SÁVIO DE SIQUEIRA FERREIRA

CARACTERIZAÇÃO DE UM BEGOMOVÍRUS OBTIDO DE MARACUJAZEIRO (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) E PRODUÇÃO DE CLONES INFECCIOSOS

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

SÁVIO DE SIQUEIRA FERREIRA

CARACTERIZAÇÃO DE UM BEGOMOVÍRUS OBTIDO DE MARACUJAZEIRO (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) E PRODUÇÃO DE CLONES INFECCIOSOS

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

APROVADA: 31 de julho de 2008.

Prof[a]. Claudine Márcia Carvalho	Prof. Sérgio Oliveira de Paula
Prof. Francisco Murilo Zerbini Júnior (Co-orientador)	Prof[a]. Juliana Lopes Rangel Fietto (Co-orientadora)

Prof[a]. Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar em meu caminho, iluminando e permitindo a conquista de mais essa vitória;

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

À Professora Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo, pela amizade, pelo incentivo sempre presente, dedicação e confiança em meu trabalho;

Ao Professor Francisco Murilo Zerbini, pelo suporte profissional, orientação, dedicação e amizade durante a realização deste trabalho;

Aos amigos do Laboratório de Virologia Vegetal Molecular, Adriana, Alison, Álvaro, Ana Verônica, Antônio Wilson, Bruno, Carlos de Ocesano, Carlos Joulbert, Carol, Dani, Eduardo Chumbinho, Evando, Flávia, Fernanda, Fabio, Glória, Janmson, Jorge, Lidiane, Madelaine, Marília, Miguel, Poliane, Renan, Renata, Riani, Tathiana, pela amizade e pelo agradável ambiente de trabalho;

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

Aos amigos do laboratório de Infectologia Molecular Animal, Fernanda Miquelitto, Camila, Monique, Sâmia, Carol, Dani, Humberto, Orlando e Ronny, pela amizade e experiência adquirida durante minha passagem por esse laboratório;

Aos amigos Alan, André, Daniel, Maycon, Guilherme, Marcos e Rodrigo, aos quais agradeço em especial pela longa amizade, momentos de descontração, incentivo, apoio profissional e intelectual, e por me agüentarem durante todos esses anos de Viçosa;

Aos meus pais, Jaci e Maria Augusta, por acreditarem em mim, pelo suporte em todos os sentidos, pelo incentivo constante, pelo amor, compreensão, atenção e por me ensinarem seus valores, que me guiam durante toda minha vida;

Aos meus irmãos, Sílvio e Daniel, por acreditarem em mim e serem presentes ao longo de minha vida;

À minha avó, Matilde, pelo carinho, amor e por me acolher sempre que precisei;

À Maísa, pelo carinho, atenção, força e apoio nos momentos finais deste trabalho;

A todos que ajudaram e apoiaram durante esses anos e contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

SÁVIO DE SIQUEIRA FERREIRA, filho de Jaci Januário Ferreira e Maria Augusta de Siqueira Ferreira, nasceu em Ouro Preto, Minas Gerais, no dia 17 de fevereiro de 1984.

Residiu e estudou os primeiros sete anos do ensino fundamental na cidade de Araxá, Minas Gerais, quando em 1994 mudou-se para Vila dos Cabanos, Barcarena, Pará, onde concluiu o ensino fundamental. No ano de 1998, mudou-se para a cidade de Passos, Minas Gerais, onde cursou e concluiu o ensino médio. Graduou-se em Bacharelado em Bioquímica pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), na cidade de Viçosa, Minas Gerais, em outubro de 2006. Ingressou, nesse mesmo mês, no curso de pós-graduação em Bioquímica Agrícola em nível de mestrado na Universidade Federal de Viçosa. Em agosto de 2008, submeteu-se à defesa de dissertação.

SUMÁRIO

RESUMO vi
ABSTRACT viii
1. INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO DE LITERATURA 5
2.1. Família *Geminiviridae* 5
2.2. Replicação viral 7
2.3. Movimento célula-a-célula e longa distância 9
2.4. Reprogramação do ciclo celular da planta por geminivírus 10
2.5. Supressão de respostas de defesa da planta por geminivírus 11
3. MATERIAIS E MÉTODOS 13
3.1. Isolado viral 13
3.2. Clonagem e seqüenciamento do genoma viral 13
3.3. Comparação de seqüências e análise filogenética 14
3.4. Construção dos clones infecciosos 15
3.5. Teste de infectividade e gama de hospedeiros 16
4. RESULTADOS 18
4.1. Clonagem do genoma viral 18
4.2. Seqüenciamento do genoma viral e análise comparativa das seqüencias 20
4.4. Produção dos clones infecciosos 36
4.5. Teste de infectividade e gama de hospedeiros 40

5. DISCUSSÃO 46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 51
ANEXOS 57

RESUMO

FERREIRA, Sávio de Siqueira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2008. **Caracterização de um begomovírus obtido de maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e produção de clones infecciosos**. Orientadora: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo. Co-orientadores: Francisco Murilo Zerbini Júnior, Poliane Alfenas-Zerbini e Juliana Lopes Rangel Fietto.

Os begomovírus (família *Geminiviridae*) possuem genoma de DNA circular de fita simples, encapsidado em partículas icosaédricas imperfeitas geminadas. São transmitidos pela mosca-branca *Bemisia tabaci* e causam doenças de grande importância econômica em diversas culturas, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, os begomovírus são um grande problema fitossanitário nas culturas do tomateiro e feijoeiro, e relatos recentes confirmam sua presença também na cultura do maracujazeiro. Apesar da baixa incidência, sua importância na cultura do maracujazeiro não deve ser subestimada, devido à severidade dos sintomas e incapacidade da planta de recuperar-se da infecção causada por esses begomovírus. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização molecular e biológica do isolado BR:LNS2:Pas:01 de begomovírus obtido de maracujazeiro em Livramento de Nossa Senhora, BA. Para isso, foi realizada a clonagem e seqüenciamento do genoma viral (DNA-A e DNA-B). A análise das seqüências

demonstrou que o DNA-A do BR:LNS2:Pas:01 possui cinco ORFs correspondentes aos genes *cp, rep, trap, ren* e *ac4*, e outras duas ORFs com alta identidade de seqüência com a ORF AC5. O DNA-B possui ORFs correspondentes aos genes *mp* e *nsp*. O DNA-A do isolado BR:LNS2:Pas:01 possui maior identidade de seqüência com o *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) (77%), e o DNA-B com o *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) (74%). Esses valores indicam tratar-se de uma nova espécie, para a qual é proposto o nome Passion flower severe leaf distortion virus (PSLDV). A análise filogenética agrupou o DNA-A do PSLDV no mesmo ramo monofilético do TGMV, e o DNA-B no mesmo ramo monofilético do ToYSV. A caracterização biológica consistiu na determinação da gama de hospedeiros do PSLDV-[BR:LNS2:Pas:01], inoculando-se clones infecciosos via biobalística em diversas espécies/cultivares de plantas. Plantas das famílias *Passifloraceae* e *Solanaceae* foram hospedeiras do vírus, mas apesar do alto relacionamento filogenético com os vírus de tomateiro do Brasil, o PSLDV-[BR:LNS2:Pas:01] não foi capaz de infectar plantas dessa espécie.

ABSTRACT

FERREIRA, Sávio de Siqueira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2008. **Characterization of a begomovirus obtained from yellow passionfruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) and production of infectious clones.** Adviser: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo. Co-advisers: Francisco Murilo Zerbini Júnior, Poliane Alfenas-Zerbini and Juliana Lopes Rangel Fietto.

Begomoviruses (family *Geminiviridae*) possess a circular, single-stranded DNA genome encapsidate in twinned icosahedral particles. They are vectored by the whitefly *Bemisia tabaci* and cause economically important diseases in several crops, mainly in tropical and subtropical regions. In Brazil, begomoviruses are major pathogens in common bean and tomato crops, and recent reports have confirmed their presence in yellow passionfruit. In spite of the low incidence, their importance in this crop should not be underestimated, due to the severity of the disease and the plant's inability to recover from the infection. The objective of this work was to carry out the molecular and biological characterization of the begomovirus isolate BR:LNS2:Pas:01, obtained from yellow passionfruit plants in Livramento de Nossa Senhora, Bahia state. The viral genome (DNA-A and DNA-B) was cloned and sequenced. Sequence analysis demonstrated that the BR:LNS2:Pas:01 DNA-A has five ORFs corresponding to the genes *cp, rep, trap, ren* and *ac4*, and two additional

ORFs with high sequence identity with the AC5 ORF. The DNA-B has two ORFs corresponding to the genes *mp* and *nsp*. The DNA-A of isolate BR:LNS2:Pas:01 has the highest nucleotide sequence identity with *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) (77%), and the DNA-B with *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) (74%). These identity values indicate that this isolate represents a new begomovirus species, for which the name Passion flower severe leaf distortion virus (PSLDV) is proposed. Phylogenetic analysis clustered the PSLDV DNA-A in a monophyletic branch with TGMV, and the DNA-B in a monophyletic branch with ToYSV. Biological characterization consisted in the determination of the isolate's host range, via biolistic inoculation of infectious clones in plants of several species/cultivars. The host range was restricted to species from the *Passifloraceae* and *Solanaceae* families. However, in spite of the high sequence identity between PSLDV-[BR:LNS2:Pas:01] and tomato begomoviruses, the virus was not capable of infecting tomato.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora*, da família *Passifloraceae,* possui mais de 580 espécies de plantas, sendo mais de 150 nativas do Brasil (Bruckner *et al.*, 2002). Dentre elas destaca-se o maracujá, largamente consumido no Brasil tanto na forma *in natura* quanto processado. Além de ser apreciado pelo seu sabor, o maracujá possui diversas outras qualidades, sendo fonte de vitaminas A e C, e possuindo propriedades medicinais. O maracujá pode ser utilizado de forma complementar em casos de ansiedade e insônia, e também no controle de febres e inflamações de pele, dentre outros problemas de saúde (Dhawan *et al.*, 2004).

Apesar de o gênero *Passiflora* possuir diversas espécies de plantas que produzem frutos comestíveis, apenas três espécies são cultivadas: o maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis.), o maracujá-roxo (*Passiflora edulis* Sims.) e o maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg). Os dois últimos representam mais de 90% da área cultivada com maracujá no mundo (Faleiro *et al.*, 2005).

Dentre os países produtores de maracujá destacam-se o Brasil, Equador e Colômbia. O Brasil é responsável por cerca de 70% da produção mundial. O valor da produção nacional foi estimado em 367 milhões de reais em 2006, com uma produção de 615.196 toneladas em uma área de 45.327 ha. Com exceção de Roraima e Rio Grande do

Sul, todos os estados brasileiros cultivam maracujá comercialmente. Os principais estados produtores são a Bahia e o Ceará, com 207.962 e 101.035 toneladas produzidas em 2006, respectivamente. Também se destacam os estados do Espírito Santo (72.079 ton), Pará (46.167 ton), Minas Gerais (42.767 ton) e Sergipe (41.919 ton) (IBGE, 2006).

Dentre as doenças que afetam a cultura do maracujá, destacam-se a murcha e a antracnose, causadas pelos fungos *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*, respectivamente; a bacteriose, cujo agente etiológico é a bactéria *Xanthomonas campestris*; e as doenças de etiologia viral. A principal virose do maracujá é o endurecimento dos frutos, que pode ser causada pelos potyvírus *Passionfruit woodiness virus* (PWV) ou *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) (Nascimento *et al.*, 2006), seguida da doença da pinta verde, causada pelo Passionfruit green spot virus (PGSV) (Faleiro *et al.*, 2005).

Infecção de maracujazeiro por begomovírus foi relatada pela primeira vez em Porto Rico (Brown *et al.*, 1993). O primeiro relato de begomovírus infectando plantas de maracujá no Brasil (em infecção mista com o CABMV) foi feito em 2002, em Livramento de Nossa Senhora, BA, onde 100% das 10.000 plantas de um plantio comercial de maracujazeiro apresentavam sintomas de infecção viral, e também em pomares de Bom Jesus da Lapa, BA (Novaes *et al.*, 2002). Um begomovírus também foi identificado em plantas de maracujá em Anadia, AL (Silva *et al.*, 2006). Entretanto, não foi realizada a caracterização molecular completa de nenhum desses isolados. O isolado de Livramento de Nossa Senhora, denominado LNS-BZ, foi parcialmente caracterizado e a espécie viral tentativamente denominada Passion flower little leaf mosaic virus (PLLMV) (Novaes *et al.*, 2003).

Os begomovírus pertencem à família *Geminiviridae*, uma das principais famílias de vírus de plantas. Estão amplamente distribuídos em regiões tropicais e subtropicais,

infectando diversas culturas (Moriones e Navas-Castillo, 2000; Legg e Fauquet, 2004; Morales, 2006; Chatterjee e Ghosh, 2007). A família *Geminiviridae* engloba vírus cujo genoma é composto por DNA circular fita simples, e que possuem capsídeo formado por dois icosaedros imperfeitos geminados (Rojas *et al.*, 2005). A familia é dividida em quatro gêneros: *Begomovirus*, *Mastrevirus*, *Curtovirus* e *Topocuvirus*. Apenas os mastrevírus infectam monocotiledôneas, enquanto os demais infectam dicotiledôneas. O gênero *Begomovirus* é o mais numeroso entre os geminivírus, possuindo 181 espécies (Fauquet *et al.*, 2008). Diferentemente dos demais geminivírus, que são transmitidos por cigarrinhas, o inseto vetor dos begomovírus é a mosca-branca (*Bemisia tabaci*). Os mastrevírus, curtovírus e topocuvírus possuem um componente genômico, enquanto os begomovírus possuem um ou dois componentes genômicos (Stanley *et al.*, 2005). Diversas espécies de begomovírus que ocorrem no hemisfério oriental possuem apenas um componente genômico, e frequentemente estão associadas a um DNA satélite denominado DNA β (Mansoor *et al.*, 2003). Já os begomovírus das Américas possuem dois componentes genômicos, denominados DNA-A e DNA-B. As proteínas envolvidas na replicação e encapsidação viral são codificadas pelo DNA-A, enquanto o DNA-B codifica as proteínas responsáveis pelo movimento do vírus na planta (Lazarowitz, 1992).

A recombinação entre geminivírus é um evento freqüente (Padidam *et al.*, 1999), sendo especialmente freqüente entre os begomovírus, o que poderia explicar a grande diversidade genética das espécies do gênero. Diversos relatos já demonstraram a ocorrência de recombinantes naturais de begomovírus, como por exemplo, entre *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) e *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) em tomateiro na Espanha (Monci *et al.*, 2002), e entre *African cassava mosaic virus* (ACMV) e *East African cassava mosaic virus* (EACMV) em mandioca em Uganda (Zhou *et al.*, 1997). Nesses casos, o vírus recombinante obteve uma vantagem adaptativa, pois passou a

infectar novos hospedeiros em relação aos vírus parentais, além de induzir sintomas mais severos. Além disso, foram identificadas regiões de alta taxa de recombinação em um complexo de begomovírus monossegmentados em ilhas da costa sudeste da África, sugerindo que a diversidade desse complexo é em grande parte explicada pela recombinação (Lefeuvre *et al.*, 2007).

Outra fonte importante de geração de variabilidade genética entre begomovírus bissegmentados é a pseudo-recombinação. Nesse caso, a proteína Rep de um vírus reconhece e passa a direcionar a replicação do DNA-B de outro vírus. Esse fenômeno foi demonstrado ocorrer entre begomovírus de tomateiro e plantas daninhas no Brasil (Andrade *et al.*, 2006).

Por serem vírus com alta taxa de variabilidade genética devido aos mecanismos de recombinação e pseudo-recombinção, a evolução e adaptação dos begomovírus a novos hospedeiros pode ocorrer rapidamente. Considerando-se a grande incidência e diversidade genética de begomovírus em plantas cultivadas e silvestres no Brasil, é possível que os relatos iniciais de begomovírus em maracujazeiro representem a emergência de uma ou mais novas espécies adaptadas a esse hospedeiro. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi caracterizar um isolado de begomovírus obtido de plantas de maracujá-amarelo no estado da Bahia. Os objetivos específicos incluíram: (i) a clonagem dos dois componentes genômicos (DNA-A e DNA-B) do vírus; (ii) a caracterização molecular, por meio da análise das seqüências de nucleotídeos dos dois componentes genômicos, e sua comparação com outras espécies de begomovírus; (iii) a obtenção de clones infecciosos do vírus, por meio de clonagem de 1,5 cópia de cada componente genômico entre duas origens de replicação; e (iv) a determinação da gama de hospedeiros do vírus.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Família *Geminiviridae*

A família *Geminiviridae* compreende vírus com genoma de DNA circular fita simples, com aproximadamente 2600 nucleotídeos. Os vírions são compostos por apenas uma proteína capsidial (CP), sendo o capsídeo formado por dois icosaedros imperfeitos geminados (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). A hipótese mais aceita sobre a origem dos geminivírus propõe que eles evoluíram a partir de bacteriófagos como φX174, ou de plasmídeos bacterianos com genoma de DNA fita simples (Koonin e Ilyina, 1992).

