

LINA MARCELA CORTÉS PÁEZ

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM VÍRUS  
ssDNA CIRCULAR ASSOCIADO A *Momordica charantia***

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

C828i Cortés Páez, Lina Marcela, 1988-  
2015 Isolamento, identificação e caracterização de um vírus  
ssDNA circular associado a *Momordica charantia* / Lina  
Marcela Cortés Páez. – Viçosa, MG, 2015.  
ix, 41f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Poliane Alfenas Zerbini.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.36-41.

1. Biologia molecular. 2. *Momordica charantia*. 3.  
*Gemycircularvirus*. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Microbiologia Agrícola. Programa de  
Pós-graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 583.63

LINA MARCELA CORTÉS PÁEZ

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM VÍRUS  
ssDNA CIRCULAR ASSOCIADO A *Momordica charantia***

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

APROVADA: 19 de Março de 2015.

---

Cynthia Canêdo da Silva

---

Márcio Tadeu Godinho

---

Poliane Alfenas Zerbini  
(Orientadora)

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Arcenio Cortés e Nohora Páez pelo amor, apoio incondicional, incentivo, compreensão e dedicação em todos os momentos da minha vida;

Aos meus irmãos, Eliana Cortés pela assessoria, amizade e conversas trocadas e Luis Cortés por seu carinho;

Ao meu lindo amor Manuel pelo apoio incondicional para não sentir as saudades de estar fora de casa e não desistir de cumprir meus objetivos, pela ajuda na distância de temas que não entendia mas dava um jeito de fazer, a ele devo o que sou agora;

Aos meus amigos na distância Diana, Vanessa, Oscar, Lina, Osquitar, Patricia, Cindy e Milena, pela, amizade de sempre e a companhia através dos bate-papos;

Aos meus amigos Colombo-Brasil, Diana, César, Diego M, Álvaro, Karen, Lucia e Sérgio pela amizade, apoio e fazer mudar o dia de intenso trabalho por momentos de risadas;

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade de realização deste curso;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão de bolsa de estudos;

À Professora Poliane Alfenas Zerbini, pela oportunidade de crescimento profissional, pela valiosa orientação, dedicação e amizade durante a realização deste trabalho;

Aos professores e funcionários que fazem parte do Departamento de Microbiologia Agrícola, em especial a minha secretaria Nilcéa pela paciência, atenção e amizade;

A meu grupo incondicional de trabalho, “Profê” André, Lalai, Fer, Flavinha, Anilla e Fernandinha pela amizade, conselhos, ensinamentos, agradável ambiente de trabalho, paciência e constante apoio em todos os momentos;

Aos meus amigos do LVVM, em especial a Talita, Osvaldo, César, Marcos, João e Cleysinho pelo apoio e ensinamentos no momento certo,

Aos amigos “Barra pesada” do Departamento de Microbiologia Agrícola, pela cumplicidade, momentos de folga, discussões científicas, amizade, ensinamentos do idioma português e acompanhamento de momentos únicos,

Às amigas de casa pelas conversas, experiências culinárias, risadas e amizade;

Aos funcionários do Bioagro, Paulo (autoclave), Emilia, Danilo e Paulo (portaria) pelo apoio para a realização deste trabalho e à amizade durante este tempo;

A todos os que ajudaram e apoiaram durante estes anos e contribuíram direta ou indiretamente . . .

## **BIOGRAFIA**

LINA MARCELA de Janeiro de 1988 em CORTÉS PÁEZ, filha de Arcenio Cortés e Nohora Páez, nasceu em 20 Bogotá, Colômbia. Em 2005 iniciou o curso de Licenciatura em Biologia na Universidade Pedagógica Nacional de Bogotá, vindo a graduar-se em dezembro de 2010. Em Abril de 2013 ingressou no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	viii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
2.1 Diversidade dos vírus de DNA fita simples (ssDNA).....	3
2.2 Classificação dos vírus DNA fita simples.....	4
2.3 Gemycircularvirus.....	6
2.3.1 Organização do genoma de Gemycircularvirus.....	6
2.3.2 Diversidade de Gemycircularvirus em amostras ambientais.....	8
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	14
3.1 Isolados virais da planta <i>Momordica charantia</i> .....	14
3.2 Clonagem do genoma viral.....	14
3.3 Análise das sequências.....	14
3.4 Construção do clone infeccioso.....	16
3.5 Determinação da gama de hospedeiros.....	16
3.5.1 Inoculação em planta.....	16
3.5.2 Inoculação em <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	17
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	19
4.1 Amplificação e clonagem do DNA viral.....	19
4.2 Caracterização de um novo gemycircularvirus infectando <i>Momordica charantia</i> ....	20
4.3 Análises filogenética da sequência genômica de MCasCV.....	23
4.4 Motivos conservados na proteína Rep de MCasCV.....	26
4.5 Origem de replicação.....	27
4.6 Determinação da gama de hospedeiros de MCasCV.....	28
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	35
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	36

## RESUMO

PÁEZ, Lina Marcela Cortés, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, Março de 2015. **Isolamento, identificação e caracterização de um vírus ssDNA circular associado a *Momordica charantia***. Orientadora: Poliane Alfenas Zerbini. Coorientador: Francisco Murilo Zerbini.

Vírus que possuem genoma constituído por DNA fita simples (ssDNA) estão amplamente distribuídos na natureza. As constantes descobertas aliadas à grande diversidade genética desses vírus têm ampliado a compreensão sobre a trajetória evolutiva desse grupo. No Brasil, os vírus DNA fita simples circular causam grandes perdas nas culturas de importância agrícola. Um dos fatores que contribuiu fortemente para o desastre econômico é a transmissão de vírus, onde o maior hospedeiro deles são as plantas não cultivadas. Desde então, diversos trabalhos têm sido publicados tratando de assuntos como diversidade, caracterização, determinação da gama de hospedeiros, interações entre planta e patógeno assim como patógeno e vetor, evolução, predominância, epidemiologia, dentre outros. O presente trabalho teve como objetivo isolar, identificar e caracteriza um novo vírus de ssDNA associado a Melão de São Caetano (*Momordica charantia*), uma cucurbitácea não cultivada e potencialmente invasiva em cultivos agrícolas no Brasil. A amostra foi coletada em Coimbra, MG-Brasil, com suspeita de ter um vírus da família *Geminiviridae* por apresentar sintomas de mosaico amarelo. O DNA vegetal foi extraído e analisado através da técnica de amplificação por círculo rolante, os produtos da clivagem com enzimas de restrição foram clonados e completamente sequenciados. A análise das sequências indicou que o vírus tinha um tamanho de 2195 pares de bases e uma organização genômica que apresentava três proteínas: uma codificando o capsídeo do vírus (CP) e duas relacionada com a replicação (Rep) separadas por um íntron, que a ser removido por inspeção manual codifica a proteína completa. Essa organização em conjunto com as análises do genoma completo mostraram uma identidade com vários isolados do gênero *Gemycircularvirus*, sendo proposto para esse novo vírus o nome de *Momordica charantia associated circular DNA virus* (MCasCV). Interessantemente, MCasCV tem uma característica única dentro dos novos ssDNA: um nonanucleotídeo (5'-TAATGTTAT-3') similar ao *Hypericum japonicum associated circular DNA virus* (HJasCV), com uma formação de um grampo ou “stem-loop” atípico pela ligação de três pares de base encontradas na estrutura. Com o objetivo de caracterizar a biologia do vírus MCasCV foram infectadas plantas de *M. charantia* e o fungo *Sclerotinia*

*sclerotiorum*. Para isso, plantas foram bombardeadas com partículas do clone infeccioso de MCasCV e se observou após 21 dias que não apresentaram sintomas visíveis. A confirmação da presença viral foi realizada pelas técnicas de RCA e PCR obtendo um resultado negativo. Para inoculação do vírus em *Sclerotinia sclerotiorum*, foram transfectados protoplastos desse fungo junto ao clone infeccioso, após o crescimento foi realizada uma extração de DNA total, seguida da confirmação por PCR e RCA, que ao igual da planta os resultados foram negativos. Fatos que podem explicar esse resultado é a ocorrência de falhas no processo de transfecção, ou a não capacidade do vírus de replicar no interior do fungo utilizado. Novas análises de infectividade deverão ser realizadas para a confirmação do hospedeiro do vírus MCasCV.

## ABSTRACT

PÁEZ, Lina Marcela Cortés, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, March 2015. **Isolation, identification and characterization of single-stranded circular DNA virus associated to *Momordica charantia* (MCasCV).** Adviser: Poliane Alfenas Zerbini. Co-Adviser: Francisco Murilo Zerbini Júnior.

Viruses that have genomes composed of single-stranded DNA (ssDNA) have been widespread in nature. Continuous discoveries combined with the high genetic diversity of these viruses have led our understanding of the historical evolution of this group. In Brazil, the circular single-stranded DNA viruses have caused enormous agricultural losses in staple crops. One factor that strongly contributed to the financial disaster is the transmission of the virus, where the most of the hosts are non-cultivated plants. Since then, several studies have been published, addressing issues such as diversity, characterization, determining the host range and interactions between plant and pathogen as well as pathogen and vector, evolution, prevalence, epidemiology, among others. This study aimed to isolate, identify and features a new virus ssDNA associated with Melon de São Caetano (*Momordica charantia*), one cucurbit uncultivated and potentially invasive in agricultural crops in Brazil. The sample was collected in Coimbra, MG, Brazil, suspected of having a virus Geminiviridae family for symptoms of yellow mosaic. The plant DNA was extracted and analyzed by the technique of rolling circle amplification, the products of cleavage with restriction enzymes have been cloned and completely sequenced. Sequence analysis indicated that the virus had a size of 2195 base pairs and a genomic organization that showed three proteins: one encoding the virus capsid (CP) and two related replication (Rep) separated by an intron, then it was removed by manual inspection to encoding the complete protein. This arrangement in conjunction with the analysis of complete genome showed an identity with several strains of genus Gemycircularvirus, it has been proposed to name this new virus from *Momordica charantia* associated circular DNA virus (MCasCV). Interestingly, MCasCV has a unique feature within the new ssDNA: A nonanucleotídeo (TAATGTTAT 5'-3') similar to the circular DNA *Hypericum japonicum* associated virus (HJasCV), with a formation of a staple or "stem-loop" atypical for binding three base pairs found in the structure. With the objective of characterizing the biology of the virus MCasCV *M. charantia* plants were infected and *Sclerotinia sclerotiorum*. For this, plants were bombarded with particles of the infectious clone MCasCV and were observed during 21 days, after that interval of time no showed visible symptoms. Confirmation of viral

presence was made by RCA and PCR getting a negative result. For virus inoculation of *Sclerotinia sclerotiorum*, this fungus protoplasts were transfected with the infectious clone, after growing a total DNA extraction was performed, followed by PCR and confirmed by RCA, again the results were negative. Facts that can explain this result is the occurrence of failures in the transfection process, or no ability of the virus to replicate inside the fungus used. New analysis of infectivity should be performed to confirm the MCasCV in the virus host.

## 1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos últimos 50 anos, os vírus das plantas têm sido responsáveis por um número muito grande de doenças em culturas economicamente importantes, impactando significativamente a produção agrícola, sendo uma grande ameaça para a segurança alimentar da população nos países em desenvolvimento das regiões tropicais e subtropicais do mundo (Rey et al., 2012; Rybicki and Pietersen, 1999). Existe duas famílias de vírus DNA fita simples circular (ssDNA) que infectam plantas: *Geminiviridae* e *Nanoviridae*. Até agora os estudos realizados são centralizados em vírus que infectam culturas de importância econômica como: feijão, algodão, mandioca, curcubitáceas, milho, pimenta e tomate; mas pouco se sabe sobre os vírus que infectam plantas não cultivadas, sendo um reservatório genético com implicações diretas na evolução dos vírus, conseguindo ser transmitidos por diferentes tipos de vetor para as plantas cultivadas (Castillo-Urquiza, 2007; Wren et al., 2006).

Acreditava-se que os genomas circulares infectavam um número determinado de hospedeiros e tinham distribuições ambientais restritas, entretanto, durante os últimos 5 anos, estudos de metagenômica de amostras ambientais de origens diferentes, combinado com a utilização da técnica de amplificação de genomas circulares utilizando-se a enzima phi29 desafiaram essa visão, sugerindo a presença de outras famílias de vírus de ssDNA. Não obstante, a escassez de informação sobre aspectos biológicos destes vírus, bem como do número reduzido de sequências é difícil fazer uma classificação adequada, por enquanto, para agrupar esses novos vírus ssDNA circular foi proposto o nome de gemycircularvirus, devido as semelhanças com a família *Geminiviridae* e pelo primeiro isolado ser descoberto no fungo. Atualmente, foi identificado estes vírus em hospedeiros previamente desconhecidos em uma ampla diversidade de amostras como fezes, esgoto, insetos e plantas (Rosario et al., 2012a).

O primeiro Gemycircularvirus identificado foi o *Sclerotinea sclerotiorum hypovirulence associated DNA virus - 1* (SsHADV-1), isolado do fungo *Sclerotinia sclerotium* que apresentava uma baixa virulência deste na planta. Por meio de uma microscopia eletrônica de barrido, foi possível visualizar a presença de partículas icosaédricas que encapsidam um genoma de 2166 nucleotídeos (nt) (Yu et al., 2010).

Depois desse primeiro relato, vários vírus de ssDNA com organização genômica semelhante ao SsHADV-1 foram descobertas em amostras de diversos ambientes. Em plantas, foram descritos dois gemycircularvírus, um em *Cassava* e outro em *Hypericum japonicum* sendo denominado *Cassava associated circular DNA virus* (CasCV) com um tamanho de 2220 nt e *Hypericum japonicum associated circular DNA virus* (HJasCV) com 2200 nt, respectivamente (Dayaram et al., 2012; Du et al., 2014).

A proteína de replicação (Rep) dos gemycircularvirus apresenta cinco motivos conservados relacionados com a replicação por círculo rolante (RCR) que também são identificados na Rep de geminivirus, circovirus e nanovirus (Ilyina and Koonin, 1992; Koonin and Ilyina, 1992). Na região intergênica, está localizado a origem de replicação, identificada por uma estrutura em forma de grampo ou “*stem-loop*” e uma sequência nonanucleotídeo conservada, essencial para iniciar a replicação nos gemycircularvirus (Du et al., 2014).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo isolar, identificar e caracterizar um novo gemycircularvirus encontrado em plantas de *Momordica charantia* para ampliar o conhecimento destes vírus na infecção de plantas não cultivadas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Diversidade dos vírus de DNA fita simples (ssDNA)

Estudos ecogenômicos demonstram que os vírus são organismos mais abundantes do planeta, com número total de vírions excedendo o número de células em pelo menos uma ordem de grandeza (Edwards and Rohwer, 2005). A onipresença dos vírus garante dinamismo aos mais diversos ecossistemas, onde atuam sobretudo, como veículos de transferência genética, sendo importantes moduladores da evolução dos organismos presentes nos três domínios da vida (Breitbart and Rohwer, 2005; Sano et al., 2004). No extenso grupo dos vírus, os que possuem molécula(s) de DNA fita simples, estão entre os menores quanto ao tamanho das partículas e do genoma. A diversidade desse grupo tem sido subestimada, porém, estudos recentes mostram que esse grupo de vírus é bem mais diverso do que se pensava (Du et al., 2014; Kimura and Tomaru, 2015; Ng et al., 2014; Sikorski et al., 2013a).

