Virology*, v. 220, p. 535-538, 1996.
- NASCIMENTO, A.V.S.; SANTANA, E.N.; BRAZ, A.S.K.; ALFENAS, P.F.; PIORIBEIRO, G.; ANDRADE, G.P.; CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. *Archives of Virology*, v. 151, p. 1797-1809, 2006.

- NASCIMENTO, A.V.S.; SOUZA, A.R.R.; ALFENAS, P.F.; ANDRADE, G.P.; CARVALHO, M.G.; PIO-RIBEIRO, G.; ZERBINI, F.M. Análise filogenética de potyvírus causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Nordeste do Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 29, p. 378-383, 2004.
- NICAISE, V.; GERMAN-RETANA, S.; SANJUAN, R.; DUBRANA, M.P.; MAZIER, M.; MAISONNEUVE, B.; CANDRESSE, T.; CARANTA, C.; LEGALL, O. The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus Lettuce mosaic virus. *Plant Physiology*, v. 132, p. 1272-1282, 2003.
- NICOLAS, O.; DUNNINGTON, S.W.; GOTOW, L.F.; PIRONE, T.P.; HELLMANN, G.M. Variations in the VPg protein allow a potyvirus to overcome *va* gene resistance in tobacco. *Virology*, v. 237, p. 452-459, 1997.
- NIEPEL, M.; GALLIE, D.R. Identification and characterization of the functional elements within the *Tobacco etch virus* 5' leader required for cap-independent translation. *Journal of Virology*, v. 73, p. 9080-9088, 1999.
- NOBLE, J.R. Some observations on the woodiness or bullet disease of passionfruit. *Proceedings of the Royal Society of New South Wales*, v. 62, p. 79-98, 1928.
- OLIVEIRA, J.C.; FERREIRA, F.R. Melhoramento genético do maracujazeiro. pp.211-239 In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R.; VAZ, R.L. (Eds.) *A cultura de maracujá no Brasil*. Jaboticabal: FUNEP. 1991.
- PAALME, V.; GAMMELGARD, E.; JARVEKULG, L.; VALKONEN, J.P.T. *In vitro* recombinants of two nearly identical potyviral isolates express novel virulence and symptom phenotypes in plants. *Journal of General Virology*, v. 85, p. 739-747, 2004.
- PALANICHELVAM, K.; KUNIK, T.; CITOVSKY, V.; GAFNI, Y. The capsid protein of tomato yellow leaf curl virus binds cooperatively to single-stranded DNA. *Journal of General Virology*, v. 79, p. 2829-2833., 1998.
- PAPPU, H.R.; PAPPU, S.S.; SREENIVASULU, P. Molecular characterization and intervirial homologies of a potyvirus infecting sesame (*Sesamum indicum*) in Georgia. *Archives of Virology*, v. 142, p. 1919-1927, 1997.
- PIO-RIBEIRO, G.; PAPPU, S.S.; PAPPU, H.R.; ANDRADE, G.P.; REDDY, D.V.R. Occurrence of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* in peanut in Brazil. *Plant Disease*, v. 84, p. 760-766, 2000.
- PRUSS, G.; GE, X.; SHI, X.M.; CARRINGTON, J.C.; VANCE, V.B.; GE, X.; SHI, X.M. Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell*, v. 9, p. 859-868, 1997.
- RAJAMAKI, M.L.; KELLONIEMI, J.; ALMINAITE, A.; KEKARAINEN, T.; RABENSTEIN, F.; VALKONEN, R.P.T. A novel insertion site inside the potyvirus P1 cistron allows expression of heterologous protein and suggest some P1 functions. *Virology*, v. 342, p. 88-101, 2005.
- RESTREPO, M.A.; FREED, D.D.; CARRINGTON, J.C. Nuclear transport of plant potyviral proteins. *Plant Cell*, v. 2, p. 987-988, 1990.
- RESTREPO-HARTWIG, M.A.; CARRINGTON, J.C. Regulation of nuclear transport of a plant potyvirus protein by autoproteolysis. *Journal of Virology*, v. 66, p. 5662-5666, 1992.

- RESTREPO-HARTWIG, M.A.; CARRINGTON, J.C. The tobacco etch potyvirus 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication. *Journal of Virology*, v. 68, p. 2388-2397, 1994.
- REVERS, F.; LE GALL, O.; CANDRESSE, T.; MAULE, A.J. New advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 12, p. 367-376, 1999.
- REZENDE, J.A.M. Doenças de vírus e micoplasma do maracujazeiro no Brasil. pp.116-125 In: SÃO JOSÉ, A.R. (Ed.) Maracujá: Produção e mercado. Vitória da Conquista: UESB. 1994.