A família é subdividida em quatro gêneros: *Mastrevirus, Curtovirus, Topocuvirus e Begomovirus* (Stanley *et al.*, 2005). O gênero *Mastrevirus* inclui vírus que infectam monocotiledôneas, transmitidos por cigarrinhas (Homoptera:Cicadellidae) e que possuem apenas um componente genômico. O *Maize streak virus* (MSV) e o *Wheat dwarf virus* (WDV) causam prejuízos econômicos nas culturas do milho e trigo, respectivamente. O gênero *Curtovirus* inclui vírus que infectam dicotiledôneas, transmitidos por cigarrinhas (Homoptera:Cicadellidae) e que também possuem apenas um componente genômico. Os curtovírus teriam se originado a partir de eventos de recombinação entre vírus dos gêneros *Mastrevirus* e *Begomovirus* (Rybicki, 1994). O gênero *Topocuvirus* possui apenas uma espécie (*Tomato pseudo-curly top virus*, TPCTV), que possui um componente genômico e é transmitida por cigarrinhas (Homoptera:Auchenorrhyncha) a plantas dicotiledôneas. O

gênero *Begomovirus* possui o maior número de espécies dentre os geminivírus, com 181 espécies reconhecidas atualmente (Fauquet *et al.*, 2008). São vírus que infectam dicotiledôneas, transmitidos por mosca-branca (*Bemisia tabaci*; Homoptera:Aleyrodidae) e que podem possuir um ou dois componentes genômicos.

Diversos begomovírus que ocorrem na Ásia, África, Europa e Oceania ("Velho Mundo") apresentam apenas um componente genômico, freqüentemente associado a um DNA satélite (DNA β). Os satélites são ácidos nucléicos infecciosos que dependem de um vírus auxiliar para replicação e encapsidação (Briddon *et al.*, 2003). O DNA β é essencial para a severidade dos sintomas, e infecções causadas apenas pelo vírus auxiliar não são capazes de reproduzir os sintomas da doença (Briddon *et al.*, 2003; Mansoor *et al.*, 2003). A importância do DNA β no desenvolvimento da doença se deve ao fato de que este DNA satélite codifica uma proteína supressora de silenciamento, denominada βC1 (Cui *et al.*, 2005), inativando um componente importante da resposta de defesa da planta.

Os begomovírus das Américas possuem dois componentes genômicos, denominados DNA-A e DNA-B. Os componentes genômicos de uma mesma espécie não possuem identidade de seqüência, exceto por uma região de aproximadamente 200 nucleotídeos, denominada região comum (RC), que é altamente conservada (acima de 90% de identidade). Na RC localiza-se a origem de replicação dos geminivírus.

O DNA-A de begomovírus codifica quatro proteínas: a proteína associada à replicação (Rep, "replication-associated protein"), cuja função é reconhecer e se ligar à origem de replicação e iniciar a síntese de DNA viral via mecanismo de círculo rolante (Fontes *et al.*, 1992; Orozco *et al.*, 1997); uma proteína transativadora da transcrição dos genes *cp* e *nsp* (TrAP, "trans-activating protein"), que também atua como supressora de silenciamento (Voinnet *et al.*, 1999); uma proteína acessória à replicação (Ren, "replication-enhancer protein"), que aumenta o nível de acúmulo de DNA viral (Sunter *et*

al., 1990; Pedersen e Hanley-Bowdoin, 1994); e a proteína capsidial (CP), responsável pela encapsidação do genoma viral e essencial para transmissão pelo inseto vetor (Briddon *et al.*, 1990; Hofer *et al.*, 1997). Alguns begomovírus codificam a proteína AC4, que também está envolvida na supressão de silenciamento gênico (Vanitharani *et al.*, 2004). O DNA-B, por sua vez, codifica uma proteína de movimento célula-a-célula (MP, "movement protein") responsável pelo aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas (Noueiry *et al.*, 1994) e a proteína NSP ("nuclear shuttle protein") responsável pelo transporte do DNA viral através dos poros nucleares (Noueiry *et al.*, 1994; Sanderfoot *et al.*, 1996).

2.2. Replicação viral

Os geminivírus replicam no núcleo das células infectadas, e por não codificarem uma polimerase, dependem da maquinaria de replicação celular. Em uma célula infectada, o ssDNA viral é transportado para o núcleo, onde é convertido em dsDNA, que serve de molde tanto para a replicação como para a transcrição. A replicação ocorre por dois mecanismos: círculo rolante e replicação dependente de recombinação (RDR). O primeiro, melhor caracterizado, ocorre de forma semelhante ao mecanismo utilizado pelos bacteriófagos φX174 e M13 (Stanley, 1995). O segundo ocorre via recombinação homóloga entre um ssDNA e um DNA circular covalentemente fechado ("covalently closed circular" - cccDNA) (Jeske *et al.*, 2001; Preiss e Jeske, 2003).

A replicação por círculo rolante inicia-se com a clivagem da fita viral pela proteína Rep. A clivagem ocorre na origem de replicação especificamente em uma seqüência invertida rica em guanina e citosina, que forma uma estrutura em forma de grampo. Essa seqüência possui o nonanucleotídeo 5'-TAATATTAC-3', invariável entre os geminivírus (Lazarowitz, 1992), que constitui a origem funcional de replicação. A proteína Rep cliva a ligação entre o sétimo e o oitavo nucleotídeo dessa seqüência (TAATATT*AC) (Laufs *et al.*, 1995a), expondo uma extremidade 3'-OH livre que servirá de iniciador para a

replicação do DNA viral (Gutierrez, 1999; Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). Após a clivagem, a DNA polimerase do hospedeiro irá sintetizar várias unidades do genoma viral ligadas covalentemente (concatâmeros), utilizando a fita complementar como molde. A própria proteína Rep cliva o concatâmero, liberando as unidades genômicas, e religa as extremidades refazendo o círculo de ssDNA (Laufs *et al.*, 1995b), correspondente a uma unidade do genoma viral.

A proteína Rep se liga na forma de oligômeros ao DNA (Orozco *et al.*, 2000) para a iniciação da replicação por círculo rolante. Essa ligação é dependente de *cis*-elementos denominados iterons, presentes na região comum, que são constituídos de duas repetições diretas de quatro nucleotídeos e uma repetição invertida (Gutierrez, 1999). O reconhecimento dos iterons por Rep é considerado vírus-específico (Argüello-Astorga *et al.*, 1994; Harrison e Robinson, 1999), de modo que Rep só inicia a replicação do seu DNA cognato.

A replicação dependente de recombinação (RDR) foi proposta pela identificação de intermediários de replicação viral do *Abutilon mosaic virus* (AbMV) que não poderiam ser explicados pelo mecanismo de círculo rolante (Jeske *et al.*, 2001). Posteriormente, esses intermediários também foram identificados para os geminivírus *African cassava mosaic virus* (ACMV), *Beet curly top virus* (BCTV), *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) e *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Preiss e Jeske, 2003), indicando que a RDR é um mecanismo geral entre os geminivírus. Além disso, também já foram encontrados indícios que sugerem que DNAs satélites associados ao *Tomato leaf curl virus* (ToLCV), bem como o CLCuD ("cotton leaf curl disease") DNA β, também replicam via RDR, além de replicarem via círculo rolante (Alberter *et al.*, 2005).

O início da RDR se dá quando uma molécula incompleta de ssDNA interage com um cccDNA, em um sítio de recombinação homóloga. O ssDNA é então elongado tendo

como molde o cccDNA, sintetizando-se assim um ssDNA completo, que então será molde para a síntese da fita complementar. Ainda não está bem esclarecido se o mecanismo é direcionado pelas proteínas do hospedeiro responsáveis pelo mecanismo de recombinação homóloga para reparo de DNA celular, ou se é dependente das proteínas virais. Até o presente momento, não se sabe o papel das proteínas virais nesse mecanismo, mas há indícios de que Trap e Ren não são essenciais (Jeske *et al.*, 2001). Além disso, ainda não se sabe qual dos mecanismos de replicação é favorecido *in vivo.*

O modelo RDR explica diversos fenômenos biológicos relacionados aos geminivírus. Primeiramente, a rápida e freqüente recombinação. Além disso, a RDR poderia fornecer vantagens adaptativas. Se a replicação viral normal for obstruída pela falta de nucleotídeos, digestão do DNA viral pelas enzimas do hospedeiro ou conflitos entre replicação e transcrição, as moléculas de DNA incompletas podem ser recuperadas pela recombinação homóloga e serem convertidas em genomas virais completos (Jeske *et al.*, 2001).

2.3. Movimento célula-a-célula e longa distância

O sucesso da infecção viral, e conseqüentemente do estabelecimento da infecção sistêmica na planta, depende, além da replicação viral, da capacidade do vírus em se mover para outras células e assim espalhar-se por toda a planta. Para isso, todos os vírus de planta codificam proteínas responsáveis pelo movimento do seu genoma para outras células. Os begomovírus bissegmentados codificam no DNA-B duas proteínas que possuem função de movimento, NSP e MP. Pelo fato de os geminivírus replicarem no núcleo das células infectadas, a primeira fase do movimento se dá com o transporte do genoma viral do núcleo para o citoplasma, processo que é realizado pela proteína NSP. Numa segunda etapa, o DNA viral é transportado para as células vizinhas pelo aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas mediado por MP (Noueiry *et al.*, 1994). Estudos recentes

sugerem um modelo no qual NSP transporta o DNA viral para a periferia da célula, facilitando o movimento do genoma viral célula-a-célula. Nesse modelo, a proteína MP seria a responsável pelo redirecionamento de NSP para a periferia da célula (Frischmuth *et al.*, 2007). Além disso, a NSP interage com uma GTPase celular (NIG, "NSP-interacting GTPase"), que promove o redirecionamento da proteína viral para o citoplasma (Carvalho *et al.*, 2008). Assim, o movimento do genoma viral é resultado da ação cooperativa entre as duas proteínas de movimento, permitindo o estabelecimento da infecção sistêmica (Sanderfoot e Lazarowitz, 1995; 1996).

Em begomovírus monossegmentados, como o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), a proteína CP é essencial para a infecção sistêmica, sendo responsável pelo tráfego do DNA viral entre núcleo e citoplasma, e o movimento célula-a-célula é mediado pelas proteínas V1 e/ou C4 (Rojas *et al.*, 2001). Além disso, para um recombinante natural do begomovírus bissegmentado *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), a infecção sistêmica se estabelece mesmo na ausência do DNA-B, com a função de movimento sendo provavelmente suprida pela proteína CP (Fontenelle *et al.*, 2007). Entretanto, para a maioria absoluta dos begomovírus bissegmentados, a CP é dispensável para o estabelecimento de infecção sistêmica (Rojas *et al.*, 2005).

2.4. Reprogramação do ciclo celular da planta por geminivírus

Por se tratarem de vírus com genoma de DNA que não codificam sua própria DNA polimerase, os geminivírus dependem da maquinaria de replicação da célula hospedeira para replicar seu genoma. Como infectam células totalmente diferenciadas, onde não ocorre síntese de DNA, os geminivírus devem reprogramar o ciclo celular, induzindo a célula hospedeira a sintetizar novamente a maquinaria de replicação e, conseqüentemente, fornecer o aparato enzimático necessário para a replicação viral. De fato, a infecção pelo *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) induz a síntese de DNA em células totalmente

diferenciadas (Nagar *et al.*, 2002). Alem disso, em células infectadas pelo TGMV, há um maior acúmulo de PCNA ("proliferating cell nuclear antigen"), proteína celular envolvida na replicação de DNA (Nagar *et al.*, 1995).

A reprogramação do ciclo celular é mediada pelas proteínas virais Rep e Ren, que interagem com a proteína pRB ("plant retinoblastoma") (Settlage *et al.*, 2001; Arguello-Astorga *et al.*, 2004), que está diretamente envolvida no controle do ciclo celular. pRB impede que ocorra a passagem da fase G1 para a fase S, regulando negativamente os genes necessários para essa transição (Lavia e Jansen-Durr, 1999). A interação de Rep e Ren com pRB impediria a fosforilação de pRB pela cinase dependente de ciclina, o que acarretaria a perda da capacidade de pRB em inibir a entrada da célula na fase S.

2.5. Supressão de respostas de defesa da planta por geminivírus

A proteína Trap, além de funcionar como transativadora dos genes *cp* e *nsp* (Sunter e Bisaro, 1992; 1997; Sunter e Bisaro, 2003), atua também na supressão de respostas de defesa da planta à infecção viral. O silenciamento gênico é um mecanismo de resposta antiviral conservado em diversos organismos, incluindo plantas e animais (Ding *et al.*, 2004). Trap é capaz de suprimir essa resposta antiviral, atuando como um supressor de silenciamento gênico (Wang *et al.*, 2005), e ainda transativando genes do hospedeiro que podem estar relacionados ao controle do mecanismo de silenciamento (Trinks *et al.*, 2005). Trap interage com a proteína celular ADK ("adenosine kinase"), inativando-a, e a supressão do silenciamento gênico mediado por Trap é dependente da inativação dessa cinase (Wang *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005).

Além de ADK, Trap também interage a cinase SNF1 ("sucrose non-fermenting 1"), proteína reguladora do metabolismo energético da planta que responde à diminuição dos níveis de ATP, inativando vias biossintéticas que consomem ATP e ativando vias alternativas de produção de ATP. Plantas superexpressando SNF1 apresentam aumento na

resistência à infecção viral, e plantas silenciadas para SNF1 são mais suscetíveis (Hao *et al.*, 2003). Esses dados sugerem que SNF1 faz parte do mecanismo de resposta antiviral inata da planta, e que os geminivírus evoluíram de forma a contra-atacar esse mecanismo, inativando SNF1 por meio da interação com Trap.

Alguns geminivírus codificam a proteína AC4, que também possui atividade de supressão de silenciamento. O papel diferenciado de Trap e AC4 na supressão de silenciamento pode conferir características distintas ao desenvolvimento da doença causada por diferentes espécies de geminivírus (Vanitharani *et al.*, 2004).

A interação entre uma serina/treonina cinase celular, denominada LeNIK ("*Lycopersicum esculentum* NSP-interacting kinase") e a proteína viral NSP foi demonstrada utilizando-se o sistema de duplo-híbrido de levedura (Mariano *et al.*, 2004). A proteína NIK possui domínios característicos de proteínas receptoras de membranas envolvidas no desenvolvimento da planta ou em resistência a patógenos. Também foi comprovado que os homólogos de NIK em soja (GmNIK) e *Arabidopsis thaliana* (AtNIK) interagem com NSP (Fontes *et al.*, 2004). Em *Arabidopsis*, NIK atua como receptor de sinalização. A interação de NSP com NIK inibe a sua atividade de cinase e conseqüentemente a autofosforilação de NIK, que antecede sua oligomerização, sugerindo envolvimento de NIK na resposta de defesa antiviral (Fontes *et al.*, 2004). A interação NIK-NSP seria uma forma de suprimir tal defesa.

A proteína Ren também atua em mecanismos de inativação de resposta de defesa pela interação com SlNAC1, da família dos transfatores NAC, proteínas diretamente ligadas à resposta a estresse (Olsen *et al.*, 2005), levando a um maior acúmulo de DNA viral (Selth *et al.*, 2005).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Isolado viral

Plantas de maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) coletadas em Livramento de Nossa Senhora, BA, no ano de 2001, nas quais a infecção por begomovírus foi comprovada por meio de PCR utilizando-se oligonucleotídeos universais para o gênero (Rojas *et al.*, 1993), foram cedidas pelo Prof. Jorge Rezende (Esalq-USP, Piracicaba, SP). As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação e propagadas via estaqueamento. O isolado viral foi denominado BR:LNS2:Pas:01.

3.2. Clonagem e seqüenciamento do genoma viral

A clonagem de ambos os componentes virais foi realizada a partir de DNA total extraído de folhas infectadas (Dellaporta *et al.*, 1983) seguido de amplificação do genoma viral utilizando-se o kit Templiphi (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA amplificado foi submetido a reações de clivagem enzimática com 11 diferentes enzimas de restrição: *Apa* I, *Bam*H I, *Bgl* II, *Cla* I, *Eco*R I, *Hind* III, *Kpn* I, *Pst* I, *Sac* I, *Xba* I e *Xho* I, a fim de determinar quais linearizariam os componentes genômicos,

permitindo a clonagem. Cada componente genômico foi então clonado separadamente no vetor pBluescript KSII (pKS+, Stratagene) previamente digerido com a mesma enzima que linearizou o genoma viral.