Nos últimos anos, análises metagenômicas sugerem que menos de 1% da diversidade dos vírus foi amostrada, sendo a maioria dos vírus recém-descobertos distantemente relacionados a membros já descritos. Adicionalmente, cerca de 60-99% dos meta-dados genômicos constituem-se em sequências que não apresentam identidade com os vírus conhecidos (Mokili et al., 2012).

Novos vírus de ssDNA circular estão sendo descobertos em ambientes até então poucos explorados, tais como esgoto, soro e excrementos de vários animais (Kraberger et al., 2013; Lamberto et al., 2014; Sikorski et al., 2013b). Parte significativa do material genético destes vírus codifica proteínas que compartilham baixo, mas significativos, graus de similaridade com as codificadas pelos vírus ssDNA circular nas famílias *Geminiviridae*, *Circoviridae* e *Nanoviridae*. Desta forma, foi proposto que esses novos vírus de ssDNA são semelhantes, mas que deveriam pertencer a um novo gênero, provisoriamente chamado Gemycircularvirus (Rosario et al., 2012b). Embora não se sabe as espécies hospedeiras da maioria desses vírus, o seu número e diversidade são indícios de que apresentam uma significância ecológica em diferentes ecossistemas (Sikorski et al., 2013b).

## 2.2 Classificação dos vírus DNA fita simples

Atualmente o “*International Committee on Taxonomy of Viruses*” (ICTV) reconhece nove famílias de vírus com genoma de ssDNA (*Anelloviridae*, *Circoviridae*, *Geminiviridae*, *Inoviridae*, *Microviridae*, *Nanoviridae*, *Parvoviridae*, *Bidnaviridae* e *Spiraviridae*) (Sikorski, 2013). Nos últimos anos, foram descritos diversos vírus com genoma de DNA fita simples circular que não apresentam características suficientes para serem classificados em uma destas famílias sendo classificadas como *Gemycircularvirus* (Krupovic and Forterre, 2015). O nome faz referência às características compartilhadas com a família *Geminiviridae* e ser isolado por primeira vez no fungo.

A maioria dos ssDNA têm capsídeo, sem envelope e com simetria icosaédrica, com exceção da morfologia de alguns vírus de ssDNA que infectam procariotos que possuem partículas filamentosas (gênero *Inovirus*), forma de haste (gênero *Plectrovirus*), forma de bobina (família *Spiraviridae*) e pleomórficos (família *Pleolipoviridae*) (Krupovic and Forterre, 2015).

Os ssDNA são considerados entre os vírus pequenos até agora conhecidos. Seus genomas possuem entre 1-2 kb e codificar só duas proteínas, uma para formação do capsídeo e outra necessária para a replicação do genoma. Duas funções indispensáveis codificadas por todos os vírus com uma fase extracelular em seus ciclos de vida (Krupovic and Bamford, 2010). Tal simplicidade dos ssDNA os torna um modelo atraente para estudar a origem e evolução dos vírus (Krupovic, 2013). Vírus ssDNA que infectam eucariotos tendem a possuir genomas pequenos (<10 kb), quando comparado com os seus homólogos de bactérias e arquea. Este último pode conter genomas de até 25 kb (Krupovic, 2013) (Tabela 1).

A maioria dos vírus ssDNA possuem genoma circular que inclui *Anelloviridae*, *Circoviridae*, *Inoviridae*, *Microviridae*, *Nanoviridae* e *Geminiviridae* (King et al., 2011). Esses vírus têm diversas organizações genômicas, entretanto a proteína associada à replicação (Rep) apresenta motivos conservados que indicam semelhanças na forma de replicação por círculo rolante (RCR) (Cotmore and Tattersall, 1996; Tattersall and Ward, 1976).

**Tabela 1.** Visão geral dos vírus ssDNA e suas possibilidades de integração. Reproduzido por Krupovic and Forterre (2015).

Host Virus taxon	Virion morphology	Genome topology	Genome size (kb)	Replication protein	Recombinase	Genome integration
<b>Bacteria</b>						
<i>Microviridae</i>	Icosahedral	Circular	4.4–6.1	RC-Rep	Host XerC/D (?)	+
<i>Inoviridae</i>		Circular			Host XerC/D, Ser/Tyr Int or DDE TPase	+
<i>Inovirus</i>	Filamentous		5.8–12.4	RC-Rep		
<i>Plectrovirus</i>	Rod-shaped		4.5–8.2	RC-Rep or DDE TPase		
<b>Archaea</b>						
<i>Pleolipoviridae</i> <sup>a</sup>	Pleomorphic	Circular (ss or ds)	7–10.6	RC-Rep	Tyr Int	+
<i>Spiraviridae</i>	Coil-shaped	Circular	24.9	unknown	Tyr Int	NR
<b>Eukarya</b>						
<i>Anelloviridae</i>	Icosahedral	Circular	2–4	RC-Rep (TBC)	–	NR
<i>Bidnaviridae</i>	Icosahedral	Linear, seg- mented, TIR	6–6.5 per segment	DNA Pol B	–	NR
<i>Circoviridae</i>	Icosahedral	Circular	1.7–2.3	RC-Rep	–	+
<i>Geminiviridae</i>	Icosahedral (geminate)	Circular, segmented	2.5–3 per segment	RC-Rep	–	+
<i>Nanoviridae</i>	Icosahedral	Circular, segmented	0.98–1.1 per segment	RC-Rep	–	+
<i>Parvoviridae</i>	Icosahedral	Linear, TIR	4–6.3	RC-Rep	–	+
<i>Bacilladnavirus</i>	Icosahedral	Circular, partially ds	5.8–6	RC-Rep	–	NR
<i>Gemycircularvirus</i> <sup>a</sup>	Icosahedral	Circular	2.2	RC-Rep	–	+

ss, single-stranded; ds, double-stranded; TBC, to be confirmed; NR, not reported; TIR, terminal inverted repeats; Ser/Tyr Int, serine or tyrosine integrase; TPase, transposase.

<sup>a</sup>Taxa not approved by the International Committee on Taxonomy of Viruses.

**Fonte:** Reproduzido de Krupovic and Forterre (2015).

Baseado na organização genômica, orientação da transcrição e estruturas conservadas, tais como o elemento em forma de “*stem-loop*”, que contém o motivo nonanucleotídeo e no número de sequências abertas de leituras (ORFs), os vírus de ssDNA eucarióticos têm sido classificados em oito tipos (Rosario, 2009).

## 2.3 Gemycircularvirus

### 2.3.1 Organização do genoma de Gemycircularvirus

Os Gemycircularvirus são vírus de ssDNA ainda não classificados em uma família ou gênero que infectam eucariotos. O primeiro gemycircularvirus descrito foi o *Sclerotinia sclerotiorum hypovirulence associated circular DNA virus 1* (SsHADV-1), isolado a partir do fungo, *Sclerotinia sclerotiorum*, causando o fenótipo de hipovirulência no fungo. Análises da sequência do genoma mostrou a presença de duas grandes ORFs, uma capaz de codificar a proteína capsidial (CP), localizada na fita viral, e outra que codifica a proteína de iniciação da replicação (Rep) localizada na fita complementar, com a presença dos domínios conservados mesmos encontrados na proteína Rep na família *Geminiviridae* (Yu et al., 2010).

Outros genomas virais de ssDNA fita simples circular relacionados com SsHADV-1, foram recuperados a partir de amostras de fezes de animais (Sikorski et al., 2013b; van den Brand et al., 2012), libélulas, mosquitos (Ng et al., 2011b; Rosario et al., 2012b) soro bovino e humano (Lamberto et al., 2014) e material vegetal (Dayaram et al., 2012 e Du et al., 2014). Com exceção do primeiro isolado SsHADV-1, a maioria dos gemycircularvirus tem um genoma constituído por três fases abertas de leitura, sendo que na fita viral encontra-se a proteína capsidial (CP), e na fita complementar dois fragmentos da proteína Rep (Du et al., 2014), separadas por um íntron de aproximadamente 166 a 226 nucleotídeos (Kraberger et al., 2015), semelhante à encontrada nos *Mastrevirus* do gênero *Geminiviridae* (Dekker et al., 1991; Gutierrez, 1999; Mullineaux et al., 1990; Schalk et al., 1989; Wright et al., 1997).

A Rep dos vírus de ssDNA que replicam n por círculo rolante possui motivos conservados que podem ser utilizados em análises filogenéticas, e para inferências sobre a infectividade do vírus analisado. No domínio N-terminal da Rep encontra-se o motivo I (12-16 aminoácidos), que está envolvido no reconhecimento e na ligação das sequências associadas aos iterons e origem de replicação em geminivírus; o motivo II (50-56 aminoácidos), está envolvido na coordenação da ligação do metal bivalente (íons  $Mg^{+2}$  ou  $Mn^{+2}$ ) que são necessários para a reação de clivagem em circovírus, nanoviruses e geminivírus,

e o motivo III (91-95 aminoácidos), que contém um resíduo de tirosina que é essencial para a clivagem e atribui a forma covalente na extremidade 5' do DNA clivado (Du et al., 2014). O domínio N-terminal da proteína Rep catalisa a ligação das novas fitas após a replicação (Laufs et al., 1995a).

Várias Rep de pequenos DNA e RNA virais tem semelhanças às Reps dos ssDNA que foram classificadas na superfamília helicase SF3 com base na identidade de sequência (Gorbalenya et al., 1990; Walker et al., 1982). As helicases desnaturam o DNA pela desestabilização das ligações de hidrogênio entre os pares de bases da fita dupla, que são desenroladas para dar início à síntese de uma nova fita, dependente à reação da energia adquirida através de 5'-trifosfatos de nucleósido (NTP) de ligação e hidrólise (Gorbalenya et al., 1990; Ilyina and Koonin, 1992).

A superfamília SF3 é caracterizada por três principais motivos conservados de sequências de aminoácidos, que contém um complexo de síntese de NTP compartilhado entre todas as helicases. Encontra-se numa pequena extensão de 120 nucleotídeos ao longo da proteína (Gorbalenya et al., 1990). Estes motivos conservados são Walker-A [GxxxxGK (S / T)], Walker-B [hxxh (D / E) (D / E)] (Walker et al., 1982), e o motivo C [h (T / S / x) (T / S / x) N] (Gorbalenya et al., 1990). Os domínios de helicase, Walker-A e Walker-B, foram inicialmente identificados em enzimas que necessitam de ATP (Walker et al., 1982). Walker-A faz parte do motivo *P-loop* que é utilizado para o reconhecimento do ATP (Walker et al., 1982). O motivo C está localizado na extremidade C-terminal da proteína Rep (Koonin, 1993; Yoon-Robarts et al., 2004).

O quarto motivo denominado GRS (*Geminivirus Rep Sequence*) encontrado nos gemycircularvirus é único, quando comparada com os geminivírus. Localizado-se entre os motivos II e III, é necessário para a iniciação da replicação geminiviral. O domínio GRS conservado é uma característica essencial de uma antiga linhagem de iniciadores círculo rolante, o que apoia a ideia de que geminivírus podem ter evoluído a partir de plasmídeos associados com fitoplasma ou algas (Delwart and Li, 2012; Nash et al., 2011).

O “*stem-loop*” ou grampo localizado na região intergênica de aproximadamente 30 nucleotídeos, está formado por um nonanucleotídeo ou sequência nanométrica repetida e invertida, chamada de SCE (“*structurally-conserved*

*element*”) (van den Brand et al., 2012). Foi reconhecido como uma estrutura fundamental para iniciar a replicação, como o sítio de clivagem do DNA pela proteína associada à replicação (Orozco and Hanley-Bowdoin, 1998), análoga às encontradas na origem de replicação dos gêneros geminivírus, circovírus, nanovirus (Rosario et al., 2012a). No entanto, entre os gêneros pode acontecer mudanças em algum nucleotídeo que conforma o nonanucleotídeo. Para geminivírus, tem sido demonstrado que as alterações no motivo nonanucleotídeo pode não inibir a reação de clivagem entre as posições 7 e 8, mas podem alterar a eficiência da reação (Laufs et al., 1995b). No entanto, alterações na posição número 9 ("C") sequência nanométrica foram relatados como mais sensível, reduzindo significativamente a eficiência de clivagem. No entanto, o nonanucleotídeo encontrado nos gemycircularvirus, exceto *Meles meles* vírus fecal (MmFV), exibem uma diferença na posição 9 com relação ao nonanucleotídeo do SsHADV-1 (TAATATTAT).

O único gemycircularvírus com hospedeiro descrito até o momento é o SsHADV-1, que infecta o fungo *S. sclerotiorum* (Yu et al., 2010). Estudos recentes demonstraram que o fungo é susceptível a infecção por inoculação extracelular de SsHADV-1 e que os virions são estáveis durante longos períodos de tempo. No entanto, é provável que tenha uma gama de hospedeiros limitada (SsHADV-1 infecta duas espécies, *Sclerotinia minor* e *Sclerotinia nivali*), ensaios de infectividade em plantas demonstram claramente que SsHADV-1 era incapaz de infectar e se mover em células vegetais (Yu et al., 2013).

### 2.3.2 Diversidade de Gemycircularvirus em amostras ambientais

A técnica de amplificação por círculo rolante (RCA) juntamente com análises de metagenômica viral, tais como sequenciamento “shotgun” e purificação de partículas virais, tornaram possível detectar e descobrir uma grande variedade de espécies virais e gêneros previamente desconhecidas (Delwart and Li, 2012; Ng et al., 2011a; Ng et al., 2009). Dayaram et al. (2012) durante testes de rotina para geminivírus, descobriu um genoma viral de duas das quatro amostras de folhas de mandioca coletadas em Ghana. A extração do DNA vegetal foi amplificado pela polimerase phi29, digerida com enzimas de restrição, depois de obter o resultado de

sequenciamento foram desenhados primers “*back-to-back*” para amplificar a sequência total de 2,220 pb. Uma análise do genoma viral completo revelou que o isolado está mais estreitamente relacionado com o vírus SsHADV-1 com identidade máxima de 71% do genoma, também se encontra um homólogo a uma sequência de ssDNA circular detectado durante análises metagenômicos de DNA circulares associados com os mosquitos (Ng et al., 2011b). Devido a sua organização genômica semelhante à do circovírus, mas que provavelmente expressa uma Rep, como alguns geminivírus, é traduzida a partir de um mRNA “*splicing*”, foi proposto o nome de *Cassava associated DNA circular virus* (CasCV) (Dayaram et al., 2012).

Outra descoberta de um novo ssDNA ocorreu em plantas de *Hypericum japonicum* que apresentavam sintomas de mosaico amarelo coletadas em Binh Dinh Province, Vietnam. O DNA vegetal foi extraído a partir da amostra e amplificado pela polimerase phi29 para recuperar o genoma de uma suspeita de begomovírus. A digestão com enzimas de restrição originou um fragmento de DNA de 2.200 nucleotídeos, o qual foi clonado e sequenciado por primer “*walking*” (Du et al., 2014). Inesperadamente, a análise dos “*contigs*” revelou semelhanças com a sequência de DfasCV-2, um vírus que faz parte do gênero proposto como Gemycircularvirus. Esse novo vírus foi nomeado de *Hypericum japonicum associated DNA circular virus* (HJasCV) (Rosario et al., 2012b).

