

TATHIANA FERREIRA SÁ ANTUNES

**DETERMINANTES VIRAIS ENVOLVIDOS NA ADAPTABILIDADE
DIFERENCIAL DE DOIS BEGOMOVÍRUS EM TOMATEIRO E
*Nicotiana benthamiana***

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
2011

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

T

A636d
2011

Antunes, Tathiana Ferreira Sá, 1986-

Determinantes virais envolvidos na adaptabilidade
diferencial de dois begomovírus em tomateiro e
Nicotiana benthamiana / Tathiana Ferreira Sá Antunes.

– Viçosa, MG, 2011.

viii, 63f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Maurílio Alves Moreira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 51-63

1. Vírus de plantas. 2. Geminivírus. 3. Begomovírus.
4. Tropismo. 5. Relação hospedeiro-parasito.
6. Mosaico-do-tomateiro - Genética. 7. Tomate - Doenças e
pragas. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 579.28

TATHIANA FERREIRA SÁ ANTUNES

**DETERMINANTES VIRAIS ENVOLVIDOS NA ADAPTABILIDADE
DIFERENCIAL DE DOIS BEGOMOVÍRUS EM TOMATEIRO E
*Nicotiana benthamiana***

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: 16 de setembro de 2011.

Pesq. Poliane Alfenas Zerbini

Prof^a. Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Coorientadora)

Prof. Francisco Murilo Zerbini Junior
(Presidente da Banca)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado força e perseverança para chegar até aqui e por colocar pessoas maravilhosas em vida que me ajudaram a realizar esse projeto.

Aos meus pais e aos meus irmãos, pelo amor, apoio incondicional, incentivo, compreensão e dedicação em todos os momentos da minha vida;

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro;

Ao Prof. Francisco Murilo Zerbini, pela orientação, oportunidade, amizade e por todos os ensinamentos;

À pesquisadora Elizabeth Pacheco Batista Fontes, pela co-orientação, colaboração e amizade;

À pesquisadora Poliane Alfenas Zerbini, pela colaboração e amizade;

Às amigas, Daniela, Giselle, Marcella, Rebeca e Thaís, pela amizade e pelo apoio em todos os momentos;

Aos meus amigos do Laboratório de Virologia Vegetal Molecular: Adriana, Ana, André, Álvaro, Amanda, Antônio, César, Jorge, Joyce, Larissa, Marcelo, Márcio, Marcos, Miguel, Renan, Riane, Roberto, Sarah, Sheila e Sílvia. Em especial: Alison, Carol, Dani, Fernanda, Gloria e Joyce pela amizade, ensinamentos e constante ajuda;

Ao Alex por toda ajuda nas horas gastas no micrótomo;

À Ana Cláudia pela ajuda na edição das imagens;

Aos funcionários Fizinho e Joaquim do DFP pela ajuda prestada no desenvolvimento deste trabalho e pela amizade;

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

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1. A família <i>Geminiviridae</i>	6
2.2. Replicação viral	9
2.3. Movimento do vírus na planta	11
2.4. Interações geminivírus-hospedeiro	15
2.5. Begomovírus em tomateiro no Brasil	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. Origem e manutenção dos isolados virais	25
3.2. Construção dos vírus recombinantes	25
3.3. Inoculação dos componentes recombinantes	27
3.4. Extração de DNA total e confirmação da infecção	29
3.5. Acúmulo de DNA viral nas plantas infectadas	29
3.6. Hibridização <i>in situ</i>	30
4. RESULTADOS	31
4.1. Efeito dos genes <i>MP</i> e <i>NSP</i> do ToRMV na severidade de sintomas, no acúmulo de DNA viral em tomateiro e <i>N. benthamiana</i> , e no tropismo de tecido em <i>N. benthamiana</i>	31
4.2. Efeito dos genes <i>MP</i> e <i>NSP</i> do ToYSV na severidade de sintomas, no acúmulo de DNA viral em tomateiro e <i>N. benthamiana</i> , e no tropismo de tecido em <i>N. benthamiana</i>	41
4.3. Efeito da região BRi do ToYSV na severidade de sintomas, no acúmulo de DNA viral em tomateiro e <i>N. benthamiana</i> , e no tropismo de tecido em <i>N. benthamiana</i>	42
5. DISCUSSÃO	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

RESUMO

ANTUNES, Tathiana Ferreira Sá, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2011. **Determinantes virais envolvidos na adaptabilidade diferencial de dois begomovírus em tomateiro e *Nicotiana benthamiana*.** Orientador: Maurílio Alves Moreira. Co-orientadores: Elizabeth Pacheco Batista Fontes e Francisco Murilo Zerbini Júnior.