Para a identificação da enzima que cliva cada componente genômico, foi realizada hibridização com sondas específicas para o DNA-A e DNA-B. A sonda para o DNA-A correspondeu a um fragmento compreendendo 852 nucleotídeos das regiões 3' das ORFs *cp* e *ren* do *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), e a sonda para o DNA-B correspondeu a um fragmento compreendendo 822 nucleotídeos das regiões 3' das ORFs *ns* e *mp* do ToYSV. Ambas as sondas foram marcadas com α-[^{32}P]-dCTP utilizando-se o kit Prime-it II (Stratagene), de acordo com as instruções do fabricante. Um micrograma de DNA de cada clivagem enzimática foi separado por eletroforese em gel de agarose, transferido e covalentemente ligado à membrana de náilon (Hybond-N+, GE Healthcare) e hibridizado com as sondas específicas de acordo com procedimentos padrão em condições de baixa estringência (Sambrook e Russel, 2001).

Todas as reações de ligação foram feitas utilizando proporção de 3:1 (inserto:vetor) e uma unidade da enzima T4 ligase (Invitrogen), em um volume final de 20 μL, a 14°C por 16 a 20 horas. As transformações foram realizadas pelo método do choque térmico (Sambrook e Russel, 2001). Os clones obtidos foram completamente seqüenciados na Macrogen (Seul, Coréia do Sul).

3.3. Comparação de seqüências e análise filogenética

As seqüências obtidas foram analisadas inicialmente com o auxílio do programa BLAST*n* (Altschul *et al.*, 1990), a fim de identificar as espécies virais com as quais apresentam maior identidade. Também foi feita a comparação das ORFs virais com as ORFs de diferentes begomovírus utilizando-se o programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). Alinhamentos múltiplos entre as seqüências dos clones obtidos e os vírus com

maior porcentagem de identidade foram obtidos utilizando-se o algoritmo Clustal W implementado no programa MEGA (Kumar *et al.*, 2004). Árvores filogenéticas baseadas nos alinhamentos do DNA-A e DNA-B foram preparadas pelo método de máxima verossimilhança utilizando-se o programa PHYML (Guindon e Gascuel, 2003). Análise de "bootstrap" (1000 repetições) foi utilizada para verificar a significância de cada ramo das árvores. O programa MODELTEST (Posada e Crandall, 1998) foi utilizado para determinar o modelo de substituição de nucleotídeos que melhor se ajusta a cada conjunto de dados.

3.4. Construção dos clones infecciosos

A partir das seqüências obtidas foi construído o mapa de restrição para o DNA-A e DNA-B, utilizando-se o programa DNAMAN. Para a construção do clone infeccioso do DNA-A, foram escolhidas enzimas que clivam o DNA viral de forma a liberar um fragmento que contenha toda a região comum (incluindo a origem de replicação). O fragmento gerado pela clivagem enzimática foi então purificado com o kit Illustra GFX (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante, e introduzido no clone de origem, de forma a gerar um clone que contenha duas origens de replicação flanqueando o componente genômico completo. Para o DNA-B, o clone infeccioso foi construído de acordo com Ferreira *et al.* (2008), com modificações. Resumidamente, dois microgramas de DNA viral amplificado utilizando-se o kit Templiphi foram submetido à clivagem enzimática utilizando-se duas unidades da enzima que lineariza o genoma viral, em um volume final de 50 μL, por 15 minutos (clivagem parcial). A enzima foi então inativada a 65°C por 15 minutos. A reação foi submetida à eletroforese em gel de agarose e a banda correspondente ao dímero gerado pela clivagem parcial do genoma viral foi cortada do gel, purificada com o kit Illustra GFX e clonada no vetor pKS+, gerando-se o clone infeccioso.

As reações de ligação e os procedimentos para transformação de *E. coli* foram os mesmos descritos no item 3.2.

3.5. Teste de infectividade e gama de hospedeiros

Os clones descritos no item 3.3 foram inoculados via biobalística (Aragão *et al.*, 1996) em plântulas de diferentes espécies para a determinação da gama de hospedeiros. Foram inoculadas quatro plantas de cada espécie/cultivar com dois microgramas de cada componente por planta, além de duas plantas inoculadas sem DNA (controle negativo). Da família *Passifloraceae*, foram inoculadas plantas de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). Da família *Solanaceae*, foram inoculadas plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* 'Moneymaker'), pimentão (*Capsicum annuum* 'Ikeda'), *Nicotiana benthamina, Nicotiana glutinosa, Nicotiana clevelandi,* fumo (*Nicotiana tabacum* 'Samsun', 'Xanthi' e 'Havana') e *Datura stramonium*. Da família *Fabaceae* foram inoculadas plantas de soja (*Glycine max* 'Tucunaré'), feijão (*Phaseolus vulgaris* 'Ouro Negro' e 'Pérola') e feijão-caupi (*Vigna unguiculata* 'Pitiúba'). Também foram inoculadas plantas de abobrinha (*Cucurbita pepo* 'Caserta'), da família *Curcubitaceae*, e plantas de *Chenopodium quinoa*, da família *Amaranthaceae.* Amostras foliares foram coletadas aos 28 dias após a inoculação. O DNA total foi extraído (Dellaporta *et al.*, 1983) e aplicado diretamente em membrana de náilon (Hybond-N+). A confirmação da infecção viral foi feita via hibridização "dot blot". Foi utilizado aproximadamente 1,5 μg de DNA-A viral como sonda, liberado do clone pVIR050 (DNA-A do isolado BR:LNS2:Pas:01) pela clivagem enzimática com *Xho* I e marcado com digoxigenina utilizando-se o kit DIG DNA Labeling and Detection (Roche), de acordo com as instruções do fabricante. A hibridização foi realizada a 50°C por 16 horas, seguida de duas lavagens à temperatura ambiente em SSC 0,5x e SDS 0,1% por 5 minutos cada, e duas lavagens a 50°C em SSC 0,1x e SDS

0,1% por 15 minutos cada.

4. RESULTADOS

4.1. Clonagem do genoma viral

A partir das reações de clivagem com as 11 diferentes enzimas (Figura 1), foram escolhidas as enzimas *Cla* I, *Xho* I e *Pst* I para a clonagem. Nas primeiras tentativas com essas três enzimas, obteve-se sucesso apenas com a enzima *Xho* I. O seqüenciamento do clone obtido indicou tratar-se de DNA-A, que foi denominado pVIR050. Para definir qual enzima seria usada para clonar DNA-B, foi realizada hibridização com sondas específicas para cada componente. A partir desse resultado (Figura 2), foi definida a enzima *Cla* I para a clonagem do DNA-B. A confirmação da clonagem de ambos os componentes genômicos foi realizada pela clivagem enzimática do DNA plasmidial extraído das colônias transformantes com as enzimas citadas acima (Figura 3). O clone correspondente ao DNA-B foi denominado pVIR051.

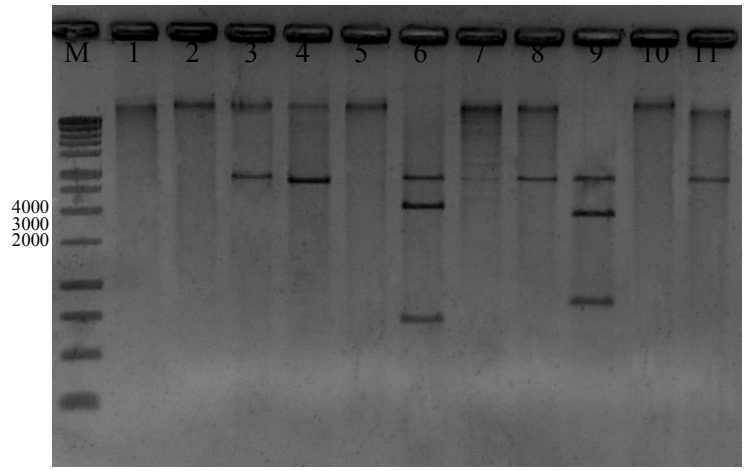


Figura 1. Clivagem enzimática dos componentes genômicos virais amplificados, para identificação de enzimas que linearizam o DNA-A e o DNA-B do isolado BR:LNS02:Pas01. **M**, marcador de comprimento "1 kb plus DNA ladder", em nt. **1 a 11,** clivagem do DNA viral com as enzimas *Apa* I, *Bam*H I, *Bgl* II, *Cla* I, *Eco*R I, *Hind* III, *Kpn* I, *Pst* I, *Sac* I, *Xba* I e *Xho* I, respectivamente. As bandas de aproximadamente 2600 nt correspondem ao genoma viral linearizado.

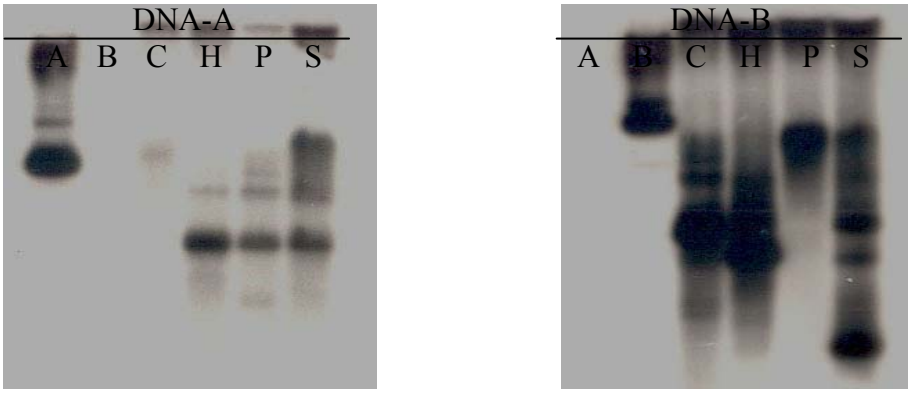


Figura 2. Hibridização do DNA viral com sondas específicas para DNA-A e DNA-B, para identificação de enzimas que linearizam apenas o DNA-B do isolado BR:LNS2:Pas:01. **A** e **B,** forma circular do DNA-A e DNA-B do *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) ligadas em pKS+, repectivamente. **C, H, P, S,** DNA viral clivado com as enzimas *Cla* I, *Hind* III, *Pst* I e *Sac* I, respectivamente. A enzima *Cla* I linearizou apenas o DNA-B e, portanto, foi escolhida para a clonagem desse componente.

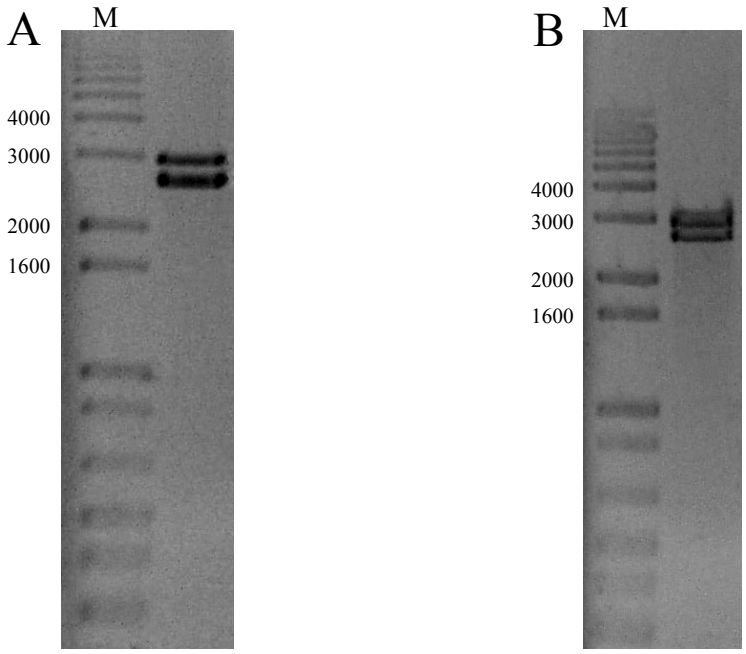


Figura 3. Confirmação da clonagem do DNA-A e DNA-B do isolado BR:LNS2:Pas:01. **A**, clivagem do clone pVIR050 com a enzima *Xho* I, liberando o plasmídeo pKS+ (2900 nt) e o fragmento de aproximadamente 2600 nt correspondente ao DNA-A. **B**, clivagem do clone pVIR051 com a enzima *Cla* I, liberando o plasmídeo pKS+ e o fragmento de aproximadamente 2600 nt correspondente ao DNA-B. **M**, marcador de comprimento "1kb plus DNA ladder", em nt.

4.2. Seqüenciamento do genoma viral e análise comparativa das seqüencias

Os clones pVIR050 (DNA-A) e pVIR051 (DNA-B) foram completamente seqüenciados. O DNA-A do isolado BR:LNS2:Pas:01 possui 2672 nt. Nesse componente foram identificadas as ORFs correspondentes aos genes *cp*, com 257 aminoácidos deduzidos; *rep*, com 357 aminoácidos deduzidos; *trap*, com 129 aminoácidos deduzidos; *ren*, com 132 aminoácidos deduzidos; e *ac4*, com 132 aminoácidos deduzidos (Figura 4). Também foram identificadas duas ORFs, distanciadas 127 nucleotídeos uma da outra, na mesma fase de leitura da fita complementar, sobrepostas à ORF *cp* (Figura 4). A primeira

ORF possui 94 aminoácidos deduzidos, apresentando 60% de identidade com os 94 aminoácidos N-terminais da proteína AC5 do *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), e a segunda possui 71 aminoácidos deduzidos, dos quais 63 da porção N-terminal apresentam 42% de identidade com os aminoácidos 138 a 212 da proteína AC5 do ToRMV.

O DNA-B possui 2644 nucleotídeos, e nesse componente foram identificadas as ORFs correspondentes aos genes *nsp*, com 246 aminoácidos deduzidos, e *mp*, com 293 aminoácidos deduzidos (Figura 4).

A região comum apresenta 196 nucleotídeos, com 99,99% de identidade entre o DNA-A e DNA-B (apenas uma substituição de um nucleotídeo), confirmando que os clones pVIR050 e pVIR051 são DNAs cognatos.

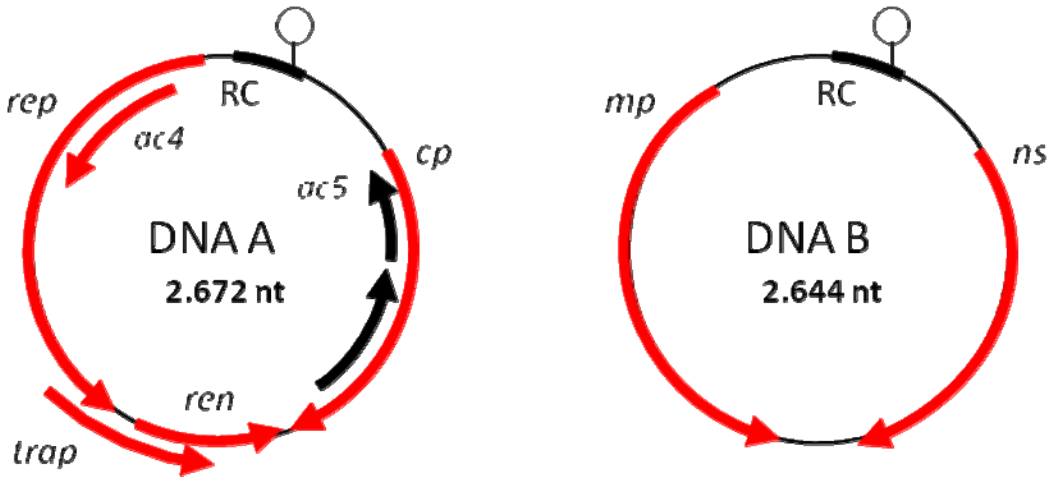


Figura 4. Representação esquemática do genoma do Passion flower severe leaf distortion virus (PSLDV-[BR:LNS2:Pas:01]). As setas em vermelho representam as ORFs virais. As setas em preto representam as ORFs com identidade de seqüência com a ORF *ac5*. RC, região comum, que inclui a estrutura em forma de grampo onde está localizada a origem de replicação.