Rosário a revelado novos vírus ssDNA em uma grande variedade de amostras. No 2009, conjuntos de dados de sequenciamento de metagenômica águas costeiras da Colúmbia Britânica e da água do oceano aberto do mar dos Sargaços (Angly et al., 2006), tratamento de águas residuais (Rosario et al., 2009b), e água estuarina da Chesapeake Bay (Rosario, 2009) continham sequências com semelhanças aos circovírus, nanoviruses e geminivírus. Além disso, os potenciais genomas circulares completos que foram montados a partir de sequências verificadas por PCR. Nem todas as sequências foram verificadas, possivelmente pela formação de quimeras (Rosario, 2009) ou híbridos de sequências parentais diferentes que são sequências contíguas falsas (Kunin et al., 2008). Dez novos genomas de ssDNA foram caracterizados com várias organizações do genoma, tais como diferenças na orientação das ORFs e o número de ORFs pertencentes à Rep (Rosario et al., 2009a).

Utilizando libélulas, Rosario et al. (2011) isolou vírus ssDNA incorporando a técnica de amplificação de ssDNA pela polimerase phi29 com hexâmeros aleatórios e fragmentou o DNA viral antes de clonagem e sequenciamento. Essa descoberta revela que os invertebrados estão no alto da acumulação de uma grande diversidade viral do ambiente, devido a sua dependência às fontes de alimentação e escala da mobilidade. Os vinte e um novos genomas ssDNA virais compartilharam > 95% de identidade com aminoácidos dos cyclovirus, os quais foram isolados a partir de 12 espécimes da libélula do Reino de Tonga (Rosario et al., 2011). Em um estudo de acompanhamento por Rosario et al. (2012a), 17 novos vírus ssDNA foram descobertos a partir do tecido de libélulas coletados a partir de uma variedade de locais, incluindo Tonga, Porto Rico, Florida e Florida Keys, EUA, Bulgária, Áustria, Finlândia, Hungria, Alemanha e Finlândia. A maioria dos novos vírus ssDNA descobertos estavam determinados a ser cycloviruses (Rosario et al., 2012a) devido a que três dos novos isolados teve similaridade com a Rep dos circovirus, mas as organizações do genoma de cycloviruses e circovirus eram diferentes (Rosario et al., 2012a). Outros três isolados tinham semelhança com a Rep dos geminivirus, mas a organização genômica e os motivos do nonanucleotídeo eram do mycovirus SsHADV-1 (Rosario et al., 2012c; Yu et al., 2010). Com a descoberta desses novos vírus ssDNA foi proposto um novo gênero a ser nomeado Gemycircularvirus (Rosario et al., 2012a).

Análises de amostragem ambiental podem ter o potencial para economizar tempo e recursos de laboratório na descoberta de possíveis viroses que ainda não se encontra em estado de infecção. Por exemplo, duas novas moléculas de vírus que infectam plantas (um mastrevirus e um alphasatellite) foram descobertos em libélulas no Porto Rico, e eles ainda não haviam aparecido nas amostras de tecido de 60 plantas testados da mesma região (Rosario et al., 2013). As descobertas foram particularmente notáveis desde o isolamento de alphasatellite que provavelmente representa uma nova linhagem no Novo Mundo, enquanto o isolado mastrevirus altamente divergente foi um dos dois únicos mastreviruses encontrados no Novo Mundo. A principal desvantagem da amostragem de invertebrados é que não revela a fonte da infecção (Rosario et al., 2013).

A maioria das sequências de nucleotídeos observadas em moscas brancas mostrou identidade com geminivirus conhecidos (Ng et al., 2011a). Em amostras de

mosquito (Ng et al., 2011b) foi observado que as sequências eram relacionadas com animais, plantas e fagos, a maioria das sequências representam provavelmente novos genomas (Ng et al., 2011b). Dois dos novos vírus de ssDNA circulares tinham uma estrutura de genoma original, uma das quais foi mostrado para o grupo com outros putativos gemycircularviruses através de análise filogenética (Rosario et al., 2012a). Também nos estudos realizados por Dayaram et al. (2013) e Dunlap et al. (2013), foram isolados vírus no tecido de invertebrados aquáticos, um novo vírus de ssDNA com sequência similar de Rep bacterianas foi descoberto no molusco do estuário Avon-Heathcote em Christchurch (Nova Zelândia) (Dayaram et al., 2013). Dois novos vírus circovírus-like foram isolados de copépodes, um tipo de mesozooplâncton, de Tampa Bay, Florida, usando a amplificação pela polimerase phi29 com hexâmeros aleatórios e fragmentando DNA viral antes de clonagem e sequenciamento (Dunlap et al., 2013).

Cantalupo et al. (2011) realizou análise de metagenômica em amostras de esgoto, encontrando 897.647 de reads de alta qualidade. A maior proporção de 596.146 da sequência adquirida estava determinada a ser uma novidade, enquanto a segunda maior proporção de reads (37.917) foram bacteriófago, e a menor proporção (8491) foram os vírus eucarióticos. Estudo da mesma autoria também foi realizado em amostras de esgoto de cidades urbanas: Barcelona, (Espanha); Pittsburgh, Pensilvânia (Estados Unidos); e Addis Abeba, (Etiópia) (Cantalupo et al, 2011.); e outro estudo semelhante: Maiduguri (Nigéria); San Francisco, Califórnia (Estados Unidos); Bangkok (Tailândia); e Kathmandu, Nepal (Ng et al., 2012). Ambos estudos revelaram uma diversidade de vírus incluindo as de famílias ssDNA, famílias dsDNA, famílias (+) ssRNA, e as famílias de dsRNA, como novos genomas que poderiam representar novas famílias e novos gêneros. Especificamente, em Ng et al. (2012) foram identificados novos genomas ssDNA circulares com algumas semelhanças com os membros da Geminiviridae: Nimivirus, Niminivirus e Baminivirus.

Amostragem fecal é um grande reservatório viral de animais por ter o benefício de uma vida mais longa e um alvo mais amplo, similar ao demonstrados nos estudos com invertebrados. Além disso, a possibilidade de descoberta vai desde o acúmulo viral animal e os encontrados na matéria fecal por causa dos organismos oportunistas que nele habitam. Isso inclui as bactérias, protozoários, fungos e assim

como larvas de insetos e outros invertebrados dependendo de quanto tempo o material fecal foi coletado (Delwart and Li, 2012). Esse tipo de amostra também é ideal por ter uma aproximação de baixo impacto para investigar a diversidade viral de um ambiente por ser não-invasivo. Outras abordagens de descoberta usaram reservatórios virais menores, como amostras de insetos ou moluscos, exigindo a remoção de todo o organismo a partir do ambiente, enquanto amostragem animal não faz. Em contraste com as amostras de tecido animal ou de soro, a amostragem fecal não requer manipulação de animais e as amostras podem ser recuperados em qualquer momento. Esse tipo de amostras foi usado para a descoberta de diversos vírus, especificamente os novos vírus de ssDNA isolados a partir de fezes de chimpanzé (Phan et al., 2011) (Blinkova et al., 2010; Li et al., 2010a), bovinos (Kim et al., 2012), roedores, morcegos (Ge et al., 2011; Li et al., 2010b), texugo e marta (van den Brand et al., 2012) e de suínos (Sachsenroder et al., 2012; Shan et al., 2011).

Os relatos anteriores demonstraram que novos vírus ssDNA podem ser isolados a partir de uma variedade de amostras, utilizando técnicas específicas de sequenciamento ou independentes de sequenciamento. No entanto, técnicas como PCR com primers específicos é limitada em sua capacidade de descobrir novos vírus ssDNA altamente divergentes, porque exige conhecimento da sequência prévia para o desenho dos primers. Apesar disso, a forma de PCR inverso é essencial para a verificação da sequência do genoma completo. Contudo, a maioria das novas descobertas de vírus ssDNA foram por meio das técnicas: amplificação por círculo rolante (RCA), clivagem com enzimas de restrição, clonagem e sequenciamento de Sanger (Rosario et al., 2012a), metagenômica e sequenciamento de segunda geração (plataforma 454 FLX da Roche e a Solexa da Illumina) (Li et al., 2010b).

A técnica de amplificação por círculo rolante (RCA), pode ser utilizada para enriquecer a proporção de ssDNA numa amostra antes do sequenciamento (Haible et al., 2006; Kim et al., 2008), utilizando a polimerase do bacteriófago phi29 de *Bacillus subtilis* (Blanco et al., 1989) superando o problema de baixo número de cópias devido a uma taxa de amplificação exponencial de até  $10^7$ , através da utilização de hexâmeros aleatórios que se ligam ao DNA viral molde em vários locais, criando diversas fitas de replicação (Nelson et al., 2002). Outra vantagem da enzima phi29 DNA polimerase é sua alta fidelidade amplificando preferencialmente

modelos de ssDNA circulares por cima do outro ácido nucleico presente na amostra (Edwards and Rohwer, 2005; Kim et al., 2008; Kim et al., 2011), sendo assim a RCA mais eficiente na detecção de novos vírus do que a PCR com primers específicos. A técnica é usada antes dos sequenciamentos de segunda geração (Roche 454 pyrosequencing ou Solexa), em amostras ambientais, tais como água doce (Fancello et al., 2013; Roux et al., 2012) invertebrados (Ng et al., 2011a; Ng et al., 2011b), fezes humanas (Kim et al., 2011; Minot et al., 2011), o tecido de tartarugas marinhas (Ng et al., 2009), em solo de cultura de arroz (Kim et al., 2008) onde foram descobertos uma variedade de novos vírus.

Recentemente, os novos vírus ssDNA não são bem compreendidos devido à taxonomia atual que é incapaz de classificar vírus identificados através de técnicas de amplificação não-específicas (Sikorski, 2013). Métodos que incorporam as mais recentes técnicas de sequenciamento com amostras ambientais de diferentes ecossistemas e regiões globais, deve incluir uma técnica de amostragem eficiente, tais como a utilização de reservatórios virais, com as técnicas de amplificação e de sequenciamento que são adequados para o tipo de ácido nucleico viral a ser estudado, sendo possível descobrir o sequenciamento do mundo viral (Sikorski, 2013).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Isolados virais da planta *Momordica charantia*

Uma amostra de *Momordica charantia* que apresentavam sintomas típicos de infecção viral por begomovírus, foi coletada no campo de cultivo de brassica em Coimbra-MG. Discos foliares de aproximadamente 1 cm de diâmetro de folhas sintomáticas foram utilizados para extração de DNA vegetal total pelo método descrito por Doyle (1990) com a seguinte modificação: os discos foliares foram macerados em tampão de extração utilizando-se o macerador de tecidos *Tissuelyser II* (QUIAGEN).

#### 3.2 Clonagem do genoma viral

Para a obtenção do DNA viral, foi utilizada a técnica de amplificação por círculo rolante (RCA), sendo o principal componente a enzima DNA polimerase phi29 (GE Healthcare) que foi usada de acordo com as especificações do fabricante.

O DNA amplificado foi clivado com as enzimas de restrição *MspI*, *HindIII*, *SpeI*, *XbaI* e *SacI*. As clivagens foram analisadas em gel de agarose a 0,7% corado com brometo de etídeo (5 µg/mL) e visualizado sob luz UV. Alíquotas das reações de clivagem contendo fragmentos de 2195 nucleotídeos (nt) foram clonados no vetor pBluescript KS+ (Stratagene) previamente linearizado com as mesmas enzimas de restrição e desfosforilado. O produto da reação de ligação foi utilizado para transformação de células competentes de *Escherichia coli* DH5α pelo método de choque térmico (Sambrook et al., 2001). A confirmação da clonagem foi realizada por análise de restrição e sequenciamento (Macrogen. Inc. Seul, Coréia do Sul).

#### 3.3 Análise das sequências

A identificação das ORFs nas sequências obtidas foi realizada utilizando-se o programa “*ORF Finder*” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>). As sequências

de aminoácidos deduzida de cada proteína foram comparadas com as demais espécies de “gemycircularvirus” utilizando-se o algoritmo BLAST<sub>p</sub>, e as sequências de nucleotídeos foram comparadas utilizando-se o algoritmo BLAST<sub>n</sub> (Altschul et al., 1990). Com base nas sequências de aminoácidos e nucleotídeos, alinhamentos múltiplos foram obtidos com o programa MUSCLE (Edgar, 2004). Análises de distribuição pontual das espécies, determinando a porcentagem de identidade par a par e árvores filogenéticas utilizando o método “Maximum likelihood” em análise “bootstrap” de 10.000 repetições, foram construídas e desenhadas com os aminoácidos das proteínas de replicação (Rep) e capsidial (CP), usando os programas SDT v1.0 e MEGA 4.0, respectivamente (Muhire et al., 2014; Tamura et al., 2007). Os alinhamentos e as árvores filogenéticas incluíram dois isolados do laboratório e os gemycircularvirus mais próximos (números de acesso do GenBank ver Tabela 3).

Número de acesso GenBank	Acrônimo do vírus
KF413620	HJasCV
-	MCasCV
-	TL1187-3a
-	TL1187-2A
JX185429	DfaCV-2
JQ412056	CasCV
JQ412057	CasCV
GQ365709	SsHADV-1
KF268025	unssd_SsHADV
KF268026	unssd_SsHADV
KF268027	unssd_SsHADV
KF371036	FaGmCV-6
JX185430	DfaCV-1
KF371633	FaGmCV-9
KF371634	FaGmCV-8
LK931485	unssD_MSS12_225
KF371632	FaGmCV-10
KF371638	FaGmCV-4
KF371639	FaGmCV-3
KF371640	FaGmCV-2
KF371041	FaGmCV-1c
KF371042	FaGmCV-1b

A estrutura secundária putativa ou “stem-loop” e o mínimo de energia livre ( $\Delta G$ ) na origem de replicação viral foram previstos usando o algoritmo de Zuker no servidor web MFOLD para dobrar único filamento de ácido nucleico e previsão de hibridação (versão 3.2) com as configurações padrão (Zuker, 2003) ([http:](http://)

//mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form). Energia livre local com um valor alto  $\Delta G$  negativo reflete uma estrutura interna estável.

### 3.4 Construção do clone infeccioso

Para a obtenção do clone infeccioso, o clone cópia única foi liberado do vetor pKS, recircularizada e utilizada como molde em uma reação de amplificação com a enzima DNA polimerase phi29 (Inoue-Nagata et al., 2004). Os concatâmeros foram clivados parcialmente utilizando-se a enzima *Hind* III, e a banda correspondente a duas cópias do genoma viral foi clonada no vetor pKS utilizando-se técnicas padrão (Sambrook et al., 2001). A confirmação do clone infeccioso foi realizada por análise de restrição e sequenciamento (Macrogen. Inc. Seul, Coréia do Sul).

### 3.5 Determinação da gama de hospedeiros

#### 3.5.1 Inoculação em planta

A infectividade, em plantas, do clone obtido foi realizada por meio de inoculação por biobalística como descrito por Aragão et al. (1996). Para isso, plantas de *Momordica charantia* e *Nicotiana benthamiana* foram bombardeadas com o clone infeccioso do isolado. Como controle positivo foram bombardeadas plantas de *Nicotiana benthamiana* com o *Tomato yellow spot virus* (ToYSV). Como controle negativo foram bombardeadas plantas sem DNA. Três semanas após a inoculação, as plantas foram avaliadas quanto à presença de sintomas, e para a confirmação da infecção viral, a extração do DNA total da planta foi usada para realizar uma amplificação por círculo rolante (RCA), e uma PCR com *primers* para amplificação de fragmentos do genoma viral.