Os begomovírus (família *Geminiviridae*) possuem genoma constituído por um ou dois componentes de DNA de fita simples circular, e infectam plantas dicotiledôneas. Os sintomas induzidos pelo begomovírus *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) em tomateiro e *Nicotiana benthamiana* são mais severos e surgem mais cedo em comparação aos induzidos pelo *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV). Além disso, o ToYSV invade o mesofilo em *N. benthamiana*, enquanto o ToRMV é restrito ao floema nesse hospedeiro (ambos os vírus são restritos ao floema em tomateiro). Essas observações indicam uma adaptação diferencial de cada um desses vírus aos seus hospedeiros. Com o objetivo de mapear os determinantes genéticos virais responsáveis por essa adaptação diferencial, foram construídos três recombinantes com base na troca dos genes *MP* e *NSP* e da região BRi entre esses vírus, em diferentes combinações. Os experimentos com os recombinantes foram realizados para determinar o ganho ou a perda das seguintes características: intensidade de sintomas, acúmulo de DNA viral e tropismo de tecido. Os recombinantes recíprocos nos quais os genes *MP* e *NSP* foram trocados apresentaram sintomas de intensidade intermediária em comparação aos vírus parentais em ambos os hospedeiros, e o mesmo tropismo de tecido em *N. benthamiana*. Já o recombinante no qual a região BRi do ToYSV foi inserido no DNA-B do ToRMV foi capaz de infectar o mesofilo em *N. benthamiana*. Em conjunto, esses resultados sugerem que as proteínas MP e NSP e a região BRi estão envolvidas na adaptação do

ToYSV em tomateiro e *N. benthamiana*, e que a região BRi é o determinante viral de tropismo de tecido em *N. benthamiana*. Outras proteínas e sequências regulatórias presentes no DNA-A também devem estar envolvidas na adaptação desses vírus, no entanto experimentos adicionais, incluindo a análise do recombinante no qual a região BRi do ToRMV esteja inserida no DNA-B do ToYSV, são necessários para a identificação precisa dessas regiões.

ABSTRACT

ANTUNES, Tathiana Ferreira Sá, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2011. **Viral determinants involves in the differential adaptation of two begomovirus in tomato and *Nicotiana benthamiana*.** Adviser: Maurílio Alves Moreira. Co-advisers: Elizabeth Pacheco Batista Fontes and Francisco Murilo Zerbini Júnior.

Begomoviruses (family *Geminiviridae*) have a genome composed of a one or two components of circular, single-stranded DNA and infect dicotyledoneous plants. Symptoms induced by the begomovirus *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) in tomato and *Nicotiana benthamiana* are more severe and appear earlier compared to those induced by *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV). Furthermore, ToYSV invades the mesophyll in *N. benthamiana*, whereas ToRMV is phloem-restricted in this host (both viruses are phloem-restricted in tomato). These observations suggest a differential adaptation of each virus to its host. In order to map the viral genetic determinants responsible for this differential adaptation, three recombinants were constructed based on the exchange of the *MP* and *NSP* genes and the BRi region between the two viruses, in different combinations. Experiments with the recombinants were performed to determine the gain or loss of the following characteristics: intensity of symptoms, viral DNA accumulation and tissue tropism. Reciprocal recombinants in which the *MP* and *NSP* genes were swapped induced symptoms of intermediate intensity compared to the parental viruses in both hosts, and had the same tissue tropism in *N. benthamiana*. The recombinant in which the ToYSV BRi region was placed in the ToRMV DNA-B background was capable of invading the mesophyll in *N. benthamiana*. Together, these results indicate that the MP and NSP proteins as well as the BRi region are involved in the adaptation of ToYSV in tomato and *N. benthamiana*, and that the BRi region is the

viral determinant of tissue tropism in *N. benthamiana*. Other proteins and regulatory sequences present in the DNA-A could also be involved in the adaptation of these viruses, however further experiments, including the analysis of a recombinant in which the BRi region from ToRMV is placed in the ToYSV background, are necessary for their precise identification.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 30 anos, problemas fitossanitários associados a insetos do gênero *Bemisia* (Homoptera:Aleyrodidae), conhecidos vulgarmente por "mosca-branca", tem se tornado frequentes em tomateiros cultivados em todo o mundo (Morales & Anderson, 2001; Naranjo & Ellsworth, 2001). Uma das principais consequências do aumento populacional desses insetos é o aumento da incidência e severidade de viroses causadas por vírus pertencentes à família *Geminiviridae* (Mansoor *et al.*, 2003; Morales & Jones, 2004). A família engloba vírus com genoma composto por uma ou duas fitas simples de DNA circular, encapsidados em uma partícula icosaédrica geminada. A família é dividida em quatro gêneros (*Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus* e *Topocuvirus*), de acordo com o tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros, organização do genoma e relacionamento filogenético (Stanley *et al.*, 2005).