A análise das seqüências com o auxílio do programa BLAST*n* (Altschul *et al.*, 1990) indicou que o DNA-A do isolado BR:LNS2:Pas:01 possui maior identidade (74%) com o *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), e o DNA-B com o *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV) (69% de identidade). Considerando-se as seqüências completas e utilizando-se o programa CLUSTALW (Tabela 1), verificou-se uma identidade máxima de 77% do DNA-A com o ToCMoV, e de 74% do DNA-B com o *Tomato yellow spot virus* (ToYSV). A identidade do DNA-A do isolado BR:LNS2:Pas:01 com as seqüências parciais dos isolados LNS-BZ e BJL-BZ do Passion flower little leaf mosaic virus (PLLMV) (Novaes *et al.*, 2003) foi de apenas 80%. Esses resultados confirmam que o isolado BR:LNS2:Pas:01 corresponde a uma nova espécie de begomovírus, pois o valor de 89% de identidade de nucleotídeos do DNA-A é a base para a diferenciação entre espécies (Fauquet *et al.*, 2008). O nome Passion flower severe leaf distortion virus (PSLDV) é proposto para esta nova espécie.

As seqüências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos correspondentes a cada ORF do PSLDV foram comparadas a de outros begomovírus. De forma geral, as maiores identidades foram com as ORFs de vírus de tomateiro e de *Sida* do Brasil. Assim como a seqüência completa do DNA-A, a ORF *rep* apresentou maior identidade, tanto de nucleotídeos como aminoácidos deduzidos, com o ToCMoV (80% e 83%, respectivamente) (Tabela 2). A ORF *ren* (Tabela 3) também apresentou maior identidade de nucleotídeos com o ToCMoV (83%), mas a maior identidade de aminoácidos (78%) foi obtida com o ToYSV e o *Tomato golden mosaic virus* (TGMV). Para a ORF *trap* (Tabela 4), o valor máximo de identidade de nucleotídeos foi obtido com o *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) (82%), e a identidade máxima de aminoácidos foi de 72% com o ToSRV, ToYSV, TGMV e SimMV. Na análise da ORF *ac4* (Tabela 5) encontrou-se o maior valor entre todas as comparações, 90% de identidade de nucleotídeos com a *ac4* do Tomato

mottle leaf curl virus, valor reduzido para 79% quando comparadas as seqüências de aminoácidos. Para a ORF *cp* (Tabela 6), a mais conservada entre os begomovírus, as identidades de aminoácidos com os vírus de tomateiro do Brasil apresentaram valores entre 84 e 88%, mas diferentemente da *rep* e *ren*, a maior identidade foi com o ToSRV. Também foram incluídas nessa análise duas seqüências parciais da proteína capsidial dos isolados BJL-BZ e LNS-BZ do PLLMV, obtidos de maracujazeiro na mesma região onde foi obtido o PSLDV. Apesar de apresentarem apenas 80% de identidade entre suas seqüências de nucleotídeos, a identidade das seqüências de aminoácidos foi de 91%. Interessantemente, apesar de infectarem o mesmo hospedeiro e de terem sido obtidos na mesma região geográfica do PSLDV, os isolados BJL-BZ e LNS-BZ do PLLMV apresentaram maior identidade de seqüência, tanto de nucleotídeos quanto de aminoácidos, com os vírus de tomateiro e *Sida* do Brasil do que com o PSLDV (por exemplo, 95-97% de identidade de aa com o ToYSV e o SiMoV) (Tabela 6). Entretanto, é necessário ressaltar que as seqüências dos isolados BJL-BZ e LNS-BZ do PLLMV são parciais. É possível que resultados diferentes sejam obtidos quando seqüências do DNA-A completo desses isolados estiverem disponíveis.

As ORFs presentes no DNA-B também seguiram o mesmo padrão das ORFs do DNA-A, apresentando maior identidade com os vírus de tomateiro e *Sida* do Brasil. Para as ORFs *mp* e *nsp* (Tabelas 7 e 8), assim como para a seqüência completa do DNA-B, obteve-se valores máximos de identidade de nucleotídeos com o ToYSV (85%, 81% e 74% respectivamente), e um valor ainda maior quando comparada as seqüências de aminoácidos (90 e 84%, para *mp* e *nsp*, respectivamente).

Tabela 1. Porcentagem de identidade entre as seqüências completas de nucleotídeos do DNA-A (valores acima da diagonal) e DNA-B (valores abaixo da diagonal) do PSLDV-[BR:LNS2:Pas:01] e de outras espécies de begomovírus.

	PSLDV	AbMV	ACMV	BGMV	BGYMV	PLLMV BJL-BZ*	PLLMV LNS-BZ*	SGMV	SimMV	SqLCV	TGMV	ToCMoV	ToMoV	ToRMV	ToSRV	ToYSV	ToYVSV	WmCSV
PSLDV	- -	73	54	71	72	80	80	72	67	66	76	77	73	74	74	70	75	53
AbMV	58	- -	55	75	76	84	85	89	77	69	73	76	85	77	76	77	74	55
ACMV	13	10	- -	55	55	69	70	55	54	53	56	56	56	55	55	54	56	68
BGMV	67	48	14	- -	75	83	82	74	75	71	71	77	73	80	78	76	74	57
BGYMV	47	59	11	60	- -	80	81	75	70	67	71	75	74	73	73	73	74	54
PLLMV BJL-BZ*	na**	na	na	na	na	- -	92	84	87	82	81	81	82	83	83	88	82	71
PLLMV LNS-BZ*	na	na	na	na	na	na	- -	85	88	82	82	81	83	84	83	86	82	70
SGMV	59	75	10	58	59	na	na	- -	76	69	72	75	88	75	76	77	75	54
SimMV	69	50	10	57	47	na	na	50	- -	67	76	74	72	78	78	81	74	56
SqLCV	45	46	13	45	45	na	na	46	46	- -	69	70	69	70	70	69	68	53
TGMV	51	59	9	64	50	na	na	49	59	49	- -	75	74	78	79	76	79	55
ToCMoV	62	48	10	62	48	na	na	58	56	47	49	- -	76	85	78	75	77	55
ToMoV	60	77	11	50	62	na	na	73	50	46	59	60	- -	76	77	76	75	55
ToRMV	61	50	10	61	49	na	na	52	71	48	62	58	56	- -	86	77	75	54
ToSRV	67	50	10	61	49	na	na	52	71	48	63	60	56	98	- -	78	77	55
ToYSV	74	48	10	59	46	na	na	51	71	46	52	58	51	68	68	- -	74	53
ToYVSV	67	47	10	69	55	na	na	58	57	49	57	61	50	69	69	67	- -	55
WmCSV	13	10	32	14	11	na	na	11	13	13	10	10	10	11	11	13	8	- -

*Seqüências parciais correspondente a 576 nt da ORF *cp*

** Seqüências não disponíveis

Tabela 2. Porcentagem de identidade entre as seqüências de nucleotídeos da ORF *rep* (valores acima da diagonal) e de aminoácidos da proteína Rep (valores abaixo da diagonal) do PSLDV-[BR:LNS2:Pas:01] e de outras espécies de begomovírus.

	PSLDV	AbMV	ACMV	BGMV	BGYMV	SGMV	SimMV	SqLCV	TGMV	ToCMoV	ToMoV	ToRMV	ToSRV	ToYSV	ToYVSV	WmCSV
PSLDV	- -	72	64	71	74	71	71	66	74	80	72	74	74	73	76	63
AbMV	76	- -	65	74	77	91	76	65	73	74	87	73	73	77	73	65
ACMV	61	64	- -	65	63	66	64	60	64	63	66	64	64	63	61	73
BGMV	69	73	61	- -	71	72	74	61	74	73	74	79	78	75	71	62
BGYMV	74	80	63	72	- -	77	70	65	72	74	77	73	72	74	73	63
SGMV	74	92	63	71	79	- -	76	64	74	74	89	73	74	76	72	64
SimMV	70	78	61	78	72	78	- -	64	77	72	73	80	80	79	73	62
SqLCV	62	61	52	61	61	59	59	- -	69	66	63	66	66	67	64	60
TGMV	74	74	62	76	71	75	78	60	- -	75	72	81	80	79	76	60
ToCMoV	83	77	63	72	76	77	72	62	73	- -	75	77	76	76	79	62
ToMoV	75	89	64	73	79	90	75	59	75	79	- -	73	75	76	73	62
ToRMV	75	75	63	78	73	75	79	60	82	79	75	- -	95	79	73	61
ToSRV	76	76	63	79	72	76	80	59	82	75	76	93	- -	79	74	63
ToYSV	71	78	62	76	75	76	82	61	80	73	75	80	81	- -	75	59
ToYVSV	78	76	57	70	74	75	72	59	75	79	75	73	73	74	- -	63
WmCSV	59	62	74	58	60	61	59	54	61	60	61	60	60	61	56	- -

Tabela 3. Porcentagem de identidade entre as seqüências de nucleotídeos da ORF *ren* (valores acima da diagonal) e de aminoácidos da proteína Ren (valores abaixo da diagonal) do PSLDV-[BR:LNS2:Pas:01] e de outras espécies de begomovírus.

	PSLDV	AbMV	ACMV	BGMV	BGYMV	SGMV	SimMV	SqLCV	TGMV	ToCMoV	ToMoV	ToRMV	ToSRV	ToYSV	ToYVSV	WmCSV
PSLDV	- -	78	67	79	76	80	80	75	81	83	81	81	81	80	79	64
AbMV	75	- -	68	79	77	92	82	78	82	81	89	82	83	82	80	68
ACMV	52	50	- -	66	65	66	68	62	56	70	68	69	66	66	66	72
BGMV	76	74	46	- -	81	78	81	78	80	83	79	84	83	81	82	64
BGYMV	75	77	50	77	- -	76	76	82	79	77	76	77	79	78	77	63
SGMV	77	90	49	76	75	- -	82	76	82	80	90	80	82	82	80	66
SimMV	75	80	47	81	75	81	- -	75	78	82	80	82	80	84	80	67
SqLCV	71	75	45	75	79	75	73	- -	79	77	75	78	77	77	77	65
TGMV	78	80	47	78	77	81	74	75	- -	82	81	81	83	81	83	65
ToCMoV	76	79	46	81	72	79	81	72	78	- -	81	94	85	82	82	63
ToMoV	78	88	51	74	77	87	79	71	78	80	- -	81	83	82	79	66
ToRMV	73	78	47	80	70	78	80	73	77	94	78	- -	85	82	82	64
ToSRV	76	78	52	83	78	81	77	72	80	82	81	81	- -	84	84	64
ToYSV	78	77	49	78	75	79	76	77	81	78	77	78	82	- -	80	66
ToYVSV	78	76	47	81	78	78	77	74	83	80	78	79	81	78	- -	66
WmCSV	50	53	69	50	52	54	51	49	52	52	53	51	53	50	55	- -

Tabela 4. Porcentagem de identidade entre as seqüências de nucleotídeos da ORF *trap* (valores acima da diagonal) e de aminoácidos da proteína Trap (valores abaixo da diagonal) do PSLDV-[BR:LNS2:Pas:01] e de outras espécies de begomovírus.

	PSLDV	AbMV	ACMV	BGMV	BGYMV	SGMV	SimMV	SqLCV	TGMV	ToCMoV	ToMoV	ToRMV	ToSRV	ToYSV	ToYVSV	WmCSV
PSLDV	- -	75	61	80	77	76	80	76	80	81	75	80	82	79	76	62
AbMV	66	- -	64	76	75	93	79	74	78	77	90	78	79	76	75	65
ACMV	43	47	- -	61	61	64	61	60	61	58	63	61	58	58	58	73
BGMV	70	68	50	- -	77	74	81	75	78	84	76	85	82	79	78	62
BGYMV	68	66	42	67	- -	75	71	82	77	74	73	74	74	73	76	62
SGMV	65	91	46	67	68	- -	79	74	78	76	91	77	78	75	76	63
SimMV	72	72	45	73	58	71	- -	75	77	82	78	82	79	82	78	61
SqLCV	68	65	44	68	71	65	63	- -	79	76	71	76	76	75	76	60
TGMV	72	71	46	70	66	71	68	68	- -	79	75	79	81	78	83	63
ToCMoV	71	67	51	76	67	68	72	68	70	- -	77	95	83	78	78	62
ToMoV	63	84	48	67	63	86	71	63	65	69	- -	76	79	75	75	64
ToRMV	71	70	50	80	68	68	72	67	73	91	68	- -	83	78	79	62
ToSRV	72	68	46	72	62	66	71	64	71	74	67	77	- -	80	76	64
ToYSV	72	65	42	74	65	65	76	60	69	68	63	71	71	- -	78	63
ToYVSV	62	62	46	70	61	64	68	62	76	67	61	70	62	68	- -	65
WmCSV	44	51	60	48	42	48	46	42	46	44	48	44	44	49	49	- -

Tabela 5. Porcentagem de identidade entre as seqüências de nucleotídeos da ORF *ac4* (valores acima da diagonal) e de aminoácidos da proteína AC4 (valores abaixo da diagonal) do PSLDV-[BR:LNS2:Pas:01] e de outras espécies de begomovírus.

	PSLDV	ACMV	ChiLCuV	HYVMV	PaLCuV	PepLCPV	SLCMV	ToCMoV	ToLCJV	ToMoLCV	TYLCV
PSLDV	- -	65	83	82	85	83	59	88	83	90	85
ACMV	29	- -	65	62	63	66	80	67	61	59	70
ChiLCuV	73	30	- -	84	90	99	64	82	92	85	85
HYVMV	73	28	68	- -	86	84	65	83	84	83	85
PaLCuV	74	29	81	73	- -	90	66	82	92	85	86
PepLCPV	74	31	98	69	82	- -	64	82	92	85	85
SLCMV	34	56	30	37	32	30	- -	62	65	61	67
ToCMoV	75	28	65	72	67	67	35	- -	82	89	82
ToLCJV	76	29	86	71	84	87	29	69	- -	86	87
ToMoLCV	79	29	72	75	74	73	37	76	74	- -	86
TYLCV	73	34	71	72	70	72	36	65	69	70	- -

Tabela 6. Porcentagem de identidade entre as seqüências de nucleotídeos da ORF *cp* (valores acima da diagonal) e de aminoácidos da proteína CP (valores abaixo da diagonal) do PSLDV-[BR:LNS2:Pas:01] e de outras espécies de begomovírus.

	PSLDV	AbMV	ACMV	BGMV	BGYMV	PLLMV BJL-BZ*	PLLMV LNS-BZ*	SGMV	SimMV	SqLCV	TGMV	ToCMoV	ToMoV	ToRMV	ToSRV	ToYSV	ToYVSV	WmCSV
PSLDV	- -	79	57	78	78	80	80	80	79	78	80	79	80	81	80	80	78	57
AbMV	82	- -	58	80	77	85	84	91	83	80	80	82	87	83	80	85	80	60
ACMV	66	64	- -	60	60	70	69	60	60	60	61	62	59	59	60	58	61	75
BGMV	86	89	66	- -	83	82	83	80	81	81	80	83	80	82	81	81	81	60
BGYMV	85	85	68	88	- -	81	80	79	80	82	81	80	78	81	79	80	81	61
PLLMV BJL-BZ*	91	94	76	95	95	- -	92	85	88	82	82	81	83	84	83	86	82	70
PLLMV LNS-BZ*	91	95	76	96	93	97	- -	84	87	82	81	81	82	83	83	88	82	71
SGMV	84	94	65	90	88	96	97	- -	85	80	83	83	89	84	82	85	81	61
SimMV	86	90	66	93	90	96	97	92	- -	82	84	83	83	83	82	87	82	60
SqLCV	86	87	66	91	91	95	94	89	92	- -	85	79	81	79	83	82	83	60
TGMV	87	87	66	91	91	94	94	89	90	92	- -	82	82	81	85	83	85	62
ToCMoV	86	87	68	92	89	95	96	90	90	90	88	- -	82	92	82	82	81	62
ToMoV	84	92	64	90	86	92	93	93	90	89	87	89	- -	84	81	83	79	61
ToRMV	86	87	68	91	88	95	96	90	90	89	88	99	89	- -	81	82	82	61
ToSRV	88	87	68	93	87	93	94	89	91	90	90	90	88	90	- -	82	83	60
ToYSV	86	89	65	92	88	95	97	90	95	90	89	90	89	90	90	- -	82	60
ToYVSV	86	86	66	89	92	94	94	88	90	92	93	88	87	88	89	90	- -	61
WmCSV	65	64	78	67	66	76	75	66	66	66	68	68	64	68	66	66	67	- -

*Seqüências Parciais correspondentes a 576 nt da ORF *cp*, e 192 aa deduzidos da proteína CP

Tabela 7. Porcentagem de identidade entre as seqüências de nucleotídeos da ORF *mp* (valores acima da diagonal) e de aminoácidos da proteína MP (valores abaixo da diagonal) do PSLDV-[BR:LNS2:Pas:01] e de outras espécies de begomovírus.