A confirmação via PCR foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos (McasCV\_CP\_R 5'- CGT TGC CTG AGG AAA TAA TGC -3'; McasCV\_CP\_F 5'- GAA GCA GGA CAC GAT GTT G -3') desenhados para anelar no gene que codifica a proteína capsidial (CP) do genoma viral em estudo. A reação foi realizada

em um volume final de 25 µl, contendo 5,0 µl de tampão (5x), 2,0 µl de MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM), 2,0 µl da mistura de dNTPs (40 mM), 0,4 µl de cada primers (40 mM), e 0,3 µl de GoTaq Flexi DNA polimerase, completando-se o volume com água. A reação consistiu em 34 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 30 segundos, seguido de uma extensão final a 72°C por 10 minutos. O produto amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

### 3.5.2 Inoculação em *Sclerotinia sclerotiorum*

A infectividade do clone construído em *Sclerotinia sclerotiorum* foi realizada por meio da transfecção de protoplastos descrito por Yu et al. (2010) com algumas modificações. Para isso foi utilizado o isolado fúngico SS01, pertencente a coleção de microrganismos do Laboratório Genética Molecular e de Microrganismos da Universidade Federal de Viçosa, foi classificado como livre de vírus, mediante indexação (dados não publicados). O isolado fúngico foi cultivado em placas de petri contendo meio de cultivo “*Potato Dextrose Agar*” (PDA), a 25°C por 5 dias.

Para obtenção de protoplastos de *S. sclerotiorum* SS01, discos de micélio (5 mm de diâmetro) provenientes da borda de crescimento ativo da colônia foram transferidos para um erlenmeyer contendo 50 mL de Caldo Batata Dextrose (Sigma-Aldrich) e incubados sob agitação a 110 rpm por 28°C durante 48 horas. Após período de incubação, a cultura foi filtrada para retenção exclusiva da massa micelial, e o micélio recuperado foi submetido a sucessivas lavagens com solução de NaCl 9g.L<sup>-1</sup>. Aproximadamente, 480 mg de micélio foram coletados em um erlenmeyer de 125 mL, onde adicionou-se 10 mL de uma mistura enzimática contendo Driselase de *Basidiomycetes* (Sigma-Aldrich) (10 mg/mL) e *Lysing enzyme* de *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich) (12 mg/mL) preparada em NaCl 0,7M (pH 6). A digestão ocorreu em agitação branda a 70 rpm 28°C durante 3 horas, a cada uma hora, o monitoramento quali/quantitativo dos protoplastos foi realizado.

Para recuperação dos protoplastos, as hifas parcialmente digeridas foram sedimentadas por centrifugação a baixa velocidade (1000 rpm por 10 minutos a 5°C)

e os protoplastos coletados do sobrenadante foram purificados e concentrados por centrifugação (2500 rpm por 20 minutos a 5°C). Os protoplastos sedimentados foram delicadamente ressuspensos em 1 mL de solução de NaCl 0,7M (pH 6), contendo CaCl<sub>2</sub> 50mM e a suspensão foi ajustada para uma concentração de 2x10<sup>6</sup> protoplastos/mL.

O ensaio de transfecção foi realizado conforme descrito por (Choi and Nuss, 1992; Hillman et al., 2004) com algumas modificações. Uma alíquota de 200 µl de protoplastos foi gentilmente misturada ao DNA plasmidial, correspondente ao clone infeccioso, nas quantidades de 5µg e 10 µg. Em seguida adicionou-se 50 µl da solução PEG (250 mL<sup>-1</sup> polietileno glicol 6000, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 M Sorbitol, 50 mM –pH 7.5 – Tris-HCl). As amostras foram incubadas no gelo por 20 minutos, quando um volume de 500 µl da solução PEG foi adicionado e em seguida as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos.

Os protoplastos foram misturados ao meio de regeneração semi-sólido (Caldo Batata Dextrose + Ágar 8G l<sup>-1</sup> + Sorbitol 1M) a 50°C e em seguida semeados por “pour plate” sobre uma camada de meio regenerativo sólido (Batata Dextrose Ágar com adição de Sorbitol 1M) e incubados a 25°C por 48 horas. Transcorridas 48 horas, um total de 100 microcolônias regenerantes foram recuperadas aleatoriamente em meio Batata Dextrose Ágar. O DNA total das colônias regeneradas foi extraído segundo o protocolo descrito por Doyle (1990). Para a confirmação dos transfectantes utilizou-se PCR com oligonucleotídeos específicos que amplificam uma porção do gene que codifica a proteína capsidial do MCasCV conforme descrito no item anterior. Versões epissomais livres do MCasCV foram detectadas por RCA, para excluir as chances de falso positivo (versões integradas no cromossomo) e validar *Sclerotinia sclerotiorum* como um putativo hospedeiro.

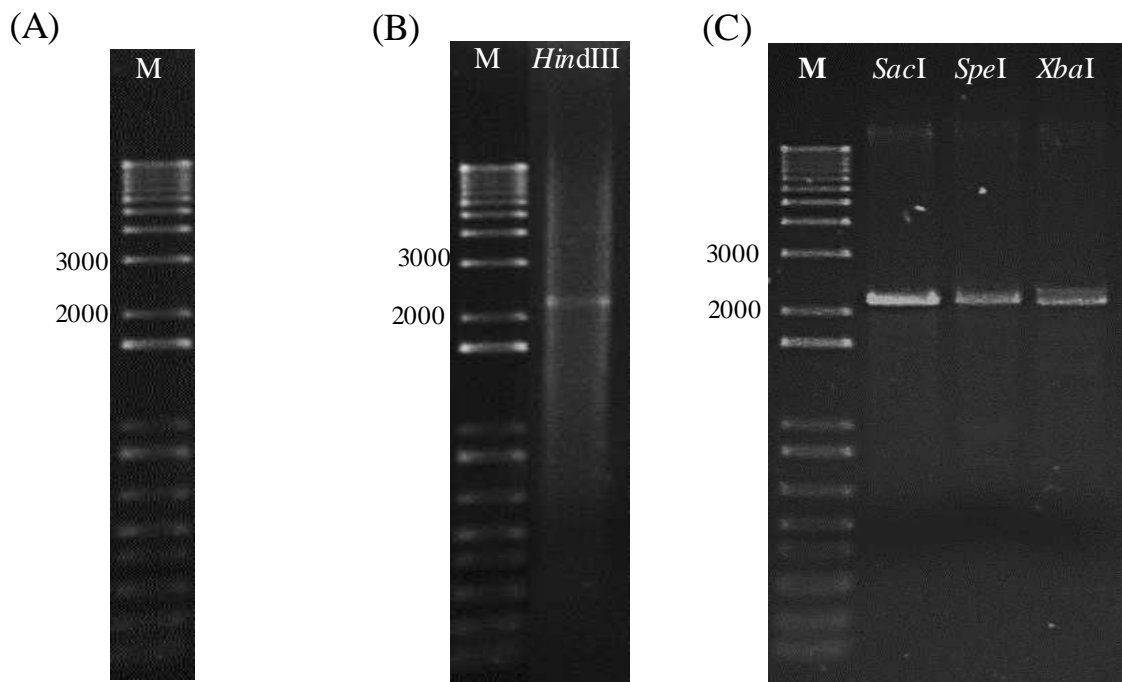
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Amplificação e clonagem do DNA viral

Amostras da planta *Momordica charantia* apresentando sintomas típicos de infecção por geminivírus (Figura 1) foram coletadas em Coimbra-MG. O DNA total vegetal da amostra foi amplificado obtendo possíveis moléculas de DNA circular. A análise da clivagem do DNA circular amplificado com a enzima de restrição de corte frequente *MspI* revelou que era de origem viral (Figura 2A). Os fragmentos visualizados no gel de agarose não se relacionavam a uma unidade genômica de geminivírus. Porém, o DNA foi tratado com as enzimas de restrição *Hind III*, *Sac I*, *Spe I* e *Xba I*, obtendo um total de 21 clones (dados não apresentados) com uma banda de aproximadamente 2200 nt (Figura 2B e C) sugerindo se tratar de um *Gemycircularvirus* de acordo com as referências consultadas. Para confirmação, o fragmento foi clonado, transformados e sequenciado.



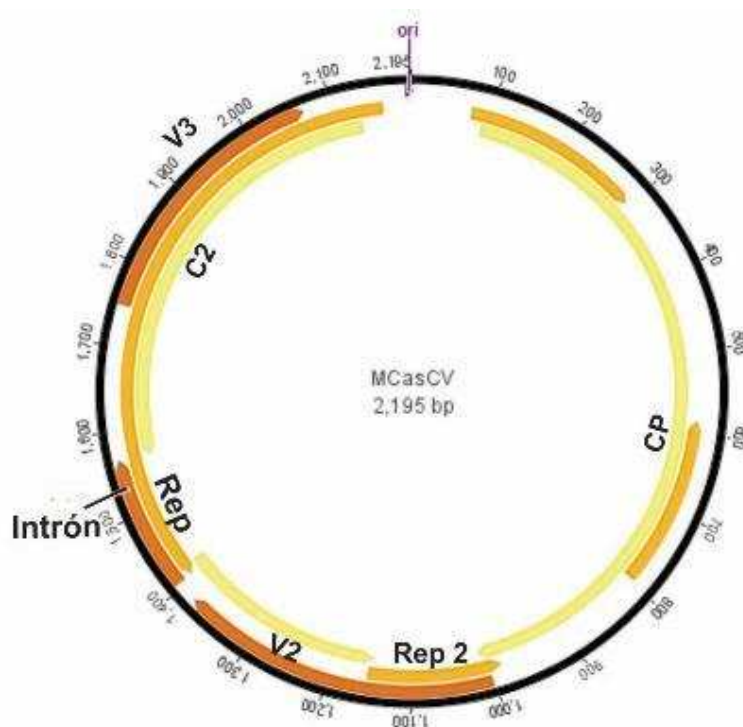
**Figura 1.** Planta de *Momordica charantia* com sintoma de mosaico amarelo.



**Figura 2.** Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) da clivagem dos amplicons obtidos a partir de DNA total da amostra, **M** marcador de tamanho (“1 kb plus DNA ladder”, em nt). **(A)** Enzima de corte frequente *Msp* I, **(B)** e **(C)** Enzimas de corte no ponto

#### 4.2 Caracterização de um novo gemycircularvirus infectando *Momordica charantia*

O sequenciamento completo do clone obtido a partir da planta *Momordica charantia* mostrou que o genoma possui 2195 nucleotídeos e uma organização semelhante aos outros *Gemycircularvirus*. O genoma contém 5 ORFs: sendo na fita viral, a CP (309 aminoácidos), uma putativa V2 (125 aa), e uma putativa V3 (105 aa); na fita complementar foi possível predizer as ORF Rep (205 aa), Rep2 (54 aa) e uma putativa C2 (188 aa) (Figura 3). A organização deste vírus tem uma característica similar com o gênero mastrevirus da família *Geminiviridae* (Wright et al., 1997), pela presença de um intron na Rep, sendo uma característica típica da maioria dos gemycircularvirus.



**Figura 3.** Organização genômica de *Mormodica charantia associated circular virus* (MCasCV), mostrando as ORFs localizadas na fita viral e complementar junto com a localização do intron.

Análises da sequência da proteína CP do isolado (Tabela 3), revelou um grau significativo de semelhança com as proteínas da partícula capsidial de HJasCV, DfasCV-2 e SsHADV-1. A fita complementar apresenta duas ORFs divididas por um intron. Quando o intron foi removido por inspeção manual, uma ORF, que codifica a proteína Rep foi encontrada com um tamanho de 294 aa, análise de Blast mostrou uma maior identidade com a Rep do vírus HJasCV. A identificação da proteína Rep é crucial na descoberta de novos vírus ssDNA (Delwart and Li, 2012; Muhire et al., 2013), está presente numa ampla variedade de ssDNA circulares, incluindo os geminivirus, nanoviruses, circovirus e vários plasmídeos ssDNA ambientais atualmente não classificados (Rosario et al., 2012b). Todos os vírus gemycircularvirus encontrados contém um intron na região codificadora da Rep (no sentido complementar do DNA), semelhante à encontrada em mastreviruses (Wright et al., 1997). Com tudo, a sequência total dos clones apresentou identidade nucleotídica menor que 85% com todas as outras sequências de gemycircularvirus disponíveis. De acordo com os critérios estabelecidos pelo ICTV o vírus isolado de melão de são caetano (*Momordica charantia*) pode ser considerado como uma nova espécie, sendo proposto o nome de *Mormodica charantia associated circular virus* (MCasCV).

ORFs Virais	Proteínas homologas (Número de acesso ao GenBank)	Cobertura (%)	Identidade (%)	Valor E	Domínio conservado (NCBI-CDD)
		MCasCV BLASTp/BLASTx	MCasCV BLASTp/BLASTx	MCasCV	
Proteína de replicação	Proteína de replicação <i>Hypericum japonicum associated circular DNA vírus</i> (AGS12486.1)	100/99	71/62	5e-131	pfam00799 - Domínio catalítico Rep Geminivírus As proteínas AL1 codifica a proteína iniciadora de replicação (Rep) de geminivírus, que é uma enzima específico do iniciador replicação e é um componente essencial do replissoma. Para a proteína Rep geminivírus, esta região N-terminal é crucial para o reconhecimento e clivagem de DNA de origem e de transferência de nucleotídeos.
viral	“Spliced” Proteína de replicação <i>Dragonfly associated circular DNA vírus 2</i> (YP_009021856.1)	99/96	63/49	2e-99	
	Proteína de replicação <i>Dragonfly associated circular DNA vírus 2</i> (YP_009021858.1)	67/65	72/69	2e-96	
	Proteína de replicação <i>Cassava associated vírus DNA circular</i> (AFH54232.1)	100/99	48/48	4e-89	
	Proteína de replicação <i>Cassava associated vírus DNA circular</i> (YP_009021043.1)	100/99	48/48	1e-88	
	Proteína de replicação <i>Sewage associated gemycircularvirus-11</i> (YP_009115523.1)	98/98	47/47	4e-88	
	Proteína de replicação <i>Sclerotinia sclerotiorum hypovirulence associated vírus DNA circular 1</i> (AGP05335.1)	96/93	47/47	6e-85	
Proteína de cápside viral	CP proteína - <i>Hypericum japonicum associated circular DNA vírus</i> (AGS12482.1)	100/89	45/44	4e-77	O domínio putativo conservado não foi detectado.
	CP proteína - <i>Dragonfly associated circular DNA vírus 2</i> (YP_009021855.1)	100/86	43/44	1e-72	
	CP proteína - <i>Gemycircularvirus 10</i> (YP_009109718.1)	86/86	45/45	4e-70	
	CP proteína - <i>Gemycircularvirus 4</i> (YP_009109730.1)	89/88	43/43	3e-61	
	CP proteína - <i>Gemycircularvirus 3</i> (YP_009109732.1)	89/89	43/43	7e-61	
	CP proteína - <i>Sclerotinia sclerotiorum hypovirulence associated DNA virus 1</i> (AGP05336.1.)	99/89	40/40	1e-60	
	CP protein - <i>Dragonfly-associated circular virus 3</i> (YP_009021851.1)	85/85	44/44	1e-55	
Proteína putativa C2	Proteína putativa C2 <i>Hypericum japonicum associado vírus DNA circular</i> (AGS12485.1)	100/99	78/78	3e-95	O domínio putativo conservado não foi detectado
Proteína putativa V2	Proteína putativa V2 <i>Hypericum japonicum associado vírus DNA circular</i> (AGS12483.1)	70/100	74/79	1e-35	O domínio putativo conservado não foi detectado.
Proteína putativa V3	Proteína putativa V3 <i>Hypericum japonicum associado vírus DNA circular</i> (AGS12484.1)	100/98	70/75	3e-39	O domínio putativo conservado não foi detectado.