- RIECHMANN, J.L.; LAIN, S.; GARCIA, J.A. The genome-linked protein and 5' end RNA sequence of plum pox potyvirus. *Journal of General Virology*, v. 70, p. 2785-2789, 1989.
- RIECHMANN, J.L.; LAIN, S.; GARCIA, J.A. Infectious *in vitro* transcripts from a plum pox potyvirus cDNA clone. *Virology*, v. 177, p. 710-716, 1990.
- ROBAGLIA, C.; CARANTA, C. Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends in Plant Science*, v. 11, p. 40-45, 2006.
- RODRIGUEZ-CEREZO, E.; AMMAR, E.D.; PIRONE, T.P.; SHAW, J.G. Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. *Journal of General Virology*, v. 74, p. 1945-1949, 1993.
- RODRÍGUEZ-CEREZO, E.; FINDLAY, K.; SHAW, J.G.; LOMONOSSOFF, G.P.; QIU, S.G.; LINSTED, P.; SHANKS, M.; RISCO, C. The coat and cylindrical inclusion proteins of a potyvirus are associated with connections between plant cells. *Virology*, v. 236, p. 296-306, 1997.
- RODRIGUEZ-CEREZO, E.; SHAW, J.G. Two newly detected nonstructural viral proteins in potyvirus-infected cells. *Virology*, v. 185, p. 572-579, 1991.
- ROJAS, M.R.; ZERBINI, F.M.; ALLISON, R.F.; GILBERTSON, R.L.; LUCAS, W.J. Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology*, v. 237, p. 283-295, 1997.
- RUFFEL, S.; DUSSAULT, M.H.; PALLOIX, A.; MOURY, B.; BENDAHMANE, A.; ROBAGLIA, C.; CARANTA, C. A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant Journal*, v. 32, p. 1067-1075, 2002.
- SÁENZ, P.; QUIOT, L.; QUIOT, J.-B.; CANDRESSE, T.; GARCÍA, J.A. Pathogenicity determinants in the complex virus population of a *Plum pox virus* isolate. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 14, p. 278-287, 2001.
- SCHAAD, M.C.; ANDERBERG, R.J.; CARRINGTON, J.C. Strain-specific interaction of the tobacco etch virus N1a protein with the translation initiation factor eIF4E in the yeast two-hybrid system. *Virology*, v. 273, p. 300-306, 2000.
- SCHAAD, M.C.; HALDEMAN-CAHILL, R.; CRONIN, S.; CARRINGTON, J.C. Analysis of the VPg-proteinase (N1a) encoded by tobacco etch potyvirus: effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing, and genome amplification. *Journal of Virology*, v. 70, p. 7039-7048, 1996.

- SCHAAD, M.C.; JENSEN, P.E.; CARRINGTON, J.C. Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO Journal*, v. 16, p. 4049-4059, 1997a.
- SCHAAD, M.C.; LELLIS, A.D.; CARRINGTON, J.C. VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. *Journal of Virology*, v. 71, p. 8624-8631, 1997b.
- SHUKLA, D.D.; FRENKEL, M.J.; WARD, C.W. Structure and function of the potyvirus genome with special reference to the coat protein coding region. *Canadian Journal of Plant Pathology*, v. 13, p. 178-191, 1991.
- SHUKLA, D.D.; WARD, C.W.; BRUNT, A.A. *The Potyviridae*. Wallingford, UK: CAB International. 516p. 1994.
- SILVA, A.C.; SÃO JOSÉ, A.R. Classificação botânica do maracujazeiro. pp.1-5 In: SÃO JOSÉ, A.R. (Ed.) *Maracujá produção e mercado*. Vitória da Conquista: UESB. 1994.
- SIMÓN-BUELA, L.; GUO, H.S.; GARCÍA, J.A. Cap-independent *leaky scanning* as the mechanism of translation initiation of a plant viral genomic RNA. *Journal of General Virology*, v. 78, p. 2691-2699, 1997a.
- SIMÓN-BUELA, L.; GUO, H.S.; GARCÍA, J.A. Long sequence in the 5' noncoding region of plum pox virus is not necessary for viral infectivity but contribute to viral competitiveness and pathogenesis. *Virology*, v. 233, p. 157-162, 1997b.
- SITHOLE-NIANG, I.; NYATHI, T.; MAXWELL, D.P.; CANDRESSE, T. Sequence of the 3'-terminal region of a Zimbabwe isolate of cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV). *Archives of Virology*, v. 141, p. 935-943, 1996.
- SOUSA, A.E.B.A.; LIMA, J.A.A.; CAMPOS, F.A.P. Characterization of a strain of cowpea aphid-borne mosaic virus isolated from soyabean, in Ceara, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 21, p. 470-478, 1996.