Os begomovírus possuem um ou dois componentes genômicos, infectam plantas dicotiledôneas e são transmitidos naturalmente pela mosca-branca *Bemisia tabaci* (Homoptera:Aleyrodidae). Os begomovírus do "Velho Mundo" (Europa, Ásia e África) apresentam um ou dois componentes genômicos e frequentemente estão associados a DNAs satélites (Mansoor *et al.*, 2003). Por outro lado, begomovírus encontrados no "Novo Mundo" apresentam dois componentes genômicos, denominados DNA-A e DNA-B. A associação de alguns begomovírus do Novo Mundo com alfassatélites foi demonstrada recentemente (Paprotka *et al.*, 2010; Romay *et al.*, 2010). Mais de 60 espécies de begomovírus já foram relatadas infectando o tomateiro (Fauquet *et al.*, 2008).

O primeiro relato de begomovírus associado à cultura do tomateiro no Brasil foi feito na década de 1970, e a espécie foi denominada *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) (Matyis *et al.*, 1975). Esse vírus não se estabeleceu nas áreas produtoras de

tomate, muito provavelmente devido ao fato de que o biótipo A de *B. tabaci*, o único existente naquela época no país, não coloniza eficientemente o tomateiro (Bellows *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1995). De fato, novos relatos de infecção natural do tomateiro pelo TGMV só foram feitos duas décadas depois no estado do Rio de Janeiro (Alfenas *et al.*, 1998).

O biótipo B de *B. tabaci* foi relatado pela primeira vez no Brasil no início da década de 1990 (Melo, 1992), e devido a suas características de maior adaptabilidade se disseminou rapidamente pelas regiões quentes e secas do país (Lourenção & Nagai, 1994). A partir de então, sintomas típicos de infecção por begomovírus em tomateiros foram relatados no Distrito Federal (Ribeiro *et al.*, 1994), Triângulo Mineiro (Rezende *et al.*, 1996; Zerbini, 1996), São Paulo (Faria *et al.*, 1997), Rio de Janeiro (Galvão *et al.*, 1998) e na região Nordeste, incluindo o estado da Bahia (Ribeiro *et al.*, 1996) e a região do Sub-Médio São Francisco, então a principal região produtora de tomate para processamento industrial no Brasil (Bezerra *et al.*, 1997). A explicação mais provável para o rápido surgimento e disseminação de begomovírus na cultura do tomateiro é a colonização de plantas silvestres e daninhas pelo biótipo B de *B. tabaci*, possibilitando que vírus nativos presentes nestas plantas tenham sido transferidos para o tomateiro.

A caracterização inicial das espécies de begomovírus associadas às epidemias em tomateiro nas regiões produtoras brasileiras revelou uma grande diversidade, com a descrição de novas espécies como o *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) (Fernandes *et al.*, 2006), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) (Ribeiro *et al.*, 2007) e *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) (Calegario *et al.*, 2007). Essas espécies, apesar de apresentarem características moleculares semelhantes, possuem propriedades biológicas distintas. A principal distinção consiste no grau de severidade dos sintomas induzidos em tomateiro e *N.benthamiana*, maior para o ToYSV, e menor para o ToRMV. A

diferença na severidade dos sintomas pode estar relacionada a uma maior adaptação do vírus ao hospedeiro. Essa maior adaptação pode ser consequência de interação mais eficiente entre fatores virais e do hospedeiro, levando a uma taxa maior de replicação na célula, movimentos célula-a-célula e a longa distância mais rápidos e eficientes, capacidade de invadir diferentes tecidos além do floema, no qual o vírus é inicialmente introduzido pelo inseto-vetor, e maior eficiência na transmissão pelo vetor (Tyler & Fields, 1996; Petty *et al.*, 2000).