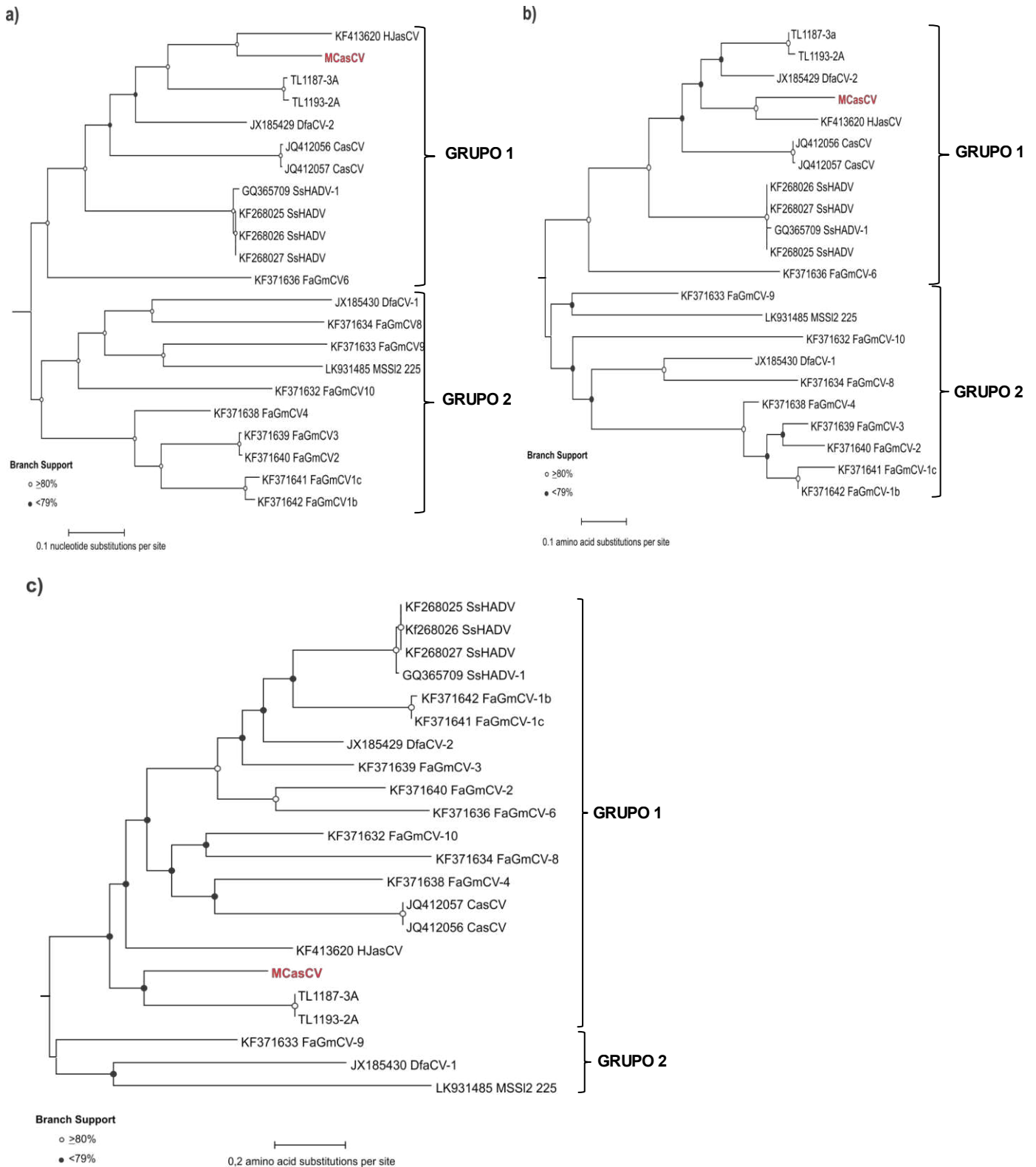
**TABELA 3.** Comparação sequências dos aminoácidos codificadas por MCasCV (*Momordica charantia*) aplicando BLASTp e BLASTx.

### 4.3 Análises filogenética da sequência genômica de MCasCV

Árvores filogenéticas foram construídas utilizando as regiões conservadas encontradas nos gemycircularvirus mais próximos ao vírus MCasCV. As árvores foram obtidas pelo método de “Maximum likelihood”, utilizando-se o programa Mega 5.0. Os números em cada ramo indicam o valor de “bootstrap” (10.000 repetições). As análises feitas com as regiões conservadas do genoma completo e as proteínas Rep e CP (Figura 4A, B e C) mostrou uma separação de dois grupos, sendo que o primeiro agrupou os vírus encontrados em fungo, inseto e planta, onde o vírus MCasCV se relaciona com o seu mais próximo o vírus HJasCV; o segundo grupo abriga a maioria de vírus encontrados em fezes e soro, os menos relacionados com o isolado. No entanto, o primeiro grupo da árvore da proteína CP (Figura 4C) mostra uma agrupação maior dos vírus, onde também o MCasCV se encontra no mesmo clado com os isolados TL1187-3A e TL1193-2A que ainda estão sendo trabalhados no laboratório, entretanto, o segundo grupo só apresenta os isolados FaGmCV-9, DfaCV-1 e MSS12-225. Essas diferenças podem demonstrar à baixa homologia das sequências da proteína CP com respeito à Rep nos genomas de gemycircularvirus.

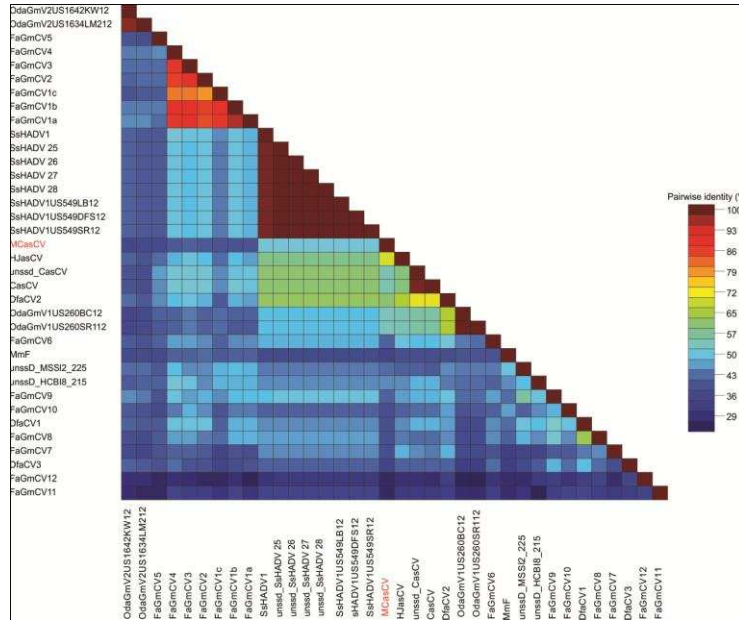
Comparação par a par de sequências de aminoácidos das proteínas Rep e CP revelaram valores de >60% em Rep e >45% em CP (Figura 5A e B), indicando que a proteína Rep tem uma maior identidade do que a proteína CP dentro do genoma de gemycircularvirus. As análises mostraram que o vírus MCasCV apresenta maior identidade com três gemycircularvirus HJasCV, DfaCV-2 e CasCV, demonstrado também no resultado obtido na análise filogenética onde os vírus estão localizados no mesmo clado. Os isolados DfaCV-2 e CasCV foram referenciados na descoberta de HJasCV (Du et al., 2014) com valores parecidos aos obtidos com MCasCV, esses resultados possivelmente demonstram que esses 4 isolados (DfaCV-2, CasCV, HJasCV e MCasCV) sendo descobertos em distintos países e de diferentes tipos de amostras como é plantas e insetos, sua origem pode derivar-se do mesmo ancestral, compartilhando alguns caracteres filogenéticos.

A análise de identidade par a par do genoma completo do vírus MCasCV e os gemycircularvirus mais próximos (Figura 5C) mostraram valores <41%, revelando que as sequências completas tem uma baixa identidade e são divergentes entre elas.

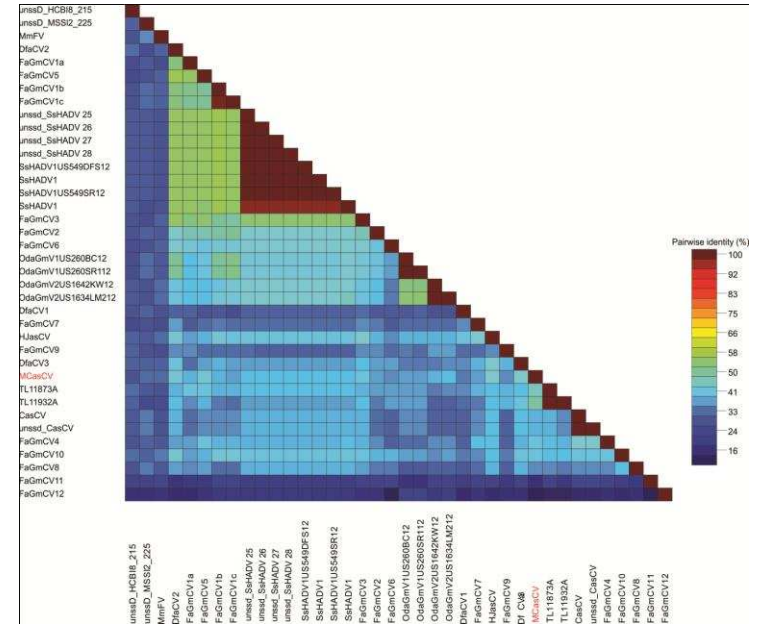


**Figura 4.** Árvores filogenéticas obtida a partir do alinhamento das regiões conservadas, (a) sequências de aminoácidos das proteínas (b) Rep e (c) CP de MCasCV (destacado em vermelho) e os gemycircularvirus mais próximos. A barra horizontal indica o valor de substituições por sítio.

(A)



(B)



(C)

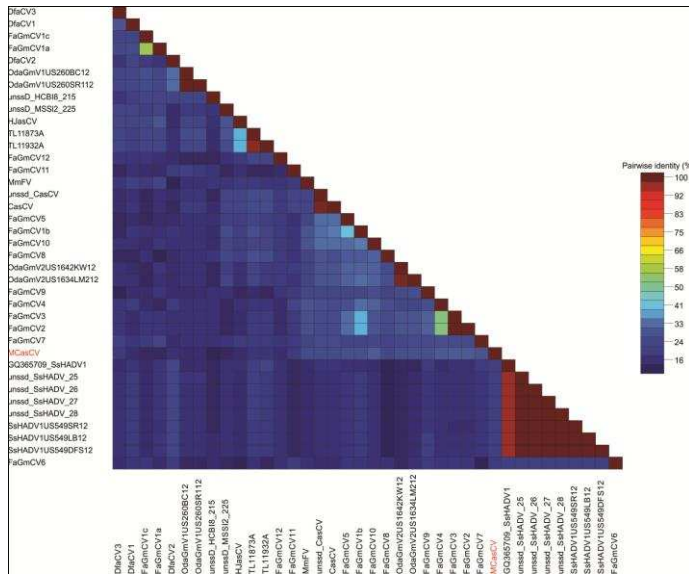


Figura 5. Comparações par a par da identidade bidimensionais entre as sequências de aminoácidos da (A) Rep, (B) CP e (C) genoma completo do MCasCV e os gemycircularvirus mais relacionados.

#### 4.4 Motivos conservados na proteína Rep de MCasCV

A proteína Rep de MCasCV está dividida em duas ORFs, quando o intrón presente dentro do genoma é removido, aparece uma sequência de 294 aa codificando a proteína completa. Embora, com a quantidade de 20 isolados da mesma amostra, os resultados sugerem que estas características presentes na origem de replicação MCasCV podem ser evolutivamente conservadas. Neste caso, é possível que eles sejam reconhecidos pela proteína Rep uma vez que esta proteína atua como uma endonuclease específica do local com o requisito de estrutura e sequência (Laufs et al., 1995a; Orozco and Hanley-Bowdoin, 1996, 1998). Isto levou a caracterizar ainda mais os motivos conservados e os domínios presentes na proteína Rep de MCasCV.

Os motivos I, II e III, GRS (*Geminivirus Rep Sequence*) e os motivos helicase são conservados em todos os ssDNA circular dos gemycircularvirus descritos até o momento. No presente trabalho foi encontrado no domínio N-terminal, o motivo I (LITYP), importante para a ligação de dsDNA durante a replicação, motivo II (HLHVFAD) que se acredita estar envolvido na coordenação de metal bivalente para a clivagem de DNA e motivo III (YAIKD), que contém um resíduo de tirosina essencial para a clivagem e que atribui à forma covalente na extremidade 5' do DNA clivado. Estes três motivos RCR foram encontrados em geminivírus, nanoviruses e circovírus em posições estruturalmente equivalentes no N-terminal Rep (Rosario et al., 2012a). O motivo IV ou GRS (DVFDVDGRHPNVEPSK) localizado entre os motivos II e III, está implicado na reação de clivagem do DNA fita simples que ocorre durante a iniciação da RCR, esse domínio é relacionado com o início da replicação em geminivirus (Nash et al., 2011). O domínio helicase, relacionado com a desnaturação da fita dupla durante a replicação viral. No vírus MCasCV só foi identificado o motivo Walk-A (SDIQERKQ), o motivo Walk-B não foi encontrado, semelhante aos isolados MmF, MSS12\_225 e HCBI8\_215 (Lamberto et al., 2014; van den Brand et al., 2012). George et al. (2014) realizaram mutações nos motivos Walk-A e Walk-B da proteína Rep do *Tomato Yellow Leaf Curl Sardinia Virus* (TYLCSV), revelando acumulação assintomática nas plantas possivelmente pela deficiência na desnaturação e ligação do DNA viral. No entanto, é necessário aprofundar e esclarecer como ausência do motivo Walk-B pode interferir na interação da replicação viral.