	PSLDV	AbMV	ACMV	BGMV	BGYMV	SGMV	SimMV	SqLCV	TGMV	ToCMoV	ToMoV	ToRMV	ToSRV	ToYSV	ToYVSV	WmCSV
PSLDV	- -	75	30	75	72	75	75	70	79	72	75	77	77	85	77	39
AbMV	78	- -	28	74	74	86	76	71	78	72	86	75	74	74	74	30
ACMV	43	41	- -	41	41	29	30	37	41	28	29	29	29	38	24	58
BGMV	82	79	42	- -	75	73	72	71	79	73	75	75	75	76	76	41
BGYMV	78	81	42	79	- -	75	72	71	80	73	75	75	75	72	75	33
SGMV	80	91	42	79	83	- -	78	72	78	72	85	76	75	75	73	32
SimMV	82	81	42	81	83	84	- -	70	78	71	75	81	80	75	73	40
SqLCV	77	78	42	75	78	79	78	- -	78	70	71	73	73	70	75	40
TGMV	83	87	48	80	88	87	86	83	- -	75	79	78	78	81	81	49
ToCMoV	79	79	39	78	80	81	78	78	84	- -	74	72	73	71	73	30
ToMoV	80	91	43	79	82	93	83	80	88	81	- -	74	74	74	74	31
ToRMV	80	80	40	80	81	82	89	77	85	78	83	- -	99	77	76	33
ToSRV	81	80	41	81	82	82	90	77	85	78	83	98	- -	77	76	33
ToYSV	90	78	45	79	77	78	80	74	82	77	78	78	79	- -	76	39
ToYVSV	79	80	42	77	82	80	80	80	85	79	81	82	82	78	- -	24
WmCSV	44	42	55	42	43	42	42	45	48	43	42	44	44	43	43	- -

Tabela 8. Porcentagem de identidade entre as seqüências de nucleotídeos da ORF *nsp* (valores acima da diagonal) e de aminoácidos da proteína NSP (valores abaixo da diagonal) do PSLDV-[BR:LNS2:Pas:01] e de outras espécies de begomovírus.

	PSLDV	AbMV	ACMV	BGMV	BGYMV	SGMV	SimMV	SqLCV	TGMV	ToCMoV	ToMoV	ToRMV	ToSRV	ToYSV	ToYVSV	WmCSV
PSLDV	- -	69	8	70	68	71	75	64	71	67	71	74	74	81	73	12
AbMV	70	- -	21	70	70	75	72	65	69	67	77	69	69	72	67	4
ACMV	31	31	- -	26	38	15	9	25	13	13	11	8	10	8	10	38
BGMV	73	71	26	- -	72	70	71	63	69	70	71	70	70	72	73	11
BGYMV	72	67	26	70	- -	69	67	64	73	67	71	70	70	69	72	11
SGMV	72	76	30	71	69	- -	72	64	64	68	79	71	71	73	70	16
SimMV	76	71	31	72	67	71	- -	66	71	70	72	77	78	77	71	5
SqLCV	61	61	28	61	60	60	60	- -	68	67	65	68	68	67	70	4
TGMV	75	66	28	70	69	66	69	60	- -	66	64	73	74	71	76	15
ToCMoV	71	67	26	72	68	69	70	61	67	- -	68	71	71	69	72	16
ToMoV	71	77	26	70	69	78	70	58	67	68	- -	71	70	73	70	8
ToRMV	75	69	25	70	67	68	75	58	71	67	69	- -	98	73	76	13
ToSRV	76	69	25	70	68	69	75	59	71	67	69	97	- -	73	75	11
ToYSV	84	70	29	75	70	72	78	62	73	70	71	73	74	- -	72	2
ToYVSV	76	67	26	70	71	67	71	61	75	69	67	71	71	72	- -	11
WmCSV	27	28	35	28	27	28	27	29	27	26	25	27	28	25	29	- -

4.3. Análise filogenética

A análise filogenética baseada nas seqüências do DNA-A e DNA-B agrupou os begomovírus de acordo com a região geográfica, e em seguida com base no hospedeiro (Figuras 5 e 6). O DNA-A do PSLDV se agrupou em um ramo monofilético, com 94% de valor de "bootstrap", que inclui vírus obtidos de tomateiro no Brasil (TGMV e ToYVSV) e de soja na Argentina (SoBlMV) (Figura 5). O DNA-B agrupou-se em um ramo monofilético com 99% de valor de "bootstrap" incluido vírus de *Sida* (SimMV e SiMoV) e de tomateiro (ToRMV, ToSRV, ToYSV e ToMlMV) (Figura 6).

Figura 5. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento das seqüências de nucleotídeos completas do DNA-A de espécies de begomovírus. A árvore foi obtida pelo método de máxima verossimilhança, utilizando-se o programa PHYML, com base no modelo de substituição GTR+I+G determinado pelo programa MODELTEST. Os números em cada ramo indicam o valor de "bootstrap" (1000 repetições).

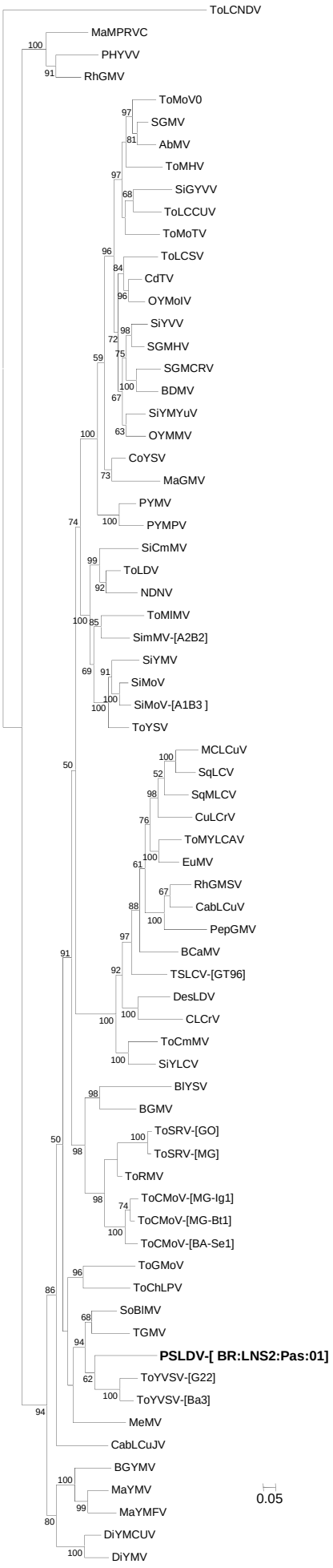
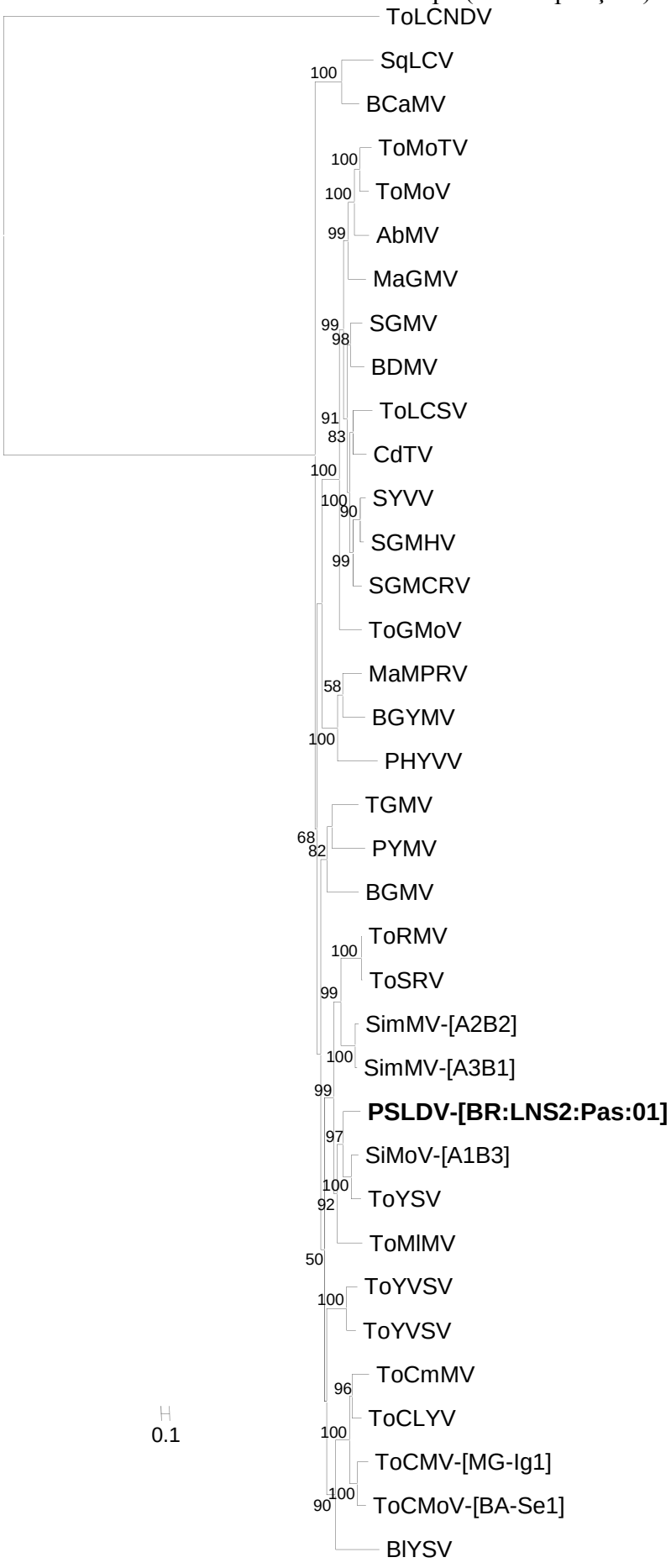

ToLCNDV
MaMPRVC
PHYVV
RhGMV
ToMoV0
SGMV
AbMV
ToMHV
SiGYVV
ToLCCUV
ToMoTV
ToLCSV
CdTV
OYMoIV
SiYVV
SGMHV
SGMCRV
BDMV
SiYMYuV
OYMMV
CoYSV
MaGMV
PYMV
PYMPV
SiCmMV
ToLDV
NDNV
ToMlMV
SimMV-[A2B2]
SiYMV
SiMoV
SiMoV-[A1B3]
ToYSV
MCLCuV
SqLCV
SqMLCV
CuLCrV
ToMYLCAV
EuMV
RhGMSV
CabLCuV
PepGMV
BCaMV
TSLCV-[GT96]
DesLDV
CLCrV
ToCmMV
SiYLCV
BlYSV
BGMV
ToSRV-[GO]
ToSRV-[MG]
ToRMV
ToCMoV-[MG-Ig1]
ToCMoV-[MG-Bt1]
ToCMoV-[BA-Se1]
ToGMoV
ToChLPV
SoBlMV
TGMV
PSLDV-[BR:LNS2:Pas:01]
ToYVSV-[G22]
ToYVSV-[Ba3]
MeMV
CabLCuJV
BGYMV
MaYMV
MaYMFV
DiYMCUV
DiYMV
0.05

Figura 6. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento das seqüências de nucleotídeos completas do DNA-B de espécies de begomovírus. A árvore foi obtida pelo método de máxima verossimilhança, utilizando-se o programa PHYML, com base

no modelo de substituição GTR+I+G determinado pelo programa MODELTEST. Os números em cada ramo indicam o valor de "bootstrap" (1000 repetições).



4.4. Produção dos clones infecciosos

A produção do clone infeccioso correspondente ao DNA-A foi realizada em duas etapas. Após o seqüenciamento do clone pVIR050, identificou-se no mapa de restrição um fragmento de 569 nt contendo a origem de replicação viral, gerado pela digestão com as enzimas *Sac* II e *Xho* I. Esse fragmento foi clonado em pKS+, gerando o clone pVIR100 (Figura 7). Na segunda etapa, o clone pVIR050 foi digerido com *Xho* I, liberando o genoma viral completo, que foi purificado a partir do gel e ligado ao clone pVIR100 previamente digerido com a mesma enzima. O clone obtido, denominado pVIR070, possui 1,2 cópias do DNA-A, incluindo duas origens de replicação na mesma orientação. A confirmação da clonagem e orientação dos insertos foi realizada por meio da clivagem do clone pVIR070 com a enzima *Sac* I. A presença de fragmentos de aproximadamente 700 e 5500 pares de bases confirmou a clonagem e a orientação correta do inserto (Figura 8).

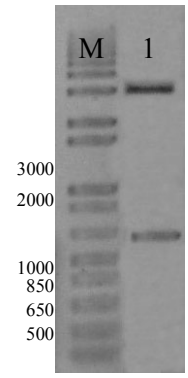


Figura 7. Confirmação da clonagem do fragmento de 569 nt, que inclui a origem de replicação, proveniente do DNA-A do PSLDV-[BR:LNS2:Pas:01]. **1**, clivagem do clone pVIR100 com as enzimas *Sac* II e *Xho* I, liberando o plasmídeo pKS+ e o

fragmento de 569 nt. **M**, marcador de comprimento "1kb plus DNA ladder", em nt.

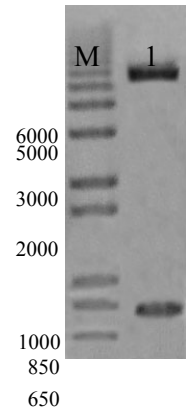


Figura 8. Confirmação da clonagem e orientação do clone pVIR070, correspondente a 1,2 cópia do DNA-A do PSLDV-[BR:LNS2:Pas:01]. **1**, clivagem do clone pVIR070 com *Sac* I, liberando fragmentos de aproximadamente 5500 e 700 nt. **M**, marcador de comprimento "1 kb plus DNA ladder", em nt.

Diversas tentativas de clonagem utilizando a mesma estratégia empregada para o clone pVIR070 (DNA-A) foram feitas para a produção do clone infeccioso do DNA-B. Entretanto, não se obteve sucesso. Com isso, resolveu-se proceder à clonagem de dímeros (Ferreira *et al.*, 2008). Nesse método, os concatâmeros de alto peso molecular contendo unidades monoméricas idênticas geradas pela amplificação com a DNA polimerase do fago φ29 são submetidas à clivagem parcial, de forma a obter dímeros do genoma viral covalentemente ligados, ou seja, duas cópias completas do componente genômico na mesma orientação. Inicialmente, foi utiliza a enzima *Sal* I, que cliva o DNA-B em apenas um ponto. Os dímeros produzidos pela clivagem parcial com essa enzima (Figura 9A) foram utilizados em reações de ligação, porém sem sucesso. Com isso, foi escolhida a enzima *Sac* I, que cliva o componente genômico em dois pontos. As condições de clivagem foram alteradas para permitir a produção do dímero, diminuindo-se a concentração de enzima e o tempo de reação. A digestão parcial com *Sac* I produziu tanto as formas diméricas quanto outras formas intermediárias maiores

que o monômero (Figura 9B). A região correspondente a todas essas bandas, desde aproximadamente 4500 nt até 6000 nt, foi purificada do gel e utilizada para a clonagem. A confirmação da clonagem foi feita por meio da clivagem do DNA plasmidial com a enzima *Sal* I. A presença de fragmentos de aproximadamente 3500, 2600 e 1200 pares de bases confirmou a clonagem (Figura 10). O clone obtido, que possui 1,7 cópias do DNA-B, incluindo duas origens de replicação na mesma orientação, foi denominado pVIR086.

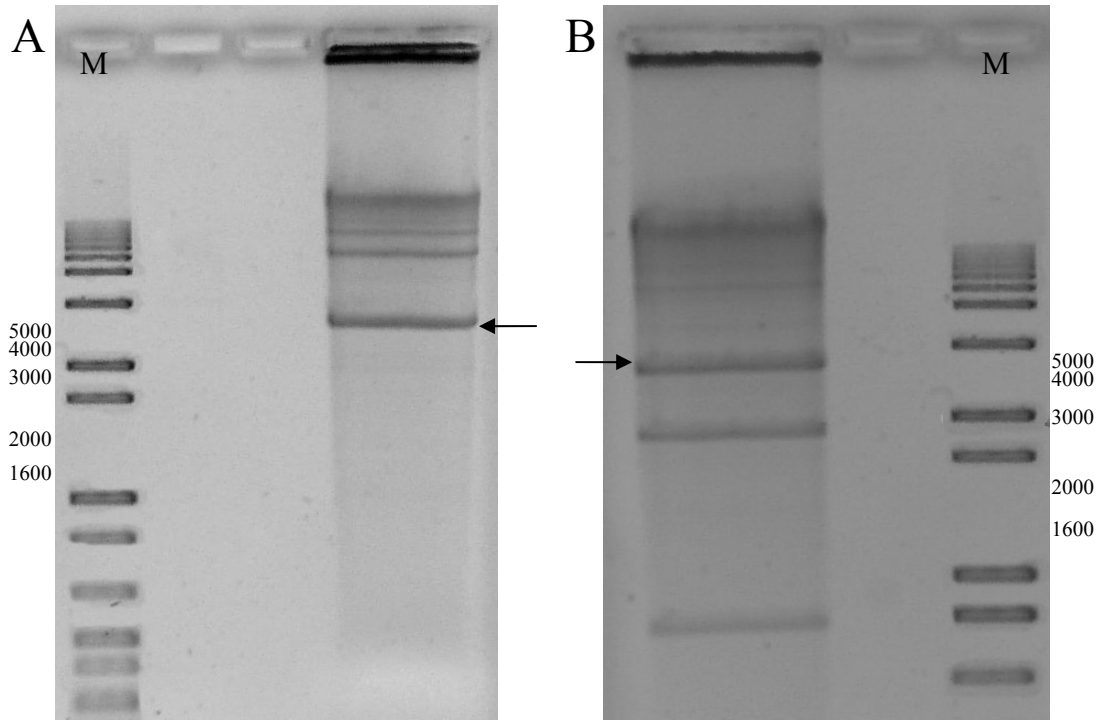


Figura 9. Digestão parcial do genoma viral amplificado do PSLDV-[BR:LNS2:Pas:01] com as enzimas *Sal* I (**A**) e *Sac* I (**B**). A seta indica a banda de aproximadamente 5200 nt, que corresponde ao dímero do DNA-B. **M**, marcador de comprimento "1 kb plus DNA ladder", em nt.