Apesar de o ToYSV ter sido isolado de tomateiro, suas características moleculares e relações filogenéticas são mais próximas às de begomovírus isolados de *Sida* sp., como o *Sida mottle virus* (SiMoV), *Sida yellow mosaic virus* (SiYMV) e *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV) (Fernandes *et al.*, 1998; Jovel *et al.*, 2004; Andrade *et al.*, 2006a). Essa relação é especialmente evidente ao se compararem as sequências de aminoácidos das proteínas responsáveis pelo movimento viral na planta, NSP ("nuclear shuttle protein") e MP ("movement protein"), do ToYSV e do SiMoV: a identidade é superior a 90%. Além do seu papel direto no movimento viral, as proteínas MP e NSP estão envolvidas na adaptação de begomovírus ao hospedeiro e na indução de sintomas (Petty *et al.*, 1995; Schaffer *et al.*, 1995; Petty *et al.*, 2000).

Alves-Junior *et al.* (2009) investigou o papel de vários fatores na adaptação diferencial dos begomovírus ToYSV e ToRMV em tomateiro e em *N. benthamiana*. Os resultados dos experimentos de acúmulo de DNA viral, de replicação em protoplastos de *N. benthamiana* e tropismo de tecido indicam que o ToYSV é melhor adaptado do que o ToRMV em ambos os hospedeiros. O ToYSV é mais eficiente nos eventos iniciais do ciclo de infecção viral, alcançando uma maior concentração viral e estabelecendo a infecção sistêmica mais cedo do que o ToRMV em ambos hospedeiros. Em *N. benthamiana*, o ToYSV infecta as células do mesofilo foliar enquanto o ToRMV

é restrito ao floema, mas durante a infecção mista o ToYSV é capaz de liberar o ToRMV dos tecidos vasculares.

Uma estratégia que pode ser utilizada para mapear com precisão os determinantes genéticos virais responsáveis pela maior adaptação de um vírus em relação a outro é a construção de genomas recombinantes (quimeras) entre dois vírus, testando as quimeras para ganho ou perda das características analisadas (Morra & Petty, 2000) (Petty & Qin, 2001). Estudos realizados utilizando quimeras entre o TGMV e o *Bean golden mosaic virus* (BGMV) em um hospedeiro comum, *N. benthamiana*, na qual o TGMV é mais adaptado (induz sintomas severos e infecta as células do mesofilo) e o BGMV menos adaptado (induz sintomas leves e permanece limitado às células do floema) identificaram regiões do genoma do TGMV que, uma vez inseridas no genoma do BGMV, tornam este capaz de invadir outros tecidos além do floema, ou seja, modificam seu tropismo de tecido (Morra & Petty, 2000). As regiões identificadas correspondem às regiões codificadoras das proteínas TrAP ("transactivation protein", ou AC2) e NSP e à região reguladora da transcrição do gene *nsp*, denominada BRi. Estudos semelhantes realizados com duas estirpes de TGMV que induzem sintomas distintos identificaram uma região compreendendo a região 3' do gene *MP* e a região intergênica menor do DNA-B (entre os genes *MP* e *NSP*) como responsável pela diferença nos sintomas induzidos pelas duas estirpes (Saunders *et al.*, 2001). A construção de quimeras entre dois DNAs-B associados ao *Mungbean yellow mosaic virus* (MYMV), que induzem sintomas distintos quando presentes com o mesmo DNA-A, indicou que a proteína NSP do MYMV é o principal determinante da indução diferencial de sintomas (Mahajan *et al.*, 2011).

Além dos trabalhos realizados com begomovírus bissegmentados, estudos realizados com begomovírus monossegmentados associados com betassatélites

identificaram a proteína betaC1 como determinante de sintomas, e demonstraram que o promotor do gene betaC1 é essencial na indução dos sintomas (Ding *et al.*, 2009).

As diferenças fenotípicas induzidas no hospedeiro natural (tomateiro) e experimental (*N. benthamiana*) pelo ToYSV e ToRMV oferecem um modelo interessante para o estudo de determinantes virais de patogenicidade. A análise dos determinantes virais responsáveis pelas diferenças sintomatológicas entre esses dois vírus contribuirá para um melhor entendimento das interações responsáveis pela adaptação de begomovírus a seus hospedeiros.