#### 4.5 Origem de replicação

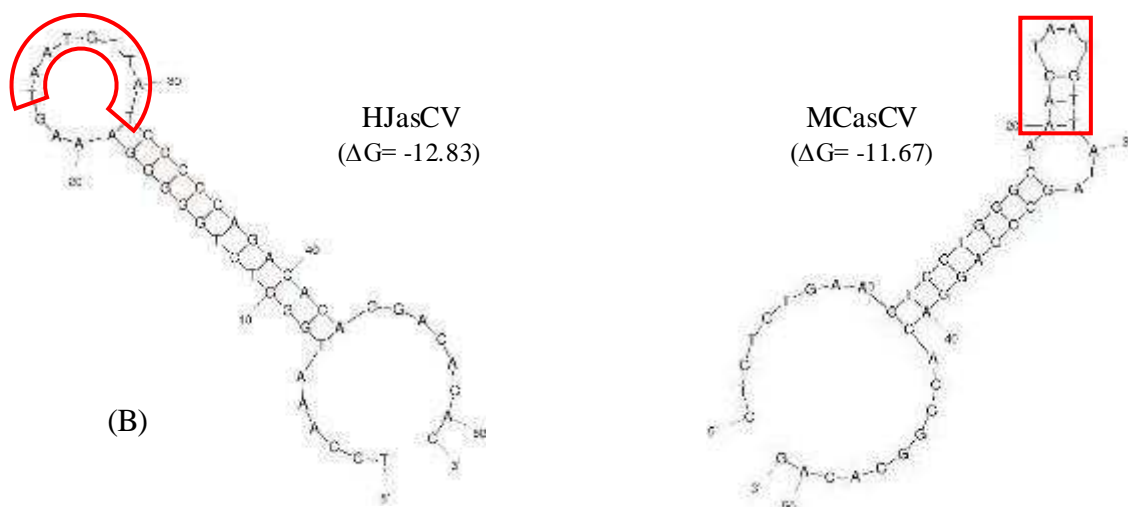
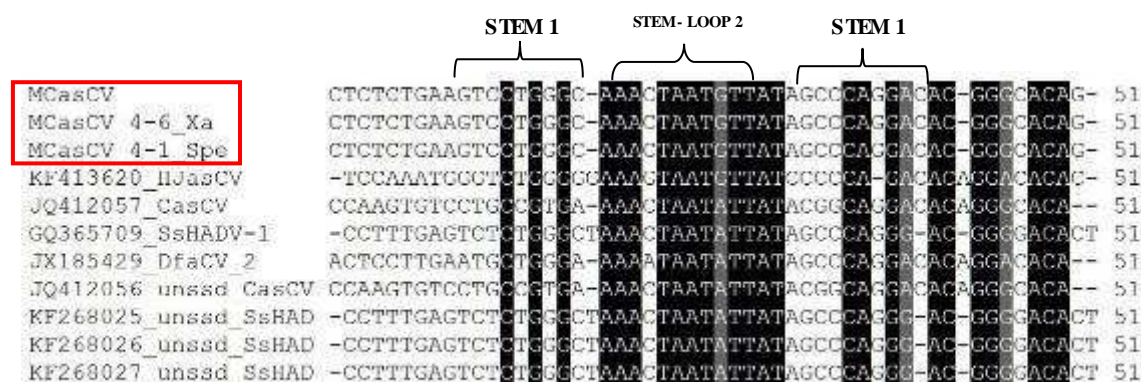
O “stem-loop” localizado na região intergênica do MCasCV, contém a sequência de nonanucleotídeo (TAATGTTAT) igual ao vírus HJasCV, mas diferente à maioria dos gemycircularvirus, devido ao nucleotídeo na quinta posição (o A é substituído por um G) (Figura 5A). Os efeitos dessa diferença na biologia molecular de MCasCV são desconhecidos. No entanto, foi demonstrado que as alterações no motivo nonanucleotídeo pode não inibir a reação de clivagem entre as posições 7 e 8 para os geminivirus, embora a eficiência da reação pode ser afetada (Laufs et al., 1995b). Não obstante, com a diferença do nucleotídeo, análise da sequência do nonanucleotídeo conserva uma relação estreita com as sequências dos geminivirus, circovírus, nanovirus, e genomas alphasatelites (Londono et al., 2010).

Na estrutura “stem-loop” da origem de replicação do vírus MCasCV, observou-se um pequeno grampo atípico (Figura 5B) em relação com os gemycircularvirus descritos em estudos anteriores (Sikorski et al., 2013b). Essa estrutura conformada pela ligação de três pares de bases (CAA), impediu a formação de um só grampo, tratando-se de instabilidade da conformação. No entanto, o valor de energia livre é menor de -12 ( $G = -11.67$ ) dando uma maior confiabilidade da estrutura formado do “stem-loop”. Para a confirmação do tipo de grampo, os nonanucleotídeos dos 21 clones sequenciados demonstraram a mesma estrutura em cada um deles, sugerindo que o resultado não era um erro de sequenciamento. Seguindo desta análise, foram alinhadas as sequências de origem de replicação de alguns isolados do MCasCV junto com os gemycircularvirus mais próximos, mostrando os nucleotídeos conservados e os que diferem em cada uma das sequências dos nonanucleotídeos (Figura 5A). Até a presente data, nenhum gemycircularvirus com uma estrutura de “stem-loop” atípica foi relatada.

Mutações nos nucleotídeos variáveis adjacentes foram descritas no nonanucleotídeo do DNA-B de TGMV que alterou sequência de “stem-loop” afetando significativamente a sua replicação na presença de DNA-A de tipo selvagem em protoplastos de tabaco (Orozco and Hanley-Bowdoin, 1996). Estes resultados indicam que a estrutura em grampo, como a sua sequência, é importante para a funcionalidade

da origem de replicação. Portanto, não é razoável supor que as interações intermoleculares previstas no MCasCV provavelmente não ocorrem “in vivo”. Não obstante, a ligação dos três pares de bases não afetou o tamanho do “loop” (Figura 5B), que poderia impedir o reconhecimento pela proteína Rep de um modo semelhante ao observado nos geminivírus com “stem-loop” de tipo selvagem.

(A)



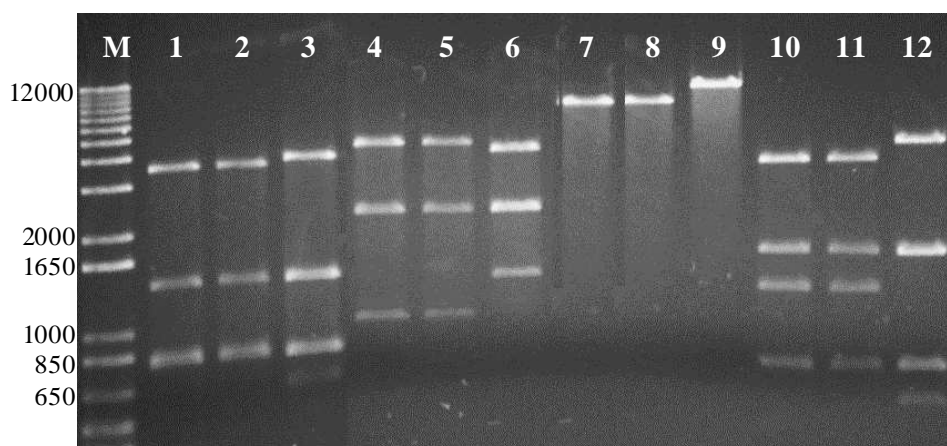
**Figura 5.** (A) Alinhamento de seqüências da origem de replicação dos isolados de MCasCV e outros gemycircularvírus, indicando os motivos conservados. (B) Estrutura secundária de HJasCV (à esquerda) e o “stem-loop” de MCasCV (à direita). São indicados os valores  $\Delta G$  para cada estrutura. Em vermelho o nonanucleotídeo.

#### 4.6 Determinação da gama de hospedeiros de MCasCV

O único gemycircularvírus com hospedeiro descrito até o momento é o SsHADV-1, infectando *S. sclerotiorum* (Yu et al., 2010). Entre tanto, os outros isolados deste grupo realizam uma caracterização molecular, a nível biológico

formulam uma hipótese do fungo *S. sclerotiorum* como possível hospedeiro, por ser o único conhecido, ou consideram as estreitas associações patogênicos ou simbióticos entre fungos e plantas (Du et al., 2014). Por isto, para este estudo, foi testado dois possíveis hospedeiros do vírus MCasCV: planta *Momordica charantia* e o fungo *S. sclerotiorum*.

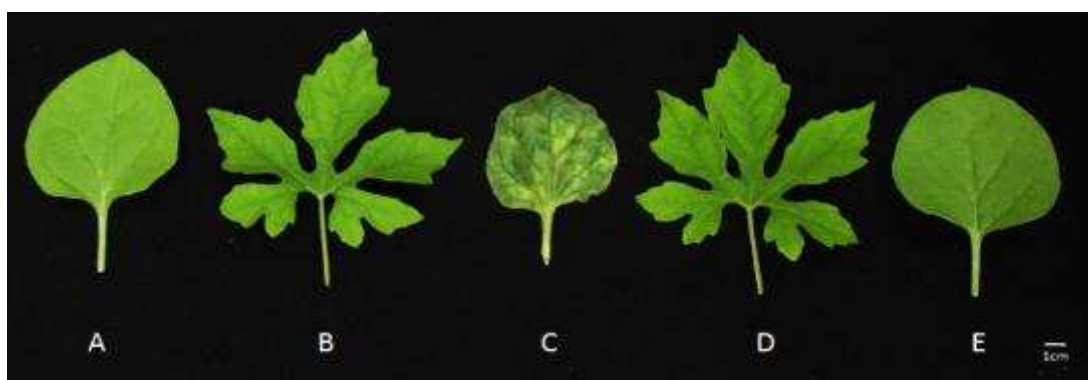
O clone infeccioso foi construído a partir da obtenção de um dímero (duas cópias do vírus) pela digestão parcial da construção (MCasCV+ Vetor) com a enzima *HindIII*. A confirmação do dímero foi realizada “in silico”, comparando o padrão do programa de análises “*A plasmid editor*” (ApE) com o gel de agarose, onde o vírus MCasCV é clivado com as enzimas de restrição *ClaI*, *ApaI*, *SpeI*, *BamHI* (Figura 6) sendo as mesmas usadas pelo programa. De acordo com a comparação foi originado três clones que continha a formação do dímero: 1-2, 1-3 e 1-6. Os primeiros contêm o dímero na direção fita viral e o último na direção fita complementar, a forma como o fragmento foi inserido no vetor não impede a infecção na planta. Os clones infecciosos foram sequenciados completamente pela MacroGem, indicando que tratarem-se de componentes genômicos correspondentes ao vírus McasCV, respectivamente, de gemycircularvirus.



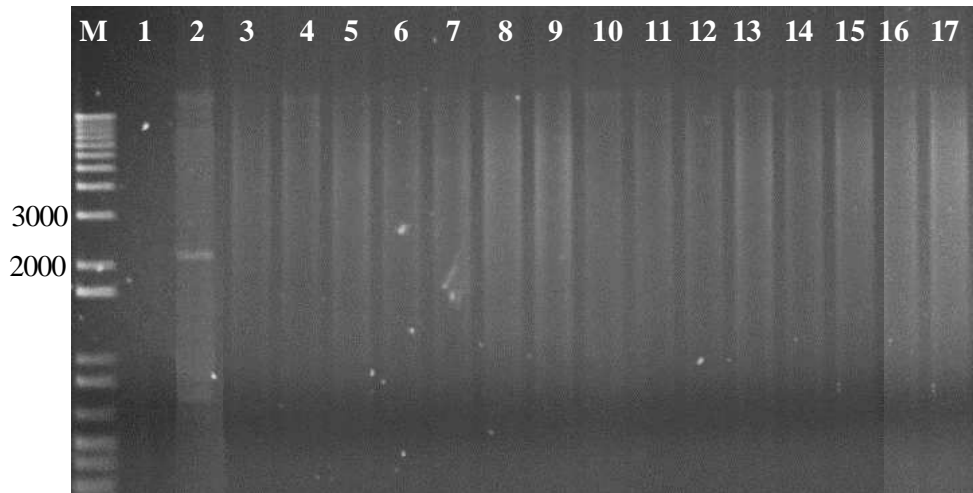
**Figura 6.** Padrão eletroforético em gel de agarose (0,8%) dos clones infecciosos 1-2, 1-3 e 1-6 do vírus MCasCV clivado com diferentes enzimas de restrição. **M**, marcador de comprimento (“1 kb plus DNA ladder”); **1-3** Enzima *ApaI*; **4-6** Enzima *SpeI*; **7-9** Enzima *ClaI*; **10-12** Enzima *BamHI*.

O clone infeccioso 1-3 foi selecionado para realizar o bombardeamento nas plantas de *Momordica charantia* e *Nicotiana benthamiana*. Após 20 dias de

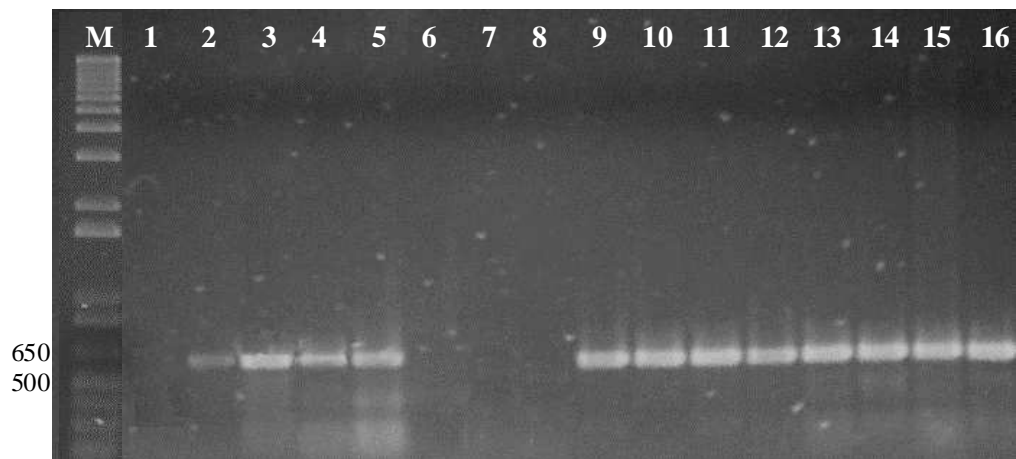
inoculação do vírus, as plantas controle (*Nicotiana benthamiana*) desenvolveram os sintomas típicos do vírus ToYSV (vírus de controle da biobalística) (Figura 7C), demonstrando que todos os elementos utilizados durante a técnica de bombardeamento estavam corretos. No entanto, as plantas infectadas com o vírus MCasCV não apresentaram sintomas (Figura 7D e E), semelhante aos resultados nas plantas infectadas com o vírus isolado de fezes de veado congeladas (Ng et al., 2014). Porém, para confirmar a presença do vírus no interior da planta, foi realizada a amplificação por círculo rolante e PCR. No resultado da RCA não houve amplificação (Figura 8). No gel de agarose, não foi observado nenhum fragmento nas plantas infectadas, nem no controle negativo (plantas inoculadas com partículas de tungstênio com água), demonstrando que dentro da planta, o vírus MCasCV não replicou e não causou nenhuma doença. Pelo contrário, a técnica de PCR revelou uma amplificação do fragmento de  $\approx 529$  nt correspondente ao fragmento da proteína CP que confirmaria a infecção. No entanto, o controle negativo (planta sadia) foi amplificado (Figura 9). A PCR foi repetida, mas revelando os mesmos resultados. Possivelmente porque os primers desenhados para amplificar o fragmento da proteína CP de MCasCV, amplificam algum fragmento na planta sadia, para esclarecer esse resultado é necessário desenhar vários pares de primers que amplifiquem a proteína CP ou Rep do vírus MCasCV.



**Figura 7.** Plantas de *Nicotiana benthamiana* e *Momordica charantia* bombardeadas (A e B) com água e (D e E) com o clone infeccioso do vírus MCasCV. (C) Controle positivo do bombardeamento, planta de *N. benthamiana* com o vírus ToYSV.



**Figura 8.** Padrão eletroforético em gel de agarose (0,8%) da confirmação da infecção viral por MCasCV via RCA digerido com a enzima de restrição *Hind*III. **M**, marcador de comprimento (“1 kb plus DNA ladder”); **1** Planta sadia; **2** Controle positivo (*M. charantia* com sintoma); **3-8** Controle negativo (Plantas *M. charantia* e *N. benthamiana* com água); **9-13** Plantas de *M. charantia* com MCasCV; **14-17** Plantas de *N. benthamiana* com MCasCV.