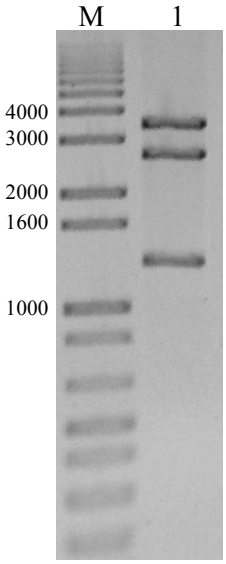


Figura 10. Confirmação da clonagem e orientação do clone pVIR086, correspondente a 1,7 cópia do DNA-B do PSLDV-[BR:LNS2:Pas:01]. **1**, clivagem do clone pVIR086 com *Sal* I, liberando fragmentos de 3500, 2600 e 1200 nt, aproximadamente. **M**, marcador de comprimento "1 kb plus DNA ladder", em nt.

4.5. Teste de infectividade e gama de hospedeiros

O resultado do teste de gama de hospedeiros está apresentado na Tabela 9 e nas Figuras 11, 12 e 13. Foram inoculadas plantas das famílias *Passifloraceae, Solanaceae, Fabaceae, Amaranthaceae e Curcubitaceae*, mas o PSLDV só foi capaz de infectar plantas das duas primeiras famílias. Dentro da família *Passifloraceae* foi testado apenas o maracujá-amarelo, e das cinco plantas inoculadas, apenas uma apresentou infecção viral. Com exceção de tomateiro, pimentão e *Nicotiana glutinosa*, todas as outras solanáceas testadas foram suscetíveis à infecção viral, apresentando sintomas muito severos. Os sintomas em *Nicotiana sp*. incluíram redução de crescimento, mosaico, clorose, e deformação foliar, sendo severos em todas as plantas (Figura 12A, B, C, D e

Figura 13C, D e E). As plantas da espécie *Datura stramonium* apresentaram sintomas mais atenuados, incluindo lesões cloróticas e necróticas nas folhas sistêmicas e reação de hipersensibilidade na folha inoculada (Figura12 F e E, respectivamente). Além disso, as plantas se recuperaram da infecção viral a partir de 40 dpi. O período latente entre as solanáceas não apresentou variação significativa, sendo menor para *N. benthamiana* (sete dias), e maior para *Datura stramonium* (nove dias). O período latente em maracujá-amarelo foi de 12 dias.

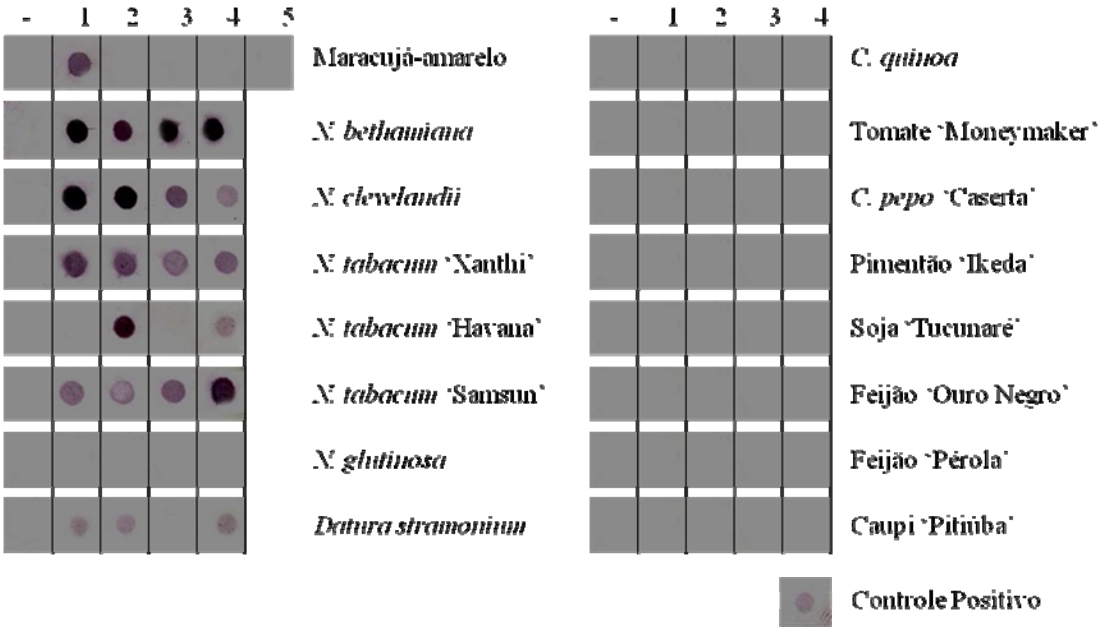


Figura 11. Detecção viral em plantas inoculadas via biobalística com o PSLDV-[BR:LNS2:Pas:01] por meio de hibridização utilizando sonda específica para o DNA-A. **1 a 5,** plantas inoculadas de cada espécie/cultivar; -, controle negativo (planta inoculada com partículas de tungstênio sem DNA); **Controle positivo**, 20 ng de DNA plasmidial do clone pVIR050.

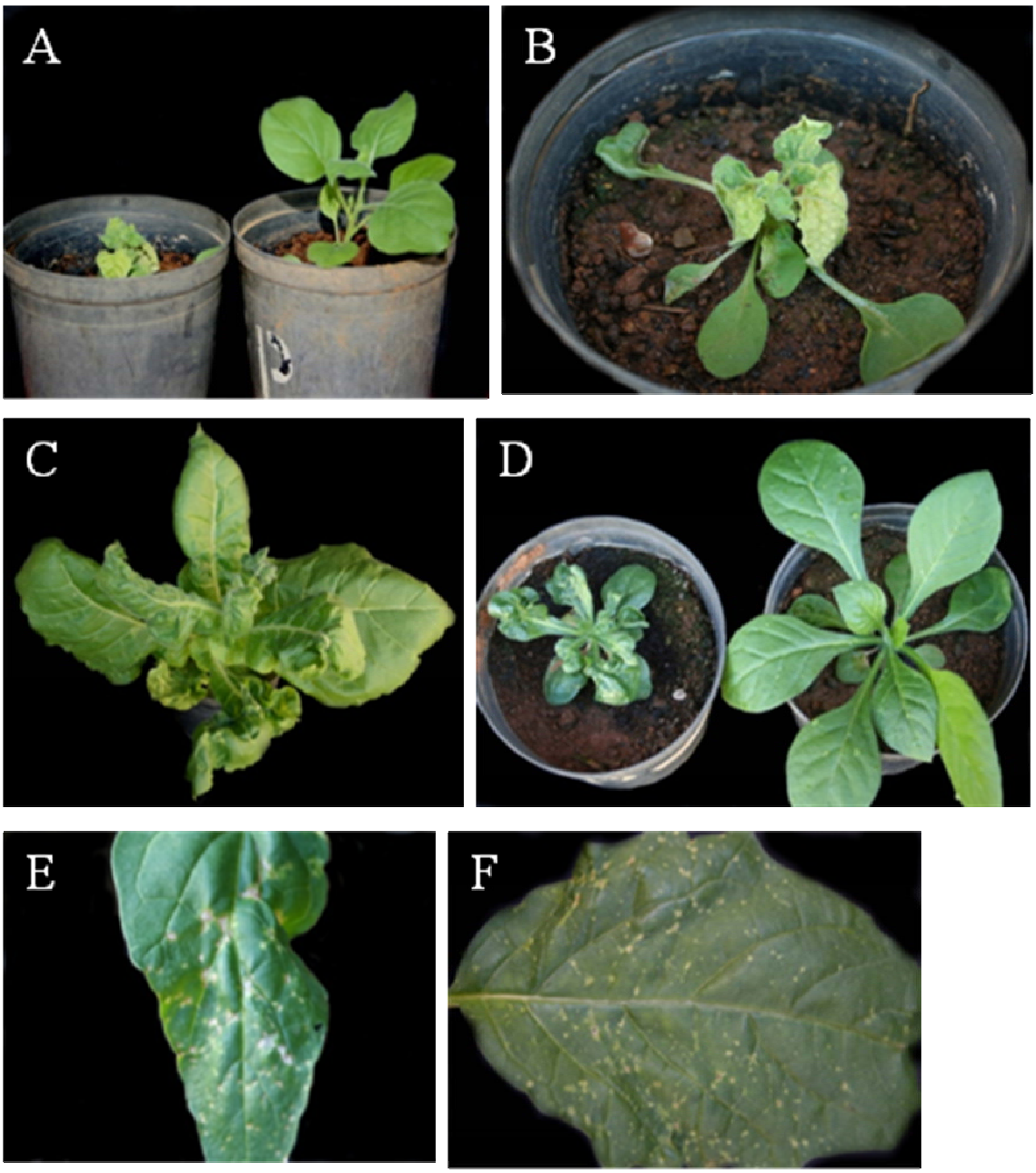


Figura 12. Sintomas observados aos 28 dias após a inoculação em plantas de *Nicotiana benthamiana, N. tabacum*, *N. clevelandii* e *D. stramonium* inoculadas via biobalística com os clones infecciosos do PSLDV-[BR:LNS2:Pas:01]. **A e B**, *N. benthamiana*; **C**, *N. tabacum* 'Havana'; **D**, *N. clevelandii*; **E**, folha inoculada de *D. stramonium*; **F**, folha com infecção sistêmica de *D. stramonium.* Em A e D a planta sadia se encontra à direita.

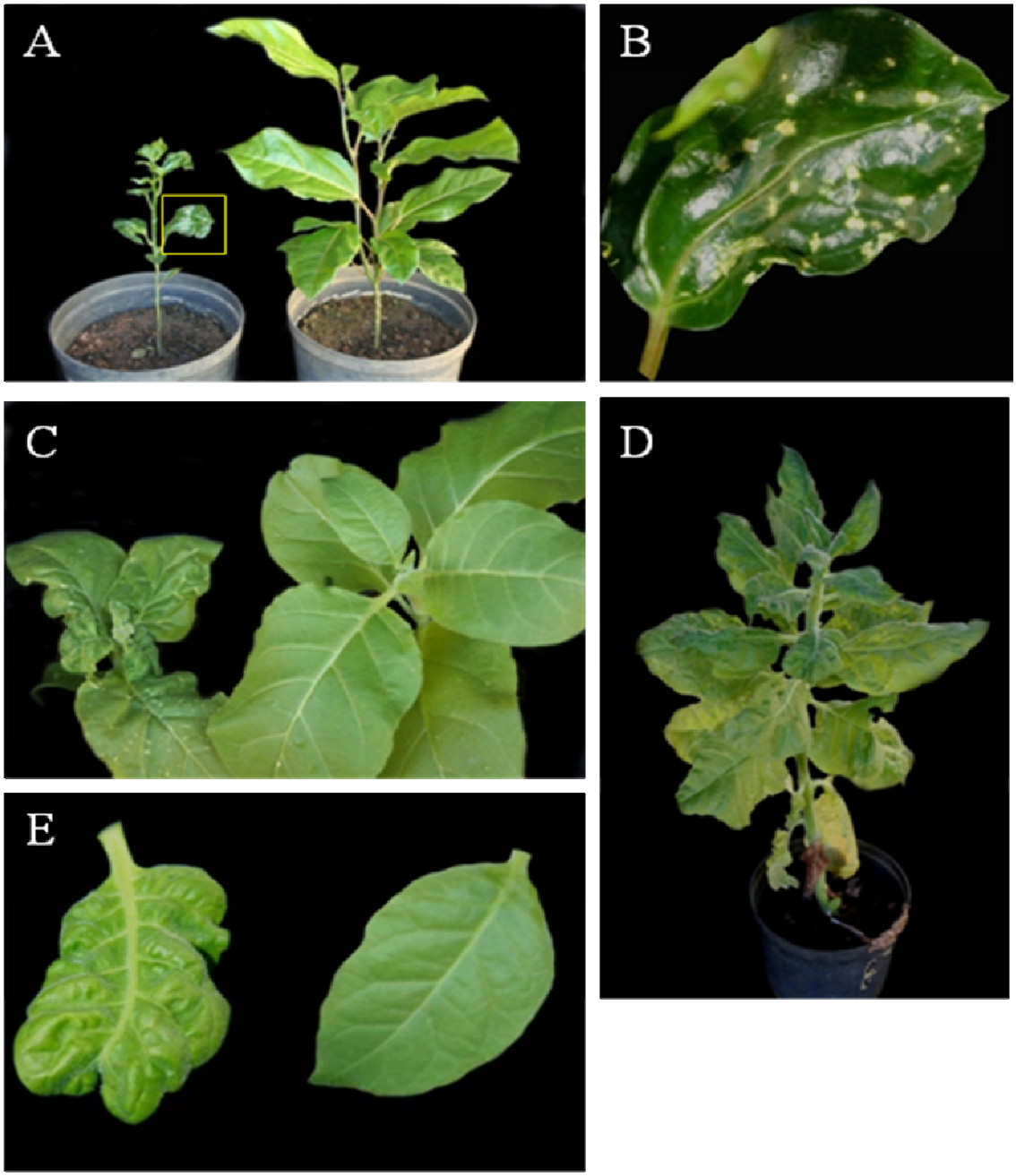


Figura 13. Sintomas observados aos 54 dias após a inoculação em plantas *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* e *N. tabacum* inoculadas via biobalística com os clones infecciosos do PSLDV-[BR:LNS2:Pas:01]. **A,** *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*; **B**, ampliação da folha destacada em A; **C**, *N. tabacum* 'Xanthi'; **D e E,** *N. tabacum* 'Samsun'. Em A, C e E a planta/folha sadia se encontra à direita.

Tabela 9. Espécies de plantas infectadas pelo PSLDV-[BR:LNS2:Pas:01] por meio de inoculação dos clones infecciosos via biobalística.

Espécie/Cultivar	Plantas infectadas/inoculadas	Sintomas	Período latente (dias)
Capsicum annuum 'Ikeda'	0/4	-	-
Chenopodium quinoa	0/4	-	-
Cucurbita pepo 'Caserta'	0/4	-	-
Datura stramonium	4/4	lns, lnl, lcs, lcl	9
Glycine max 'Tucunaré'	0/4	-	-
Nicotiana benthamiana	4/4	df, lcs, lcl, mo, rc	7
N. clevelandii	4/4	df, bo, mo, cl, rc	8
N. glutinosa	0/4	-	-
N. tabacum 'Havana'	2/4	df, bo, mo, lcs	8
N. tabacum 'Sansum'	4/4	df, bo, mo, cl, rc	8
N. tabacum 'Xanthi'	4/4	df, bo, mo, cl, rc	8
Passiflora edulis f. *flavicarpa*	1/5	df, bo, mo, lcs, lcl, rc	12
Solanum lycopersicum 'Moneymaker'	0/4	-	-
Phaseolus vulgaris 'Ouro Negro'	0/4	-	-
Phaseolus vulgaris 'Pérola'	0/4	-	-
Vigna unguiculata 'Pitiúba'	0/4	-	-

Os sintomas são representados por: **df**, deformação foliar; **bo**, bolhosidade; **lcs**,lesão clorótica sistêmica; **lcl**, lesão clorótica local; **lns**, lesão necrótica sistêmica; **lnl**, lesão necrótica local; **mo**, mosaico; **cl**, clorose; **rc**, redução de crecimento.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho descreve pela primeira vez no Brasil a caracterização molecular e biológica de um begomovírus isolado de maracujazeiro. As principais viroses do maracujá são causadas por potyvírus e rhabdovírus. Mesmo assim a importância do PSLDV não deve ser menosprezada, pois o vírus tem o potencial para acarretar grandes perdas econômicas devido à severidade dos sintomas induzidos e à incapacidade da planta de recuperar-se da infecção mesmo aos 60 dpi. Além disso, o isolado BR:LNS2:Pas:01 foi coletado no mesmo local e época do ano em que foram coletados os isolados LNS-BZ e BJL-BZ, parcialmente caracterizados e proposto como pertencentes a uma nova espécie denominada Passion flower little leaf mosaic virus (PLLMV) (Novaes *et al.*, 2003). Os isolados LNS-BZ e BR:LNS:Pas:01 foram coletados em um mesmo campo, onde praticamente 100% das plantas apresentavam sintomas de infecção por begomovírus (Novaes *et al.*, 2002), indicando a alta eficiência de infecção desses vírus em maracujazeiro.