Assim, com o objetivo de identificar as regiões do genoma do ToYSV envolvidas na maior adaptação ao tomateiro e *N. benthamiana* desse vírus em relação ao ToRMV, foram construídos recombinantes entre os dois vírus. Os recombinantes foram avaliados quanto ao ganho ou perda de adaptação utilizando como critérios as diferenças na severidade de sintomas (ToYSV, mais severo; ToRMV, menos severo), no acúmulo de DNA viral (ToYSV, maior; ToRMV, menor) e no tropismo de tecido (ToYSV, infecta o floema e o mesófilo em *N. benthamiana*; ToRMV, restrito ao floema em *N. benthamiana*) (Alves-Junior *et al.*, 2009). Considerando que nos begomovírus a indução de sintomas é determinada principalmente pelos genes codificados a partir do DNA-B (Ingham *et al.*, 1995; Schaffer *et al.*, 1995; Unseld *et al.*, 2000), os recombinantes foram construídos com base na troca dos genes *MP* e *NSP* e da região BRi entre o ToYSV e o ToRMV, em diferentes combinações.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A família *Geminiviridae*

Os vírus pertencentes à família *Geminiviridae* possuem genoma composto por DNA de fita simples (ssDNA) circular encapsidado em um capsídeo icosaédrico geminado. A família é dividida em quatro gêneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus*, com base no tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros, organização genômica e relacionamento filogenético (Stanley *et al.*, 2005). O gênero *Mastrevirus* inclui os geminivírus com um componente genômico, transmitidos por diversas cigarrinhas (Homoptera: Cicadellidae) a plantas monocotiledôneas. A espécie-tipo é o *Maize streak virus* (MSV), um vírus economicamente importante para a cultura do milho. No gênero *Curtovirus* estão os geminivírus com um componente genômico, transmitidos por diversas cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) a plantas dicotiledôneas. O *Beet severe curly top virus* (BSCTV) é a espécie-tipo e mais importante economicamente. O gênero *Topocuvirus* possui uma única espécie, o *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV), com um componente genômico e transmitida pela cigarrinha *Micrutalis malleifera* (Homoptera: Auchenorrhyncha) a plantas dicotiledôneas. O gênero *Begomovirus* engloba espécies com um ou dois componentes genômicos, transmitidas pela mosca-branca *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) a plantas dicotiledôneas (Stanley *et al.*, 2005). A espécie-tipo é o *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) (Fauquet *et al.*, 2008).

Os begomovírus do "Velho Mundo" (Europa, Ásia e África) possuem em sua maioria um componente genômico (monossegmentados), e estão frequentemente associados a moléculas de ssDNA circular conhecidas como DNA-1 (alfassatélites) e DNA-beta (betassatélites) (Bridson, 2003; Bridson & Stanley, 2006). Os betassatélites

contêm uma ORF, betaC1, que codifica uma proteína responsável pela indução de sintomas e que atua como supressora do silenciamento gênico pós-transcricional (Cui *et al.*, 2004; Cui *et al.*, 2005; Briddon & Stanley, 2006). Os alfassatélites são semelhantes ao componente genômico denominado DNA-R dos nanovírus, os quais contêm uma ORF que codifica uma proteína associada à replicação (Rep), seguida de uma região rica em adenina e uma estrutura em forma de grampo que inclui a origem de replicação (Briddon & Stanley, 2006). Os alfassatélites podem replicar autonomamente, mas requerem um vírus auxiliar para infecção sistêmica da planta e transmissão pelo inseto vetor (Saunders & Stanley, 1999; Saunders *et al.*, 2000; Saunders *et al.*, 2002). Recentemente, alfassatélites foram identificados no Brasil e na Venezuela em associação aos begomovírus bissegmentados *Cleome leaf crumple virus* (CILCrV), *Euphorbia mosaic virus* (EuMV) e *Melon chlorotic mosaic virus* (MeCMV), sendo esses os primeiros relatos de DNAs satélites associados a begomovírus ocorrendo naturalmente no "Novo Mundo" (Américas) (Paprotka *et al.*, 2010; Romay *et al.*, 2010).

Os begomovírus do Novo Mundo possuem dois componentes genômicos (bissegmentados), denominados DNA-A e DNA-B, cada um com aproximadamente 2.600 nucleotídeos (Figura 1). Os dois componentes genômicos de uma mesma espécie viral não possuem identidade entre as suas sequências, exceto por uma região com aproximadamente 200 nucleotídeos denominada região comum (RC), que inclui a origem de replicação (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999).