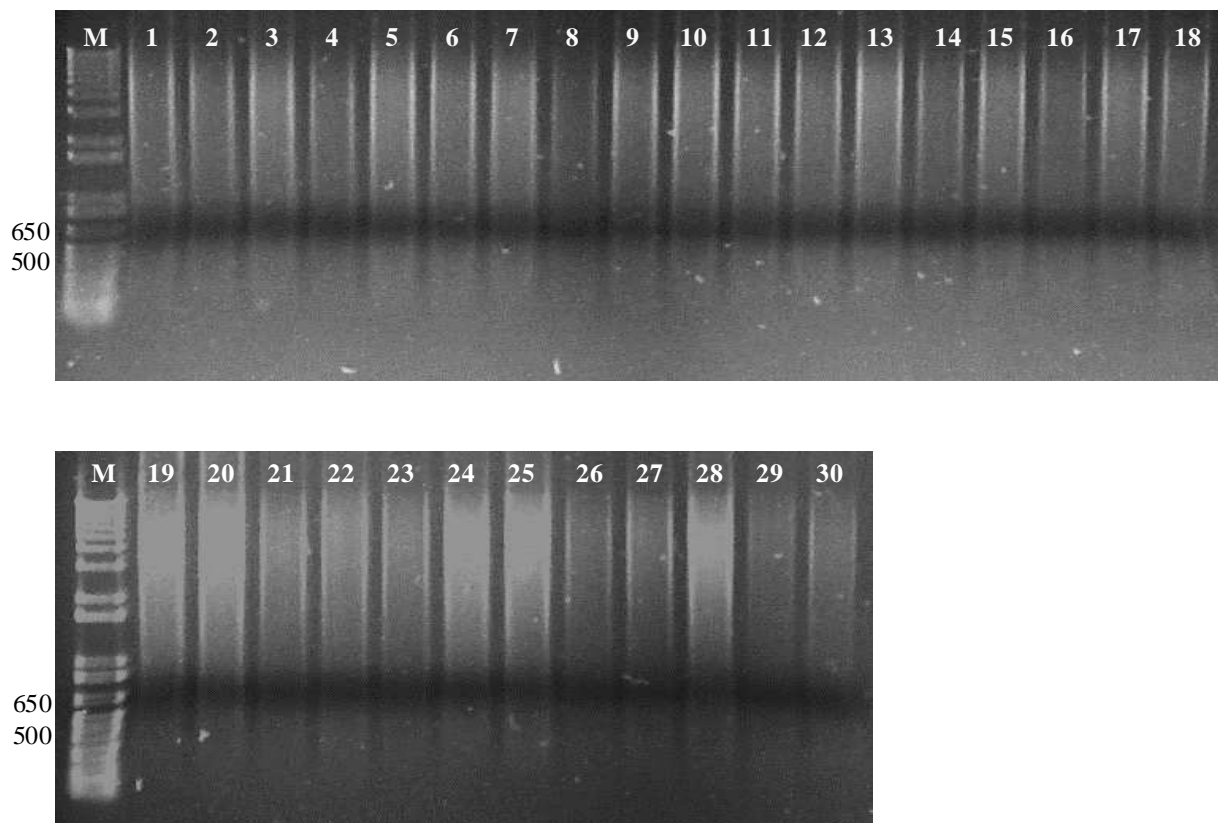


**Figura 9.** Padrão eletroforético em gel de agarose (0,8%) da confirmação da infecção viral por MCasCV via PCR para o gene que codifica a proteína CP. **M**, marcador de comprimento (“1 kb plus DNA ladder”, em nt); **1** água; Controles negativos **2** Planta sadia; **5** TL1187; **6** Geminivirus; **7** Vetor pks. Controles positivos **3-4** DNA Plantas de *M. charantia* coletada com sintoma; **9-16** Plantas de *N. benthamiana* e *M. charantia* com MCasCV.

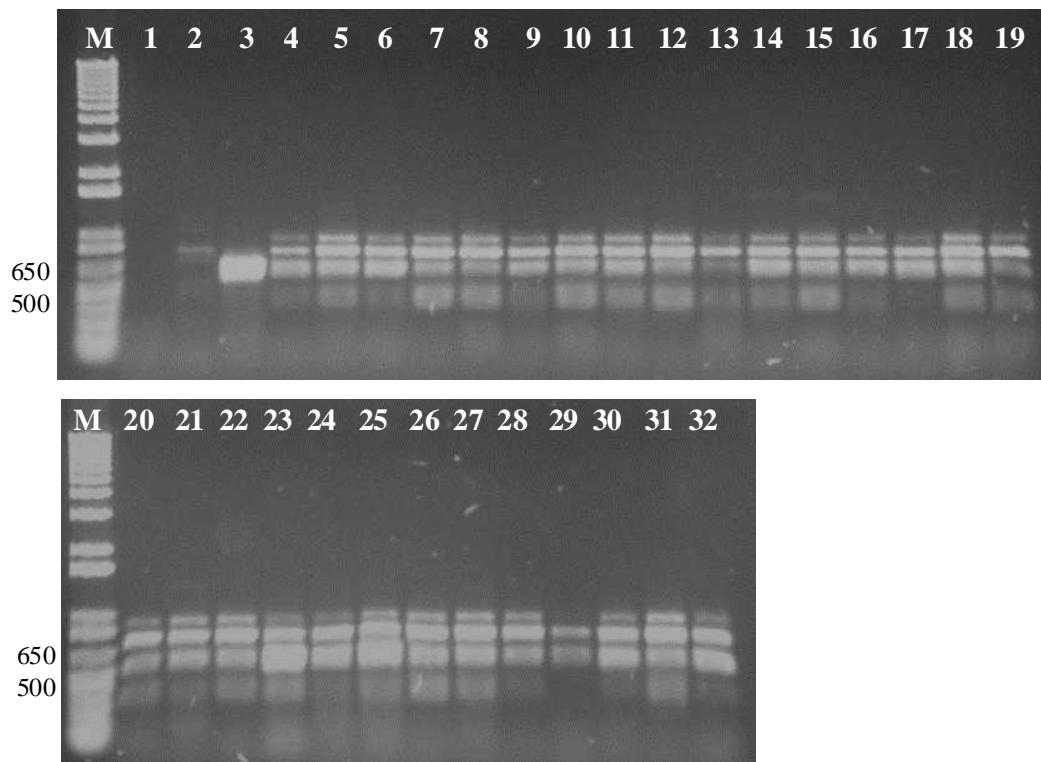
Para a determinação e verificação da infectividade do MCasCV em *S. sclerotiorum*, o clone infeccioso 1-3 foi inoculado em protoplastos, os quais, incluíam

o fungo parental como controle das mudanças morfológicas. Após da transfecção, foram obtidos 100 regenerantes, dos quais foram selecionados 30 deles para realizar a extração de DNA total do fungo de acordo com Doyle (1990). De igual modo que nas plantas, foi realizada a técnica de RCA e PCR para verificar a infectividade. A amplificação por círculo rolante (RCA) foi realizada, para logo ser digerida e visualizada no gel de agarose (Figura 10) mostrando um resultado negativo. A PCR utilizando os primers desenhados para amplificação de um fragmento de  $\approx 529$  nt do gene que codifica a proteína CP, revelou amplificações inespecíficas (Figura 11), sugerindo que os primers possivelmente anelaram no genoma do fungo ou a técnica apresentava uma alta quantidade de DNA do fungo. O resultado da PCR foi o mesmo depois de modificar os parâmetros de temperatura de anelamento e extensão. De acordo com os resultados, a transfecção pode não ter acontecido, devido às etapas críticas do protocolo (tempos da inoculação e quantidade de reagentes) que foi modificado e testado no presente trabalho. Outra hipótese se relaciona a que o fungo *S. sclerotiorum* não seja um hospedeiro do vírus MCasCV, porém para próximos estudos se deve relacionar hospedeiros fúngicos próprios da planta *Momordica charantia*, devido a que gama de hospedeiros naturais pode ser limitada (ter um único hospedeiro), ou estreitamente relacionados aos grupos de compatibilidade vegetativa (fungos da mesma espécie) como acontece com os mycovirus (Ghabrial and Suzuki, 2009).

Existe poucos estudos de transfecção de vírus para o fungo, e só um para vírus ssDNA. Porém, no presente trabalho foi testado o protocolo segundo Yu et al. (2013) com modificações na suspensão e concentração dos protoplastos de *S. sclerotiorum* como nas quantidades de clone infeccioso e solução PEG utilizados na etapa de transfecção. Para estudos futuros é necessário testar a transformação por eletroporação dos protoplastos do fungo, também ter a possibilidade de modificar a etapa de transfecção do protocolo apresentado, utilizando uma construção (clone infeccioso) que contenha uma marca de seleção (gene resistente a hygromicina) para evidenciar a eficácia satisfatória do processo de transfecção e a interação do vírus no fungo.



**Figura 10.** Padrão eletroforético em gel de agarose (0,8%) da confirmação da infecção viral por MCasCV no fungo via RCA digerido com a enzima de restrição *Hind*III. **M**, marcador de comprimento (“1 kb plus DNA ladder”); **1** Parental *S. sclerotiorum*; **2-30** *S. sclerotiorum* inoculados com MCasCV.



**Figura 11.** Padrão eletroforético em gel de agarose (0,8%) da confirmação da infecção viral por MCasCV no fungo via PCR. **M**, marcador de comprimento (“1 kb plus DNA ladder”); **1** água; Controle positivo **2** Clone infeccioso; **3** Planta infectada com o vírus MCasCV; **4** Fungo parental; **5-32** Fungos inoculados com MCasCV.

## 5. CONCLUSÕES

- As análises realizadas permitiram concluir que o MCasCV é um novo vírus ssDNA circular isolado da planta não cultivada *Momordica charantia*, apresentando uma identidade de 85% com o genoma do vírus HJasCV.
- O vírus MCasCV compartilha todas as características encontradas nos gemycircularvirus com exceção da formação do “stem-loop”, onde pela primeira vez é descrito a estrutura de um segundo grampo devido à ligação de três pares de bases que conformam a sequência do nonanucleotídeo.
- As análises da gama de hospedeiro, até o momento, foram inconclusivas, necessitando estudos adicionais para esclarecer a infectividade de MCasCV nos hospedeiros testados.

## 6. REFERÊNCIAS

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* 215, 403-410.
- Angly, F.E., Felts, B., Breitbart, M., Salamon, P., Edwards, R.A., Carlson, C., Chan, A.M., Haynes, M., Kelley, S., Liu, H., Mahaffy, J.M., Mueller, J.E., Nulton, J., Olson, R., Parsons, R., Rayhawk, S., Suttle, C.A., Rohwer, F., 2006. The marine viromes of four oceanic regions. *PLoS biology* 4, e368.
- Aragão, F.J., Barros, L.M., Brasileiro, A.C., Ribeiro, S.G., Smith, F.D., Sanford, J.C., Faria, J.C., Rech, E.L., 1996. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *TAG. Theoretical and applied genetics*. *Theoretische und angewandte Genetik* 93, 142-150.
- Blanco, L., Bernad, A., Lazaro, J.M., Martin, G., Garmendia, C., Salas, M., 1989. Highly efficient DNA synthesis by the phage phi 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *The Journal of biological chemistry* 264, 8935-8940.
- Blinkova, O., Victoria, J., Li, Y., Keele, B.F., Sanz, C., Ndjango, J.B., Peeters, M., Travis, D., Lonsdorf, E.V., Wilson, M.L., Pusey, A.E., Hahn, B.H., Delwart, E.L., 2010. Novel circular DNA viruses in stool samples of wild-living chimpanzees. *The Journal of general virology* 91, 74-86.
- Breitbart, M., Rohwer, F., 2005. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends in Microbiology* 13, 278-284.
- Cantalupo, P.G., Calgua, B., Zhao, G., Hundesa, A., Wier, A.D., Katz, J.P., Grabe, M., Hendrix, R.W., Girones, R., Wang, D., Pipas, J.M., 2011. Raw sewage harbors diverse viral populations. *mBio* 2.
- Castillo-Urquiza, G.P.e.a., 2007. GENETIC DIVERSITY OF BEGOMOVIRUS INFECTING TOMATO AND ASSOCIATED WEEDS IN SOUTHEASTERN BRAZIL. *Virus Reviews and Research* 12, 233.
- Cotmore, S.F., Tattersall, P., 1996. 28 Parvovirus DNA Replication.
- Choi, G.H., Nuss, D.L., 1992. Hypovirulence of chestnut blight fungus conferred by an infectious viral cDNA. *Science* 257, 800-803.
- Dayaram, A., Goldstien, S., Zavar-Reza, P., Gomez, C., Harding, J.S., Varsani, A., 2013. Novel ssDNA virus recovered from estuarine Mollusc (*Amphibola crenata*) whose replication associated protein (Rep) shares similarities with Rep-like sequences of bacterial origin. *The Journal of general virology* 94, 1104-1110.
- Dayaram, A., Opong, A., Jaschke, A., Hadfield, J., Baschiera, M., Dobson, R.C., Offei, S.K., Shepherd, D.N., Martin, D.P., Varsani, A., 2012. Molecular characterisation of a novel cassava associated circular ssDNA virus. *Virus research* 166, 130-135.
- Dekker, E.L., Woolston, C.J., Xue, Y.B., Cox, B., Mullineaux, P.M., 1991. Transcript mapping reveals different expression strategies for the bicistronic RNAs of the geminivirus wheat dwarf virus. *Nucleic acids research* 19, 4075-4081.
- Delwart, E., Li, L., 2012. Rapidly expanding genetic diversity and host range of the Circoviridae viral family and other Rep encoding small circular ssDNA genomes. *Virus research* 164, 114-121.
- Doyle, J.J., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue, pp. 13-15.
- Du, Z., Tang, Y., Zhang, S., She, X., Lan, G., Varsani, A., He, Z., 2014. Identification and molecular characterization of a single-stranded circular DNA virus with similarities to *Sclerotinia sclerotiorum* hypovirulence-associated DNA virus 1. *Archives of virology* 159, 1527-1531.
- Dunlap, D.S., Ng, T.F., Rosario, K., Barbosa, J.G., Greco, A.M., Breitbart, M., Hewson, I., 2013. Molecular and microscopic evidence of viruses in marine copepods. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 1375-1380.

- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* 32, 1792-1797.
- Edwards, R.A., Rohwer, F., 2005. Viral metagenomics. *Nat Rev Micro* 3, 504-510.
- Fancello, L., Trape, S., Robert, C., Boyer, M., Popgeorgiev, N., Raoult, D., Desnues, C., 2013. Viruses in the desert: a metagenomic survey of viral communities in four perennial ponds of the Mauritanian Sahara. *The ISME journal* 7, 359-369.
- Ge, X., Li, J., Peng, C., Wu, L., Yang, X., Wu, Y., Zhang, Y., Shi, Z., 2011. Genetic diversity of novel circular ssDNA viruses in bats in China. *The Journal of general virology* 92, 2646-2653.
- George, B., Ruhel, R., Mazumder, M., Sharma, V.K., Jain, S.K., Gourinath, S., Chakraborty, S., 2014. Mutational analysis of the helicase domain of a replication initiator protein reveals critical roles of Lys 272 of the B' motif and Lys 289 of the beta-hairpin loop in geminivirus replication. *The Journal of general virology* 95, 1591-1602.
- Ghabrial, S.A., Suzuki, N., 2009. Viruses of Plant Pathogenic Fungi. *Annual review of phytopathology* 47, 353-384.
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Wolf, Y.I., 1990. A new superfamily of putative NTP-binding domains encoded by genomes of small DNA and RNA viruses. *FEBS letters* 262, 145-148.
- Gutierrez, C., 1999. Geminivirus DNA replication. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 56, 313-329.
- Haible, D., Kober, S., Jeske, H., 2006. Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. *Journal of virological methods* 135, 9-16.
- Hillman, B.I., Supyani, S., Kondo, H., Suzuki, N., 2004. A reovirus of the fungus *Cryphonectria parasitica* that is infectious as particles and related to the coltivirus genus of animal pathogens. *Journal of virology* 78, 892-898.
- Ilyina, T.V., Koonin, E.V., 1992. Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes and archaeobacteria. *Nucleic acids research* 20, 3279-3285.
- Inoue-Nagata, A.K., Albuquerque, L.C., Rocha, W.B., Nagata, T., 2004. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi29 DNA polymerase. *Journal of virological methods* 116, 209-211.
- Kim, H.K., Park, S.J., Nguyen, V.G., Song, D.S., Moon, H.J., Kang, B.K., Park, B.K., 2012. Identification of a novel single-stranded, circular DNA virus from bovine stool. *The Journal of general virology* 93, 635-639.
- Kim, K.H., Chang, H.W., Nam, Y.D., Roh, S.W., Kim, M.S., Sung, Y., Jeon, C.O., Oh, H.M., Bae, J.W., 2008. Amplification of uncultured single-stranded DNA viruses from rice paddy soil. *Applied and environmental microbiology* 74, 5975-5985.
- Kim, M.S., Park, E.J., Roh, S.W., Bae, J.W., 2011. Diversity and abundance of single-stranded DNA viruses in human feces. *Applied and environmental microbiology* 77, 8062-8070.
- Kimura, K., Tomaru, Y., 2015. Discovery of two novel viruses expands the diversity of single-stranded DNA and single-stranded RNA viruses infecting a cosmopolitan marine diatom. *Applied and environmental microbiology* 81, 1120-1131.
- Koonin, E.V., 1993. A common set of conserved motifs in a vast variety of putative nucleic acid-dependent ATPases including MCM proteins involved in the initiation of eukaryotic DNA replication. *Nucleic acids research* 21, 2541-2547.
- Koonin, E.V., Ilyina, T.V., 1992. Geminivirus replication proteins are related to prokaryotic plasmid rolling circle DNA replication initiator proteins. *The Journal of general virology* 73 ( Pt 10), 2763-2766.
- Kraberger, S., Arguello-Astorga, G.R., Greenfield, L.G., Galilee, C., Law, D., Martin, D.P., Varsani, A., 2015. Characterisation of a diverse range of circular Rep-encoding DNA viruses recovered from a sewage treatment oxidation pond. *Infection, genetics and*

evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases.

- Krabberger, S., Stainton, D., Dayaram, A., Zawar-Reza, P., Gomez, C., Harding, J.S., Varsani, A., 2013. Discovery of *Sclerotinia sclerotiorum* Hypovirulence-Associated Virus-1 in Urban River Sediments of Heathcote and Styx Rivers in Christchurch City, New Zealand. *Genome announcements* 1.
- Krupovic, M., 2013. Networks of evolutionary interactions underlying the polyphyletic origin of ssDNA viruses. *Current opinion in virology* 3, 578-586.
- Krupovic, M., Bamford, D.H., 2010. Order to the viral universe. *Journal of virology* 84, 12476-12479.
- Krupovic, M., Forterre, P., 2015. Single-stranded DNA viruses employ a variety of mechanisms for integration into host genomes. *Annals of the New York Academy of Sciences*.
- Kunin, V., Copeland, A., Lapidus, A., Mavromatis, K., Hugenholtz, P., 2008. A bioinformatician's guide to metagenomics. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 72, 557-578, Table of Contents.
- Lamberto, I., Gunst, K., Muller, H., Zur Hausen, H., de Villiers, E.M., 2014. Mycovirus-like DNA virus sequences from cattle serum and human brain and serum samples from multiple sclerosis patients. *Genome announcements* 2.
- Laufs, J., Schumacher, S., Geisler, N., Jupin, I., Gronenborn, B., 1995a. Identification of the nicking tyrosine of geminivirus Rep protein. *FEBS letters* 377, 258-262.
- Laufs, J., Traut, W., Heyraud, F., Matzeit, V., Rogers, S.G., Schell, J., Gronenborn, B., 1995b. In vitro cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 3879-3883.
- Li, L., Kapoor, A., Slikas, B., Bamidele, O.S., Wang, C., Shaukat, S., Masroor, M.A., Wilson, M.L., Ndjango, J.B., Peeters, M., Gross-Camp, N.D., Muller, M.N., Hahn, B.H., Wolfe, N.D., Triki, H., Bartkus, J., Zaidi, S.Z., Delwart, E., 2010a. Multiple diverse circoviruses infect farm animals and are commonly found in human and chimpanzee feces. *Journal of virology* 84, 1674-1682.
- Li, L., Victoria, J.G., Wang, C., Jones, M., Fellers, G.M., Kunz, T.H., Delwart, E., 2010b. Bat guano virome: predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses. *Journal of virology* 84, 6955-6965.
- Londono, A., Riego-Ruiz, L., Arguello-Astorga, G.R., 2010. DNA-binding specificity determinants of replication proteins encoded by eukaryotic ssDNA viruses are adjacent to widely separated RCR conserved motifs. *Archives of virology* 155, 1033-1046.
- Minot, S., Sinha, R., Chen, J., Li, H., Keilbaugh, S.A., Wu, G.D., Lewis, J.D., Bushman, F.D., 2011. The human gut virome: inter-individual variation and dynamic response to diet. *Genome research* 21, 1616-1625.
- Mokili, J.L., Rohwer, F., Dutilh, B.E., 2012. Metagenomics and future perspectives in virus discovery. *Current opinion in virology* 2, 63-77.
- Muhire, B., Martin, D.P., Brown, J.K., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Zerbini, F.M., Rivera-Bustamante, R., Malathi, V.G., Briddon, R.W., Varsani, A., 2013. A genome-wide pairwise-identity-based proposal for the classification of viruses in the genus *Mastrevirus* (family *Geminiviridae*). *Archives of virology* 158, 1411-1424.
- Muhire, B.M., Varsani, A., Martin, D.P., 2014. SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PloS one* 9, e108277.
- Mullineaux, P.M., Guerineau, F., Accotto, G.P., 1990. Processing of complementary sense RNAs of *Digitaria* streak virus in its host and in transgenic tobacco. *Nucleic acids research* 18, 7259-7265.
- Nash, T.E., Dallas, M.B., Reyes, M.I., Buhrman, G.K., Ascencio-Ibanez, J.T., Hanley-Bowdoin, L., 2011. Functional analysis of a novel motif conserved across geminivirus Rep proteins. *Journal of virology* 85, 1182-1192.

- Nelson, J.R., Cai, Y.C., Giesler, T.L., Farchaus, J.W., Sundaram, S.T., Ortiz-Rivera, M., Hosta, L.P., Hewitt, P.L., Mamone, J.A., Palaniappan, C., Fuller, C.W., 2002. TempliPhi, phi29 DNA polymerase based rolling circle amplification of templates for DNA sequencing. *BioTechniques Suppl*, 44-47.
- Ng, T.F., Chen, L.F., Zhou, Y., Shapiro, B., Stiller, M., Heintzman, P.D., Varsani, A., Kondov, N.O., Wong, W., Deng, X., Andrews, T.D., Moorman, B.J., Meulendyk, T., MacKay, G., Gilbertson, R.L., Delwart, E., 2014. Preservation of viral genomes in 700-y-old caribou feces from a subarctic ice patch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 16842-16847.
- Ng, T.F., Duffy, S., Polston, J.E., Bixby, E., Vallad, G.E., Breitbart, M., 2011a. Exploring the diversity of plant DNA viruses and their satellites using vector-enabled metagenomics on whiteflies. *PLoS one* 6, e19050.
- Ng, T.F., Manire, C., Borrowman, K., Langer, T., Ehrhart, L., Breitbart, M., 2009. Discovery of a novel single-stranded DNA virus from a sea turtle fibropapilloma by using viral metagenomics. *Journal of virology* 83, 2500-2509.
- Ng, T.F., Marine, R., Wang, C., Simmonds, P., Kapusinszky, B., Bodhidatta, L., Oderinde, B.S., Wommack, K.E., Delwart, E., 2012. High variety of known and new RNA and DNA viruses of diverse origins in untreated sewage. *Journal of virology* 86, 12161-12175.
- Ng, T.F., Willner, D.L., Lim, Y.W., Schmieder, R., Chau, B., Nilsson, C., Anthony, S., Ruan, Y., Rohwer, F., Breitbart, M., 2011b. Broad surveys of DNA viral diversity obtained through viral metagenomics of mosquitoes. *PLoS one* 6, e20579.
- Orozco, B.M., Hanley-Bowdoin, L., 1996. A DNA structure is required for geminivirus replication origin function. *Journal of virology* 70, 148-158.
- Orozco, B.M., Hanley-Bowdoin, L., 1998. Conserved sequence and structural motifs contribute to the DNA binding and cleavage activities of a geminivirus replication protein. *The Journal of biological chemistry* 273, 24448-24456.
- Phan, T.G., Kapusinszky, B., Wang, C., Rose, R.K., Lipton, H.L., Delwart, E.L., 2011. The fecal viral flora of wild rodents. *PLoS pathogens* 7, e1002218.
- Rey, M.E., Ndunguru, J., Berrie, L.C., Paximadis, M., Berry, S., Cossa, N., Nuaila, V.N., Mabasa, K.G., Abraham, N., Rybicki, E.P., Martin, D., Pietersen, G., Esterhuizen, L.L., 2012. Diversity of dicotyledenous-infecting geminiviruses and their associated DNA molecules in southern Africa, including the South-west Indian ocean islands. *Viruses* 4, 1753-1791.
- Rosario, e.a., 2009. Diverse circovirus-like genome architectures revealed by environmental metagenomics. *The Journal of general virology* 90, 2418-2424.
- Rosario et al., 2012a. A field guide to eukaryotic circular single-stranded DNA viruses: insights gained from metagenomics. *Archives of virology* 157, 1851-1871.
- Rosario, K., Dayaram, A., Marinov, M., Ware, J., Kraberger, S., Stainton, D., Breitbart, M., Varsani, A., 2012b. Diverse circular ssDNA viruses discovered in dragonflies (Odonata: Epiprocta). *The Journal of general virology* 93, 2668-2681.
- Rosario, K., Duffy, S., Breitbart, M., 2009a. Diverse circovirus-like genome architectures revealed by environmental metagenomics. *The Journal of general virology* 90, 2418-2424.
- Rosario, K., Duffy, S., Breitbart, M., 2012c. A field guide to eukaryotic circular single-stranded DNA viruses: insights gained from metagenomics. *Archives of virology* 157, 1851-1871.
- Rosario, K., Marinov, M., Stainton, D., Kraberger, S., Wiltshire, E.J., Collings, D.A., Walters, M., Martin, D.P., Breitbart, M., Varsani, A., 2011. Dragonfly cyclovirus, a novel single-stranded DNA virus discovered in dragonflies (Odonata: Anisoptera). *The Journal of general virology* 92, 1302-1308.
- Rosario, K., Nilsson, C., Lim, Y.W., Ruan, Y., Breitbart, M., 2009b. Metagenomic analysis of viruses in reclaimed water. *Environmental microbiology* 11, 2806-2820.

- Rosario, K., Padilla-Rodriguez, M., Kraberger, S., Stainton, D., Martin, D.P., Breitbart, M., Varsani, A., 2013. Discovery of a novel mastrevirus and alphasatellite-like circular DNA in dragonflies (Ephemeroptera) from Puerto Rico. *Virus research* 171, 231-237.
- Roux, S., Enault, F., Robin, A., Ravet, V., Personnic, S., Theil, S., Colombet, J., Sime- Ngando, T., Debroas, D., 2012. Assessing the diversity and specificity of two freshwater viral communities through metagenomics. *PLoS one* 7, e33641.
- Rybicki, E.P., Pietersen, G., 1999. Plant virus disease problems in the developing world. *Advances in virus research* 53, 127-175.
- Sachsenroder, J., Twardziok, S., Hammerl, J.A., Janczyk, P., Wrede, P., Hertwig, S., Johne, R., 2012. Simultaneous identification of DNA and RNA viruses present in pig faeces using process-controlled deep sequencing. *PLoS one* 7, e34631.
- Sambrook, J., Maniatis, T., Fritsch, E.F., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press., NY.
- Sano, E., Carlson, S., Wegley, L., Rohwer, F., 2004. Movement of viruses between biomes. *Applied and environmental microbiology* 70, 5842-5846.
- Schalk, H.J., Matzeit, V., Schiller, B., Schell, J., Gronenborn, B., 1989. Wheat dwarf virus, a geminivirus of graminaceous plants needs splicing for replication. *The EMBO journal* 8, 359-364.
- Shan, T., Li, L., Simmonds, P., Wang, C., Moeser, A., Delwart, E., 2011. The fecal virome of pigs on a high-density farm. *Journal of virology* 85, 11697-11708.
- Sigma-Aldrich, 2015. Sigma-Aldrich, Estados Unidos.
- Sikorski, A., 2013. Molecular characterisation of novel single stranded DNA viruses recovered from animal faeces, Biological Sciences. University of Canterbury. , University of Canterbury. Biological Sciences, p. 87.
- Sikorski, A., Arguello-Astorga, G.R., Dayaram, A., Dobson, R.C., Varsani, A., 2013a. Discovery of a novel circular single-stranded DNA virus from porcine faeces. *Archives of virology* 158, 283-289.
- Sikorski, A., Massaro, M., Kraberger, S., Young, L.M., Smalley, D., Martin, D.P., Varsani, A., 2013b. Novel myco-like DNA viruses discovered in the faecal matter of various animals. *Virus research* 177, 209-216.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution* 24, 1596-1599.
- Tattersall, P., Ward, D.C., 1976. Rolling hairpin model for replication of parvovirus and linear chromosomal DNA. *Nature* 263, 106-109.
- van den Brand, J.M., van Leeuwen, M., Schapendonk, C.M., Simon, J.H., Haagmans, B.L., Osterhaus, A.D., Smits, S.L., 2012. Metagenomic analysis of the viral flora of pine marten and European badger feces. *Journal of virology* 86, 2360-2365.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., Gay, N.J., 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO journal* 1, 945-951.
- Wren, J.D., Roossinck, M.J., Nelson, R.S., Scheets, K., Palmer, M.W., Melcher, U., 2006. Plant virus biodiversity and ecology. *PLoS biology* 4, e80.
- Wright, E.A., Heckel, T., Groenendijk, J., Davies, J.W., Boulton, M.I., 1997. Splicing features in maize streak virus virion- and complementary-sense gene expression. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 12, 1285-1297.
- Yoon-Robarts, M., Blouin, A.G., Bleker, S., Kleinschmidt, J.A., Aggarwal, A.K., Escalante, C.R., Linden, R.M., 2004. Residues within the B' Motif Are Critical for DNA Binding by the Superfamily 3 Helicase Rep40 of Adeno-associated Virus Type 2. *Journal of Biological Chemistry* 279, 50472-50481.
- Yu, X., Li, B., Fu, Y., Jiang, D., Ghabrial, S.A., Li, G., Peng, Y., Xie, J., Cheng, J., Huang, J., Yi, X., 2010. A geminivirus-related DNA mycovirus that confers hypovirulence to

a plant pathogenic fungus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107, 8387-8392.

- Yu, X., Li, B., Fu, Y., Xie, J., Cheng, J., Ghabrial, S.A., Li, G., Yi, X., Jiang, D., 2013. Extracellular transmission of a DNA mycovirus and its use as a natural fungicide. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110, 1452-1457.
- Zuker, M., 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic acids research 31, 3406-3415.