A normalmente baixa incidência de begomovírus nessa cultura pode ser devida ao fato do biótipo predominante do inseto vetor (a mosca-branca *Bemisia tabaci*) ser pouco adaptado à colonização de plantas da família *Passifloraceae*. De fato, o biótipo B de *B. tabaci,* atualmente predominante no Brasil, não foi capaz de transmitir os isolados de PLLMV para plantas sadias de maracujazeiro (Novaes *et al.*, 2003). Isso é um indício de que o biótipo de mosca-branca que coloniza e transmite begomovírus em maracujá-amarelo é distinto do biótipo B, e provavelmente melhor adaptado à transmissão desses vírus para esse hospedeiro. Tal fato reitera a existência de uma co-adaptação do vírus com seu vetor, conforme já sugerido para os begomovírus que infectam mandioca na África (Maruthi *et al.*, 2002).

A importância do PSLDV deve ser considerada não somente pelo seu potencial em causar perdas na cultura do maracujá-amarelo, mas também por esse vírus infectar solanáceas economicamente importantes como *N. tabacum* e plantas daninhas como *Datura stramonium*, que podem servir como reservatório natural de vírus. Na verdade, é curioso que o PSLDV infecte com tanta eficiência espécies de solanáceas, mas não o tomateiro. Tanto a comparação das ORFs como a filogenia indicam proximidade do PSLDV com os begomovírus encontrados em tomateiro no Brasil. Esses resultados indicam a existência de um ancestral comum entre o PSLDV e os begomovírus que infectam tomateiro, sugerindo que durante o processo evolutivo o PSLDV pode ter se adaptado ao maracujazeiro e/ou perdido a capacidade de infectar o tomateiro. Outro dado que reforça a proximidade do PSLDV com begomovírus de tomateiro é a indução de sintomas semelhantes aos induzidos pelo ToYSV em *N. benthamiana* (Calegario *et al.*, 2007). Além disso, o DNA-B do PSLDV apresentou maior identidade de seqüência com o ToYSV (74%), e ficou mais próximo filogeneticamente do ToYSV e de vírus provenientes de *Sida* (um possível hospedeiro silvestre do PSLDV).

Esse relacionamento entre begomovírus de maracujazeiro e de tomateiro também foi observado no caso dos dois isolados de PLLMV (LNS-BZ e BJL-BZ), cujas proteínas capsidiais apresentam identidade de 97% (aa) com o ToYSV. Surpreendentemente, a identidade entre as CPs do PSLDV e PLLMV é de apenas 91%. Esse resultado sugere que eventos de recombinação podem estar envolvidos na evolução dos begomovírus encontrados em maracujazeiro. Interessantemente, apenas 3% de diferença de aminoácidos na CP (a única proteína codificada pelos begomovírus essencial para transmissão pelo vetor) são suficientes para que o biótipo B de *B. tabaci*, que transmite eficientemente o ToYSV e os demais begomovírus que infectam o tomateiro, não seja capaz de transmitir os isolados de PLLMV (Novaes *et al.*, 2003).

Entretanto, deve-se ressaltar que as seqüências dos isolados LNS-BZ e BJL-BZ de PLLMV são parciais, e que a porcentagem de identidade real pode ser menor. A possível correlação entre a gama de hospedeiros desses vírus e seu modo de transmissão natural deve ser investigada. Em particular, o biótipo de *B. tabaci* que coloniza maracujazeiro deve ser caracterizado, a fim de confirmar se a colonização de espécies de plantas específicas pelo inseto vetor pode explicar a gama de hospedeiros atípica do PSLDV.

É provável que a severidade dos sintomas induzidos pelo PSLDV possa em parte ser explicada pela alta identidade de seqüência da região comum de seus componentes genômicos, que diferem por apenas uma única substituição de nucleotídeos em 196 nucleotídeos. Isso levaria a uma replicação mais eficiente de ambos os componentes genômicos, acarretando maior acúmulo viral. De fato, o resultado da hibridização para a confirmação da gama de hospedeiros, apesar de não ser quantitativo, sugere a existência de correlação entre a severidade dos sintomas e o nível de DNA detectado em cada espécie hospedeira. As plantas com sintomas mais severos, como *N. benthamiana*, apresentaram sinal mais forte, enquanto as plantas com sintomas mais atenuados, como *Datura stramonium*, apresentaram sinal mais fraco. Outra explicação seria a presença da ORF *ac4*, cujo produto já foi caracterizado como supressor de silenciamento para os vírus ACMV e *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) (Vanitharani *et al.*, 2004). A proteína AC4 potencialmente expressa a partir dessa ORF poderia atuar como fator de virulência, contribuindo para uma maior severidade dos sintomas (Vance e Vaucheret, 2001).

O PSLDV-[BR:LNS2:Pas:01] possui duas ORFs com alta identidade de suas seqüências deduzidas de aminoácidos com a proteína AC5 do ToRMV. A alteração de um nucleotídeo na posição 612, alterando o códon de terminação TAA para qualquer

outro códon, faria com que essas duas ORFs passem a formar uma única ORF com 208 aminoácidos deduzidos, apresentando 53% de identidade com a proteína AC5 do ToRMV (e 77% de identidade para a seqüência de nucleotídeos). Essa observação sugere duas hipóteses: (i) a ORF *ac5* não é funcional, não sendo necessária para a infecção viral, ou (ii) o mRNA é traduzido pelo mecanismo de "readthrough", no qual o códon de terminação UAA é reconhecido como um códon normal.

O alinhamento da seqüência do PSLDV-[BR:LNS2:Pas:01] com outros begomovírus revelou que ele possui os mesmos iterons (seqüências relacionadas à replicação viral) que o ToCMoV (GGGG/GGGG/CACC). Somado a isso, a comparação das ORFs indicou que esses dois vírus possuem 83% de identidade de aminoácidos para a proteína Rep. Essas observações reforçam a hipótese de que o PSLDV-[BR:LNS2:Pas:01] possa ser um recombinante entre o ToCMoV (ou outro vírus que infecte o tomateiro) e um vírus não identificado. Essa hipótese é reforçada também pela presença de regiões de alta taxa de recombinação envolvendo a ORF *rep* (Lefeuvre *et al.*, 2007). Além disso, por possuírem proteínas Rep com alta identidade de seqüência e iterons idênticos, é provável que esses dois vírus possam formar pseudo-recombinantes. Entretanto, estudos posteriores serão necessários para confirmar essas hipóteses.

Apesar de os begomovírus no Brasil serem um grande problema fitossanitário nas culturas do tomateiro e do feijoeiro, a caracterização de geminivírus em outros hospedeiros, como o maracujá-amarelo, é de grande importância. Isso demonstra a rápida evolução e adaptação das espécies dessa família a novos hospedeiros. Além disso, os prejuízos causados na produção de tomateiro devido aos begomovírus só aumentaram a partir do início da década de 90, quando foi introduzido no Brasil o biótipo B de *B. tabaci* (Melo, 1992), altamente adaptado a colonizar solanáceas. Como o biótipo de mosca-branca responsável pela transmissão dos begomovírus de

maracujazeiro é provavelmente distinto do biótipo B, a possibilidade de que esses begomovírus passem a ser um grande problema fitossanitário em plantas da família *Passifloraceae* num futuro próximo não deve ser descartada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberter, B., Rezaian, M.A. e Jeske, H. Replicative intermediates of Tomato leaf curl virus and its satellite DNAs. Virology, v.331, p.441-448. 2005.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. e Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, v.215, p.403-410. 1990.

Andrade, E.C., Manhani, G.G., Alfenas, P.F., Calegario, R.F., Fontes, E.P.B. e Zerbini, F.M. *Tomato yellow spot virus*, a tomato-infecting begomovirus from Brazil with a closer relationship to viruses from *Sida* sp., forms pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from *Sida*. Journal of General Virology, v.87, p.3687-3696. 2006.

Aragão, F.J.L., Barros, L.M.G., Brasileiro, A.C.M., Ribeiro, S.G., Smith, F.D., Sanford, J.C., Faria, J.C. e Rech, E.L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris L.*) co-transformed via particle bombardment. Theoretical and Applied Genetics, v.93, p.142-150. 1996.

Argüello-Astorga, G., Herrera-Estrella, L. e Rivera-Bustamante, R. Experimental and theoretical definition of geminivirus origin of replication. Plant Molecular Biology, v.26, p.553-556. 1994.

Arguello-Astorga, G., Lopez-Ochoa, L., Kong, L.J., Orozco, B.M., Settlage, S.B. e Hanley-Bowdoin, L. A novel motif in geminivirus replication proteins interacts with the plant retinoblastoma-related protein. Journal of Virology, v.78, p.4817-4826. 2004.

Briddon, R.W., Bull, S.E., Amin, I., Idris, A.M., Mansoor, S., Bedford, I.D., Dhawan, P., Rishi, N., Siwatch, S.S., Abdel-Salam, A.M., Brown, J.K., Zafar, Y. e Markham, P.G. Diversity of DNA beta, a satellite molecule associated with some monopartite begomoviruses. Virology, v.312, p.106-121. 2003.

Briddon, R.W., Pinner, M.S., Stanley, J. e Markham, P.G. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. Virology, v.177, p.85-94. 1990.

Brown, J.K., Bird, J. e Fletcher, D.C. First report of passiflora leaf mottle disease caused by a whitefly-transmitted geminivirus in Puerto Rico. Plant Disease, v.77, p.1264. 1993.

Bruckner, C.H., Melletti, L.M.M., Otoni, W.C. e Zerbini, F.M. Maracujazeiro. In: Bruckner, C.H. (Ed.). Melhoramento de fruteiras tropicais. Viçosa, MG: Editora UFV, 2002. p.373-409.

Calegario, R.F., Ferreira, S.S., Andrade, E.C. e Zerbini, F.M. Characterization of *Tomato yellow spot virus*, (ToYSV), a novel tomato-infecting begomovirus from Brazil. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.42, p.1335-1343. 2007.

Carvalho, C.M., Fontenelle, M.R., Florentino, L.H., Santos, A.A., Zerbini, F.M. e Fontes, E.P. A novel nucleocytoplasmic traffic GTPase identified as a functional target of the bipartite geminivirus nuclear shuttle protein. Plant Journal. 2008.

Chatterjee, A. e Ghosh, S.K. A new monopartite begomovirus isolated from *Hibiscus cannabinus* L. in India. Archives of Virology. 2007.

Cui, X.F., Li, G.X., Wang, D.W., Hu, D.W. e Zhou, X.P. A begomovirus DNA beta-encoded protein binds DNA, functions as a suppressor of RNA silencing, and targets the cell nucleus. Journal of Virology, v.79, p.10764-10775. 2005.

Dellaporta, S.L., Wood, J. e Hicks, J.B. A plant DNA minipreparation: Version II. Plant Molecular Biology Reporter, v.1, p.19-21. 1983.

Dhawan, K., Dhawan, S. e Sharma, A. Passiflora: a review update. J Ethnopharmacol, v.94, p.1-23. 2004.

Ding, S.W., Li, H., Lu, F., Li, F. e Li, W.X. RNA silencing: A conserved antiviral immunity of plants and animals. Virus Research, v.102, p.109-115. 2004.

Faleiro, F.G., Junqueira, N.T.V. e Braga, M.F. Maracujá: Germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados. 2005

Fauquet, C.M., Briddon, R.W., Brown, J.K., Moriones, E., Stanley, J., Zerbini, F.M. e Zhou, X. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. Archives of Virology, v.153, p.783-821. 2008.

Ferreira, P.T., Lemos, T.O., Nagata, T. e Inoue-Nagata, A.K. One-step cloning approach for construction of agroinfectious begomovirus clones. Journal of Virological Methods, v.147, p.351-354. 2008.

Fontenelle, M.R., Luz, D.F., Gomes, A.P., Florentino, L.H., Zerbini, F.M. e Fontes, E.P. Functional analysis of the naturally recombinant DNA-A of the bipartite begomovirus Tomato chlorotic mottle virus. Virus Research, v.126, p.262-267. 2007.

Fontes, E.P.B., Luckow, V.A. e Hanley-Bowdoin, L. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. Plant Cell, v.4, p.597-608. 1992.

Fontes, E.P.B., Santos, A.A., Luz, D.F., Waclawovsky, A.J. e Chory, J. The geminivirus nuclear shuttle protein is a virulence factor that suppresses transmembrane receptor kinase activity. Genes & Development, v.18, p.2545-2556. 2004.

Frischmuth, S., Wege, C., Hulser, D. e Jeske, H. The movement protein BC1 promotes redirection of the nuclear shuttle protein BV1 of Abutilon mosaic geminivirus to the plasma membrane in fission yeast. Protoplasma, v.230, p.117-123. 2007.

Guindon, S. e Gascuel, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Systematics Biology, v.52, p.696-704. 2003.

Gutierrez, C. Geminivirus DNA replication. Cellular and Molecular Life Sciences, v.56, p.313-329. 1999.

Hanley-Bowdoin, L., Settlage, S.B., Orozco, B.M., Nagar, S. e Robertson, D. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. Critical Reviews in Plant Sciences, v.18, p.71-106. 1999.

Hao, L., Wang, H., Sunter, G. e Bisaro, D.M. Geminivirus AL2 and L2 proteins interact with and inactivate SNF1 kinase. Plant Cell, v.15, p.1034-1048. 2003.

Harrison, B.D. e Robinson, D.J. Natural genomic and antigenic variation in white-fly transmitted geminiviruses (begomoviruses). Annual Review of Phytopathology, v.39, p.369-398. 1999.

Hofer, P., Bedford, I.D., Markham, P.G., Jeske, H. e Frischmuth, T. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. Virology, v.236, p.288-295. 1997.

IBGE. Produção agrícola municipal 2006.

Jeske, H., Lutgemeier, M. e Preiss, W. DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of Abutilon mosaic virus. EMBO Journal, v.20, p.6158-6167. 2001.

Koonin, E.V. e Ilyina, T.V. Geminivirus replication proteins are related to prokariotic plasmid rolling circle DNA replication initiator proteins. Journal of General Virology, v.73, p.2763-2766. 1992.

Kumar, S., Tamura, K. e Nei, M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetic analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics, v.5, p.150-163. 2004.

Laufs, J., Schumacher, S., Geisler, N., Jupin, I. e Gronenborn, B. Identification of the nicking tyrosine of geminivirus Rep protein. FEBS Letters, v.377, p.258-262. 1995a.

Laufs, J., Traut, W., Heyraud, F., Matzeit, G., Rogers, S.G., Schell, J. e Gronenborn, B. *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, USA, v.92, p.3879-3883. 1995b.

Lavia, P.A. e Jansen-Durr, P. E2F target genes and cell-cycle check-point control. BioEssays, v.21, p.221-230. 1999.

Lazarowitz, S.G. Geminiviruses: Genome structure and gene function. Critical Reviews in Plant Sciences, v.11, p.327-349. 1992.

Lefeuvre, P., Martin, D.P., Hoareau, M., Naze, F., Delatte, H., Thierry, M., Varsani, A., Becker, N., Reynaud, B. e Lett, J.M. Begomovirus 'melting pot' in the south-west Indian Ocean islands: molecular diversity and evolution through recombination. Journal of General Virology, v.88, p.3458-3468. 2007.

Legg, J. e Fauquet, C. Cassava mosaic geminiviruses in Africa. Plant Molecular Biology, v.56, p.585-599. 2004.

Mansoor, S., Briddon, R.W., Zafar, Y. e Stanley, J. Geminivirus disease complexes: An emerging threat. Trends in Plant Science, v.8, p.128-134. 2003.

Mariano, A.C., Andrade, M.O., Santos, A.A., Carolino, S.M.B., Oliveira, M.L., Baracat-Pereira, M.C., Brommonshenkel, S.H. e Fontes, E.P.B. Identification of a novel receptor-like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein. Virology, v.318, p.24-31. 2004.