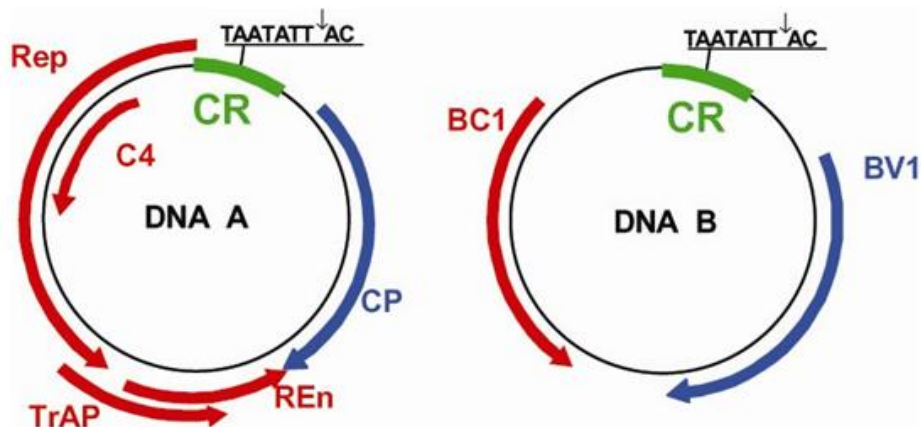


Figura 1. Representação esquemática do genoma do *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV), espécie-tipo do gênero *Begomovirus*. Os círculos representam o genoma viral, com dois componentes (DNA-A e DNA-B) de aproximadamente 2.600 nucleotídeos cada. Uma sequência de aproximadamente 200 nucleotídeos,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

O DNA-A dos begomovírus bissegmentados pode codificar de quatro a seis proteínas: uma proteína associada à replicação, Rep ("replication-associated protein"), iniciadora do mecanismo de replicação por círculo rolante, com propriedade de ligação a ácidos nucléicos, endonuclease e ATPase (Fontes *et al.*, 1992; Orozco *et al.*, 1997); uma proteína transativadora, Trap ("trans-activating protein"), fator transcricional dos genes *CP* e *NSP* e que também atua como supressora do silenciamento gênico (Sunter & Bisaro, 1992; Voinnet *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2005); a proteína Ren ("replication-enhancer protein"), fator acessório da replicação viral (Sunter *et al.*, 1990; Pedersen & Hanley-Bowdoin, 1994); e a proteína capsidial ("coat protein", CP), que além de formar o capsídeo viral é essencial para a transmissão do vírus pelo inseto vetor (Bridson *et al.*, 1990; Hofer *et al.*, 1997). O gene *AV2* ("pre-coat") está presente apenas nos

begomovírus do Velho Mundo, e atua no movimento do vírus na planta (Padidam *et al.*, 1996). O gene *AC4* codifica uma proteína supressora de silenciamento gênico (Vanitharani *et al.*, 2004). O DNA B codifica a proteína MP ("movement protein"), envolvida no movimento célula-a-célula do vírus por meio do aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas (Noueiry *et al.*, 1994), e a proteína NSP ("nuclear shuttle protein"), responsável pelo transporte do DNA através do envelope nuclear (Noueiry *et al.*, 1994; Sanderfoot *et al.*, 1996).

2.2. Replicação viral

No processo de infecção dos geminivírus, as partículas virais são inoculadas na planta pelo inseto vetor e o genoma viral (ssDNA) se desassocia de forma espontânea do capsídeo (Lazarowitz, 1992; Palmer & Rybicki, 1998). No interior da célula o ssDNA viral é transportado para o núcleo, onde é convertido em um intermediário de fita dupla (dsDNA) denominado forma replicativa (RF). A maneira como esta conversão ocorre não é conhecida, no entanto evidências indiretas, como a necessidade de desestabilização local do dsDNA para o iniciação da replicação por círculo rolante em procariotos por "strand-nicking enzymes", indicam que é realizada por fatores do hospedeiro. A RF serve como molde para a síntese dos novos componentes genômicos e também para a transcrição dos genes virais. O genoma viral é replicado via mecanismo de círculo rolante, semelhante ao utilizado pelos bacteriófagos Φ X174 e M13, utilizando a RF como molde (Stenger *et al.*, 1991; Stanley, 1995).