- SOUZA, J.S.I.; MELETTI, L.M.M. *Maracujá: Espécies, variedades, cultivo*. Piracicaba: FEALQ: 179p. 1997.
- TAKAKI, F.; SANO, T.; YAMASHITA, K. The complete nucleotide sequence of attenuated onion yellow dwarf virus: a natural potyvirus deletion mutant lacking the N-terminal 92 amino acids of HC-Pro. *Archives of Virology*, v. 151, p. 1439-1445, 2006.
- TAYLOR, R.H.; GREBER, R.S. Passionfruit woodiness virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*, v. 122, p. 1973.
- TEAKLE, D.S.; WIDERMUTH, G.B. Host range and particle length of passionfruit woodiness virus. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences*, v. 24, p. 173-186, 1967.
- TEYCHENEY, P.Y.; AZIZ, R.; DINANT, S.; SLANKI, K.; TOURNEUR, C.; BALZS, E.; JACQUEMOND, M.; TEPFER, M. Synthesis of (-) strand RNA from the 3' untranslated region of plant viral genomes expressed in transgenic plants upon infection with related viruses. *Journal of General Virology*, v. 81, p. 1121-1126, 2000.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,

- position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, v. 22, p. 4673-4680, 1994.
- THORNBURY, D.W.; HELLMANN, G.M.; RHOADS, R.E.; PIRONE, T.P. Purification and characterization of potyvirus helper component. *Virology*, v. 114, p. 260-267, 1985.
- TRIBODET, M.; GLAIS, L.; KERLAN, C.; JACQUOT, E. Characterization of *Potato virus Y* (PVY) molecular determinants involved in the vein necrosis symptom induced by PVY^N isolates in infected *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. *Journal of General Virology*, v. 86, p. 2101-2105, 2005.
- TRINDADE, D.R.; POLTRONIERI, L.S.; ALBUQUERQUE, F.C.; REZENDE, J.A.M.; NOVAES, Q.S.D.; KIMATI, H. Ocorrência do "*Passion fruit woodiness virus*" (PWV) em maracujazais no Estado do Pará. *Fitopatologia Brasileira*, v. 24, p. 76-79, 1999.
- URCUQUI-INCHIMA, S.; HAENNI, A.L.; BERNARDI, F. Potyvirus proteins: A wealth of functions. *Virus Research*, v. 74, p. 157-175, 2001.
- URCUQUI-INCHIMA, S.; MAIA, I.G.; ARRUDA, P.; HAENNI, A.-L.; BERNARDI, F. Deletion mapping of the potyviral helper component-proteinase reveals two regions involved in RNA binding. *Virology*, v. 268, p. 104-111, 2000.
- URCUQUI-INCHIMA, S.; MAIA, I.G.; DRUGEON, G.; HAENNI, A.-L.; BERNARDI, F. Effect of mutations within the cys-rich region of potyvirus helper component-proteinase on self-interaction. *Journal of General Virology*, v. 80, p. 2809-2812, 1999.
- VARRELMANN, M.; MAISS, E. Mutations in the coat protein gene of *plum pox virus* suppress particle assembly, heterologous encapsidation and complementation in transgenic plants of *nicotiana benthamiana*. *Journal of General Virology*, v. 81, p. 567-576, 2000.
- VERCHOT, J.; CARRINGTON, J.C. Debilitation of plant potyvirus infectivity by P1 proteinase-inactivating mutations and restoration by second-site modifications. *Journal of Virology*, v. 69, p. 1582-1590, 1995a.
- VERCHOT, J.; CARRINGTON, J.C. Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in *trans* as an accessory factor for genome amplification. *Journal of Virology*, v. 69, p. 3668-3674, 1995b.
- VERCHOT, J.; KOONIN, E.V.; CARRINGTON, J.C. The 35 kDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as the third viral-encoded proteinase. *Virology*, v. 190, p. 527-535, 1991.
- WHITHAM, S.A.; ANDERBERG, R.J.; CHISHOLM, S.T.; CARRINGTON, J.C. Arabidopsis RTM2 gene is necessary for specific restriction of *Tobacco etch virus* and encodes an unusually small heat shock-like protein. *Plant Cell*, v. 12, p. 569-582, 2000.
- WITTMANN, S.; CHATEL, H.; FORTIN, M.G.; LALIBERTE, J.F. Interaction of the viral protein genome linked [proteinase] of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology*, v. 234, p. 84-92, 1997.
- WU, X.; SHAW, J.G. Evidence that assembly of a potyvirus begins near the 5' terminus of the viral RNA. *Journal of General Virology*, v. 79, p. 1525-1529, 1998.