Maruthi, M.N., Colvin, J., Seal, S., Gibson, G. e Cooper, J. Co-adaptation between cassava mosaic geminiviruses and their local vector populations. Virus Research, v.86, p.71-85. 2002.

Melo, P.C.T. Mosca branca ameaça produção de hortaliças. Campinas, SP, Brazil: Asgrow do Brasil Sementes Ltda., Technical Bulletin 1992.

Monci, F., Sanchez-Campos, S., Navas-Castillo, J. e Moriones, E. A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. Virology, v.303, p.317-326. 2002.

Morales, F.J. History and current distribution of begomoviruses in Latin America. Advances in Virus Research, v.67, p.127-162. 2006.

Moriones, E. e Navas-Castillo, J. *Tomato yellow leaf curl virus*, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. Virus Research, v.71, p.123-134. 2000.

Nagar, S., Hanley-Bowdoin, L. e Robertson, D. Host DNA replication is induced by geminivirus infection of differentiated plant cells. Plant Cell, v.14, p.2995-3007. 2002.

Nagar, S., Pedersen, T.J., Carrick, K.M., Hanley-Bowdoin, L. e Robertson, D. A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. Plant Cell, v.7, p.705-719. 1995.

Nascimento, A.V.S., Santana, E.N., Braz, A.S.K., Alfenas, P.F., Pio-Ribeiro, G., Andrade, G.P., Carvalho, M.G. e Zerbini, F.M. Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. Archives of Virology, v.151, p.1797-1809. 2006.

Noueiry, A.O., Lucas, W.J. e Gilbertson, R.L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. Cell, v.76, p.925-932. 1994.

Novaes, Q.S., Freitas-Astua, J., São José, A.R., Yuki, V.A., Kitajima, E.W. e Rezende, J.A.M. Infecção mista de Maracujazeiro com o *Passion fruit woodiness virus* e um begomovírus no estado da Bahia. Fitopatologia Brasileira, v.27. 2002.

Novaes, Q.S., Freitas-Astua, J., Yuki, V.A., Kitajima, E.W. e Rezende, J.A.M. Partial characterization of a bipartite begomovirus infecting yellow passion flower in Brazil. Plant Pathology, v.52, p.648-654. 2003.

Olsen, A.N., Ernst, H.A., Leggio, L.L. e Skriver, K. NAC trascription factors: structurally distinct, functionally diverse. Trends in Plant Science, v.10, p.79-87. 2005.

Orozco, B.M., Kong, L.J., Batts, L.A., Elledge, S. e Hanley-Bowdoin, L. The multifunctional character of a geminivirus replication protein is reflected by its complex oligomerization properties. Journal of Biological Chemistry, v.275, p.6114-6122. 2000.

Orozco, B.M., Miller, A.B., Settlage, S.B. e Hanley-Bowdoin, L. Functional domains of a geminivirus replication protein. Journal of Biological Chemistry, v.272, p.9840-9846. 1997.

Padidam, M., Sawyer, S. e Fauquet, C.M. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. Virology, v.265, p.218-224. 1999.

Pedersen, T.J. e Hanley-Bowdoin. Molecular characterization of the AL3 protein encoded by a bipartite geminivirus. Virology, v.202, p.1070-1075. 1994.

Posada, D. e Crandall, K.A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics, v.14, p.817-818. 1998.

Preiss, W. e Jeske, H. Multitasking in replication is common among geminiviruses. Journal of Virology, v.77, p.2972-2980. 2003.

Rojas, M.R., Gilbertson, R.L., Russell, D.R. e Maxwell, D.P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. Plant Disease, v.77, p.340-347. 1993.

Rojas, M.R., Hagen, C., Lucas, W.J. e Gilbertson, R.L. Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. Annual Review of Phytopathology, v.43, p.361-394. 2005.

Rojas, M.R., Jiang, H., Salati, R., Xoconostle-Cazares, B., Sudarshana, M.R., Lucas, W.J. e Gilbertson, R.L. Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, tomato yellow leaf curl virus. Virology, v.291, p.110-125. 2001.

Rybicki, E.P. A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of Geminiviridae. Archives of Virology, v.139, p.49-77. 1994.

Sambrook, J. e Russel, D. Molecular Cloning - A Laboratory Manual (3ª ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001. 2344 p.

Sanderfoot, A.A., Ingham, D.J. e Lazarowitz, S.G. A viral movement protein as a nuclear shuttle. The geminivirus BR1 movement protein contains domains essential for interaction with BL1 and nuclear localization. Plant Physiology, v.110, p.23-33. 1996.

Sanderfoot, A.A. e Lazarowitz, S.G. Cooperation in viral movement: The geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery. Plant Cell, v.7, p.1185-1194. 1995.

Sanderfoot, A.A. e Lazarowitz, S.G. Getting it together in plant virus movement: Cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. Trends in Cell Biology, v.6, p.353-358. 1996.

Selth, L.A., Dogra, S.C., Rasheed, M.S., Healy, H., Randles, J.W. e Rezaian, M.A. A NAC domain protein interacts with *Tomato leaf curl virus* replication accessory protein and enhances viral replication. Plant Cell, v.17, p.311-325. 2005.

Settlage, S.B., Miller, A.B., Gruissem, W. e Hanley-Bowdoin, L. Dual interaction of a geminivirus replication accessory factor with a viral replication protein and a plant cell cycle regulator. Virology, v.279, p.570-576. 2001.

Silva, S.C., Assunção, I.P., Carnaúba, J.P., Lima, J.S., Amorim, E.P.R. e Lima, G.S.A. Detecção de begomovírus em maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims) no estado de Alagoas. Revista Brasileira de Fruticultura, v.28. 2006.

Stanley, J. Analysis of African cassava mosaic virus recombinants suggest strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. Virology, v.206, p.707-712. 1995.

Stanley, J., Bisaro, D.M., Briddon, R.W., Brown, J.K., Fauquet, C.M., Harrison, B.D., Rybicki, E.P. e Stenger, D.C. Family *Geminiviridae*. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. e Ball, L.A. (Ed.). Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p.301-326.

Sunter, G. e Bisaro, D.M. Transactivation of geminivirus AR1 and BR2 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. Plant Cell, v.4, p.1321-1331. 1992.

Sunter, G. e Bisaro, D.M. Regulation of a geminivirus coat protein promoter by AL2 protein (TrAP): evidence for activation and derepression mechanisms. Virology, v.232, p.269-280. 1997.

Sunter, G. e Bisaro, D.M. Identification of a minimal sequence required for activation of the tomato golden mosaic virus coat protein promoter in protoplasts. Virology, v.305, p.452-462. 2003.

Sunter, G., Hartitz, M.D., Hormuzdi, S.G., Brough, C.L. e Bisaro, D.M. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required for coat protein accumulation while ORF AL3 is necessary for eficient DNA replication. Virology, v.179, p.69-77. 1990.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. e Gibson, T.J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, v.22, p.4673-4680. 1994.

Trinks, D., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P.V., Akbergenov, R., Oakeley, E.J., Veluthambi, K., Hohn, T. e Pooggin, M.A. Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. Journal of Virology, v.79, p.2517-2527. 2005.

Vance, V. e Vaucheret, H. RNA silencing in plants - Defense and counterdefense. Science, v.292, p.2277-2280. 2001.

Vanitharani, R., Chellappan, P., Pita, J.S. e Fauquet, C.M. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. Journal of Virology, v.78, p.9487-9498. 2004.

Voinnet, O., Pinto, Y.M. e Baulcombe, D.C. Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, v.96, p.14147-14152. 1999.

Wang, H., Buckley, K.J., Yang, X., Buchmann, R.C. e Bisaro, D.M. Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. J. Virol., v.79, p.7410-7418. 2005.

Wang, H., Hao, L.H., Shung, C.Y., Sunter, G. e Bisaro, D.M. Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. Plant Cell, v.15, p.3020-3032. 2003.

Zhou, X., Liu, Y., Calvert, L., Munoz, C., Otim-Nape, G.W., Robinson, D.J. e Harrison, B.D. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. Journal of General Virology, v.78, p.2101-2111. 1997.

ANEXOS

Tabela 10. Lista de abreviaturas e números de acesso dos genomas virais utilizados para a comparação de seqüencias.

Espécie	**Sigla**	**No. de acesso no GenBank**	
		DNA-A	**DNA-B**
Abutilon mosaic virus	AbMV	NC_001928	NC_001929
African cassava mosaic virus	ACMV	NC_001467	NC_001468
Bean calico mosaic virus	BCaMV	AF110189	AF110190
Bean dwarf mosaic virus	BDMV	NC_001931	NC_001930
Bean golden mosaic virus	BGMV	NC_004042	NC_004043
Bean golden yellow mosaic virus	BGYMV	NC_001439	NC_001438
Blainvillea yellow spot virus	BlYSV	EU710756	EU710757
Cabbage leaf curl Jamaica virus	CabLCuJV	DQ178614	n.d.
Cabbage leaf curl virus	CabLCuV	NC_003866	NC_003887
Chino del tomate virus	CdTV	NC_003830	NC_003831
Chilli leaf curl virus	ChiLCuV	NC_004628	n.d.
Cotton leaf crumple virus	CLCrV	NC_004580	NC_004581
Corchorus yellow spot virus	CoYSV	DQ875868	DQ875869
Cucurbit leaf curl virus	CuLCrV	NC_002984	NC_002985
Desmodium leaf distortion virus	DesLDV	NC_008494	NC_008495
Dicliptera yellow mosaic Cuba virus	DiYMCUV	AJ549960	n.d.
Dicliptera yellow mosaic virus	DiYMV	NC_003856	NC_003857
Euphorbia mosaic virus	EuMV	NC_008304	NC_008305
Honeysuckle yellow vein mosaic virus	HYVMV	AB178946	n.d.
Macroptilium golden mosaic virus	MaGMV	EU158096	EU158097
Macroptilium mosaic Puerto Rico virus	MaMPRV	NC_004097	NC_004098
Macroptilium yellow mosaic Florida virus	MaYMFV	NC_004099	NC_004100
Macroptilium yellow mosaic virus	MaYMV	NC_010647	NC_010648
Melon chlorotic leaf curl virus	MCLCuV	NC_003865	NC_003860
Merremia mosaic virus	MeMV	NC_007965	NC_007966
Nicandra deforming necrosis virus	NDNV	n.d.	n.d.
Okra yellow mosaic Mexico virus	OYMMV	DQ022611	n.d.
Okra yellow mottle Iguala virus	OYMoIV	AY751753	n.d.
Papaya leaf curl virus	PaLCuV	DQ989326	n.d.
Passion flower little leaf mosaic virus *	PLLMV-[BJL-BZ]	AY167565	n.d.
	PLLMV-[LNS-BZ]	AY167566	n.d.
Pepper golden mosaic virus	PepGMV	NC_004101	NC_004096
Pepper leaf curl Pakistan virus	PepLCPV	DQ116878	n.d.
Pepper huasteco yellow vein virus	PHYVV	NC_001359	NC_001369
Potato yellow mosaic Panama virus	PYMPV	NC_002048	NC_002049
Potato yellow mosaic virus	PYMV	NC_001934	NC_001935
Rhynchosia mosaic Sinaloa virus	RhGMSV	DQ406672	DQ406673
Rhyncosia golden mosaic virus	RhGMV	NC_010294	NC_010293

Sida golden mosaic Costa Rica virus	SGMCRV	NC_004657	NC_004658
Sida golden mosaic Honduras virus	SGMHV	NC_004659	NC_004660
Sida golden mosaic virus	SGMV	NC_002046	NC_002047
Sida common mosaic virus	SiCmMV	EU710751	n.d.
Sida golden yellow vein virus	SiGYVV	NC_004635	n.d.
Sida micrantha mosaic virus	SimMV-[A2B2]	NC_005330	NC_005331
	SimMV-[A3B1]	n.d.	AJ557452
Sida mottle virus	SiMoV-[A1B3]	AJ557450	AJ557454
	SiMoV	NC_004637	n.d.
Sida yellow leaf curl virus	SiYLCV	EU710750	n.d.
Sida yellow mosaic virus	SiYMV	NC_004639	n.d.
Sida yellow mosaic Yucatan virus	SiYMYuV	NC_008779	NC_008780
Sida yellow vein virus	SiYVV	NC_004661	NC_004662
Soybean blistering mosaic virus	SoBlMV	EF016486	n.d.
Squash leaf curl virus	SqLCV	NC_001936	NC_001937
Squash mild leaf curl virus	SqMLCV	NC_004645	NC_004646
Tomato golden mosaic virus	TGMV	NC_001507	NC_001508
Tomato chino La Paz virus	ToChLPV	NC_005843	n.d.
Tomato common mosaic virus	ToCmMV	EU710754	EU710755
Tomato chlorotic mottle virus	ToCMoV-[BA-Se1]	NC_003664	NC_003665
	ToCMoV-[MG-Bt1]	AY090557	n.d.
	ToCMoV-[MG-Ig1]	DQ336353	DQ336354
Tomato crinkle leaf yellows virus	ToCLYV	n.d.	AY090556
Tomato golden mottle virus	ToGMoV	NC_008058	NC_008057
Tomato leaf curl Cuba virus	ToLCCUV	AM050143	n.d.
Tomato leaf curl New Delhi virus	ToLCNDV	NC_004611	NC_004612
Tomato leaf curl Sinaloa virus	ToLCSV	NC_009606	NC_009605
Tomato leaf distortion virus	ToLDV	EU710749	n.d.
Tomato mosaic Havana virus	ToMHV	NC_003867	NC_003868
Tomato mild leaf curl virus	ToMlMV	EU710752	EU710753
Tomato mottle Taino virus	ToMoTV	AF012300	AF012301
Tomato mottle virus	ToMoV	NC_001938	NC_001939
Tomato mild yellow leaf curl Aragua virus	ToMYLCAV	NC_009490	NC_009491
Tomato rugose mosaic virus	ToRMV	NC_002555	NC_002556
Tomato severe rugose virus	ToSRV-[GO]	NC_009607	NC_009612
	ToSRV-[MG]	AY029750	n.d.
Tomato yellow spot virus	ToYSV	NC_007726	NC_007727
Tomato yellow vein streak virus	ToYVSV-[Ba3]	EF417915	EF417916
	ToYVSV-[G22]	EF459696	n.d.
	ToYVSV-[Ub]	n.d.	DQ336352
Tomato severe leaf curl virus	TSLCV-[GT96]	NC_004642	n.d.
Watermelon chlorotic stunt virus	WmCSV	NC_003708	NC_003709

*seqüências parciais

Lista de figuras

Figura	Página	Descrição
1	18	Clivagem enzimática dos componentes genômicos virais amplificados, para identificação de enzimas que linearizam o DNA-A e o DNA-B do isolado BR:LNS02:Pas:01.
2	18	Hibridização do DNA viral com sondas específicas para DNA-A e DNA-B, para identificação de enzimas que linearizam apenas o DNA-B do isolado BR:LNS2:Pas:01.
3	19	Confirmação da clonagem do DNA-A e DNA-B do isolado BR:LNS2:Pas:01.
4	20	Representação esquemática do genoma do Passion flower severe leaf distortion virus (PSLDV-[BR:LNS2:Pas:01]).
5	31	Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento das seqüências de nucleotídeos completas do DNA-A de espécies de begomovírus.
6	33	Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento das seqüências de nucleotídeos completas do DNA-B de espécies de begomovírus.
7	35	Confirmação da clonagem do fragmento de 569 nt, que inclui a origem de replicação, proveniente do DNA-A do PSLDV-[BR:LNS2:Pas:01].
8	36	Confirmação da clonagem e orientação do clone pVIR070, correspondente a 1,2 cópia do DNA-A do PSLDV-[BR:LNS2:Pas:01].
9	37	Digestão parcial do genoma viral amplificado do PSLDV-[BR:LNS2:Pas:01] com a enzima *Sal* I (**A**) e *Sac* I (**B**).
10	38	Confirmação da clonagem e orientação do clone pVIR086, correspondente a 1,7 cópia do DNA-B do PSLDV-[BR:LNS2:Pas:01].

11	40	Detecção viral em plantas inoculadas via biobalística com o PSLDV-[BR:LNS2:Pas01] por meio de hibridização utilizando sonda específica para o DNA-A.
12	41	Sintomas observados aos 28 dias após a inoculação em plantas de *Nicotiana benthamiana, N. tabacum*, *N. clevelandii* e *D. stramonium* inoculadas via biobalística com os clones infecciosos do PSLDV-[BR:LNS2:Pas:01].
13	42	Sintomas observados aos 54 dias após a inoculação em plantas *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* e *N. tabacum* inoculadas via biobalística com os clones infecciosos do PSLDV-[BR:LNS2:Pas:01].