A origem de replicação (*ori*) está localizada na região intergênica comum entre os dois componentes genômicos. A sequência da *ori* é conservada entre componentes de um mesmo vírus, porém variável entre espécies, com exceção de uma região de aproximadamente 30 nucleotídeos conservada entre todas as espécies (Davies *et al.*,

1987; Lazarowitz, 1992). Nesta região se localiza uma sequência repetida e invertida composta predominantemente por guanina e citosina, formando uma estrutura conservada em forma de grampo ("structurally-conserved element", SCE), com uma sequência invariável (5'-TAATATTAC-3') encontrada em praticamente todos geminivírus, que constitui o domínio funcional da origem de replicação (Heyraud-Nitschke *et al.*, 1995; Orozco & Hanley-Bowdoin, 1998). É nesse nonanucleotídeo que ocorre a clivagem (TAATATT//AC) que inicia o processo de replicação por círculo rolante (Fontes *et al.*, 1994; Laufs *et al.*, 1995). A clivagem é realizada pela proteína Rep, que atua como endonuclease sítio-específica com requerimento de estrutura e sequência (Laufs *et al.*, 1995; Orozco & Hanley-Bowdoin, 1998). Na região comum encontram-se as sequências específicas para ligação da proteína Rep (Fontes *et al.*, 1992; Fontes *et al.*, 1994) e regiões promotoras da RNA polimerase tipo II de plantas, responsável pela transcrição dos genes virais (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999).

O sítio de ligação de Rep ao DNA viral está localizado entre a caixa TATA do gene *REP* e a SCE (Orozco & Hanley-Bowdoin, 1998), sendo constituído por duas sequências em repetição direta e pelo menos uma repetição invertida denominadas "iterons" (Arguello-Astorga *et al.*, 1994). A ligação de Rep aos iterons é essencial para o início da replicação. Após a ligação de Rep ao DNA viral e estabilização do complexo formado por Rep, Ren e fatores do hospedeiro, a proteína Rep cliva o nonanucleotídeo localizado na SCE, dando início à replicação por círculo rolante (Gutierrez, 1999).

O reconhecimento pela proteína Rep é considerado vírus-específico (Arguello-Astorga *et al.*, 1994; Harrison & Robinson, 1999; Ramos *et al.*, 2003), de modo que Rep só inicia a replicação de DNAs cognatos. O domínio funcional de Rep foi mapeado na sua região N-terminal, e inclui o domínio de ligação a DNA, conservado em todas as proteínas Rep (Jupin, 1995; Gladfelter *et al.*, 1997; Chatterji *et al.*, 1999). Uma vez que

o reconhecimento e ligação aos iterons por Rep é específico, foi proposto que depende da sequência de nucleotídeos dos iterons e dos aminoácidos de um motivo conservado na proteína Rep denominado domínio relacionado aos iterons ("iteron-related domain", IRD) (Arguello-Astorga & Ruiz-Medrano, 2001). Porém, a replicação do DNA-B do *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) pela Rep do *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) indica que a interação entre os aminoácidos do IRD e os iterons não é a única forma de reconhecimento da origem de replicação, uma vez que tanto os iterons quanto os IRDs são diferentes entre esses dois vírus (Andrade *et al.*, 2006b). Além disso, a ausência de iterons nos betassatélites é uma evidência adicional de que outros fatores afetam o reconhecimento da origem de replicação pela proteína Rep (Lin *et al.*, 2003; Stanley, 2004).

2.3. Movimento do vírus na planta

O movimento do vírus no interior do hospedeiro pode ser dividido em dois processos: movimento célula-a-célula via plasmodesmas, e movimento a longa distância, no qual o vírus atinge o sistema vascular e é transportado sistemicamente para toda a planta.

Os begomovírus replicam no núcleo da célula hospedeira, e portanto necessitam de uma etapa adicional de transporte do núcleo para o citoplasma, mediada pela proteína NSP (Palmer & Rybicki, 1998). Já a proteína MP associa-se à membrana celular e altera o limite de exclusão dos plasmodesmas, viabilizando o transporte do genoma viral (Noueiry *et al.*, 1994). Essas duas proteínas atuam de forma cooperativa para mediar o tráfego intra- e intercelular do DNA viral (Sanderfoot & Lazarowitz, 1995), permitindo ao vírus infectar sistemicamente o hospedeiro. A interação direta das proteínas MP e NSP *in vitro* foi demonstrada para o TGMV, utilizando-se o sistema duplo-híbrido de

levedura (Mariano *et al.*, 2004). A interação *in vivo* entre NSP e MP do *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) foi recentemente demonstrada também utilizando-se o sistema duplo-híbrido de levedura. Nestes estudos foi identificada uma GTPase citoplasmática designada NIG (NSP-interacting GTPase), que interage com NSP de begomovírus *in vitro* e *in vivo* e promove o transporte da proteína viral do núcleo para o citoplasma, onde ela é redirecionada para a superfície da célula para interagir com MP (Carvalho *et al.*, 2008).

Dois modelos foram propostos para explicar o movimento intracelular de begomovírus (Levy & Tzfira, 2010). No primeiro modelo, denominado "couple-skating", NSP transporta ssDNA ou dsDNA do núcleo para a periferia da célula e, no citoplasma, MP atua nos plasmodesmas para facilitar o movimento célula-a-célula do complexo NSP-DNA (Sanderfoot & Lazarowitz, 1995; Frischmuth *et al.*, 2004; Frischmuth *et al.*, 2007). No segundo modelo, denominado "relay-race", NSP inicialmente transporta o dsDNA do núcleo para o citoplasma. No citoplasma, o dsDNA se associa a MP, e o complexo MP-dsDNA se movimenta célula-a-célula através dos plasmodesmas (Noueiry *et al.*, 1994; Rojas *et al.*, 1998).

Para mastrevírus, curtovírus e begomovírus monossegmentados, a proteína CP é necessária para os movimentos célula-a-célula e a longa distância (Rojas *et al.*, 2001; Gafni & Epel, 2002). Além da CP, as proteínas V1 e C4 também são necessárias para o movimento de begomovírus monossegmentados. No caso de *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), a CP é responsável pelo transporte do DNA do núcleo para o citoplasma, funcionando como uma proteína análoga a NSP dos begomovírus bissegmentados, e o movimento célula-a-célula através dos plasmodesmas é mediado pelas proteínas C4 e/ou V1 (Rojas *et al.*, 2001; Rojas *et al.*, 2005b). Recentemente, foi demonstrado que a proteína C4 do curtovírus *Beet severe curly top virus* (BSCVT) é

capaz de se ligar de forma não específica a ssDNA e a dsDNA, é essencial para o desenvolvimento de sintomas, e quando expressa em plantas infectadas com mutantes deficientes para C4 pode complementar *in trans* o movimento sistêmico. Em conjunto, esses dados sugerem o envolvimento de C4 no movimento desse vírus (Teng *et al.*, 2010).

A proteína CP é dispensável para o estabelecimento da infecção sistêmica de begomovírus bissegmentados na maioria dos casos já estudados (Rojas *et al.*, 2005a). Tanto MP quanto NSP reconhecem o DNA viral de maneira específica com relação à forma e comprimento (Rojas *et al.*, 1998; Gilbertson *et al.*, 2003), o que elimina a necessidade da proteína capsial para o movimento a longa distância. Raras exceções, como o begomovírus bissegmentado *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), são capazes de infectar sistemicamente alguns hospedeiros na ausência do DNA-B cognato (Galvão *et al.*, 2003; Fontenelle *et al.*, 2007).

As infecções causadas por geminivírus normalmente se restringem às células associadas ao floema. Entretanto, alguns begomovírus são capazes de infectar, além dos feixes vasculares, os tecidos associados ao mesofilo foliar (Wege & Pohl, 2007). Estudos de interação vírus-vírus mostraram que o ToRMV, limitado ao floema em *N. benthamiana*, torna-se capaz de infectar as células do mesofilo durante infecção mista com o ToYSV, que infecta tecidos além do floema mesmo em infecção única (Alves-Junior *et al.*, 2009). Já os vírus PHYVV e PepGMV, ambos limitados ao floema em pimentão, permanecem limitados ao tecido vascular durante infecção mista (Renteria-Canett *et al.*, 2011).

O tropismo de tecido é dependente do hospedeiro e de fatores genéticos virais (Wege & Pohl, 2007). Trabalhos de complementação e recombinação entre os begomovírus *Bean golden mosaic virus* (BGMV), um vírus que infecta feijoeiro mas

não infecta tomateiro, e o *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), um vírus que infecta tomateiro e é restrito ao floema em feijoeiro, foram conduzidos com o intuito de identificar determinantes virais para o tropismo de tecido em plantas de feijoeiro e *N. benthamiana* (Morra & Petty, 2000). No hospedeiro comum *N. benthamiana*, o TGMV induz sintomas severos e infecta células do floema e do mesofilo. Já o BGMV não induz sintomas e permanece limitado às células do floema. Fragmentos do genoma viral correspondentes aos genes *TRAP*, *NSP* e *MP* e à região reguladora da transcrição do gene *NSP*, denominada BRi, foram permutados entre TGMV e BGMV. Regiões do genoma do TGMV inseridas no genoma do BGMV foram responsáveis pela mudança do tropismo de tecido deste vírus em *N. benthamiana*, tornando-o capaz de invadir células do mesofilo. Efeito contrário foi observado quando regiões do genoma do BGMV foram inseridas no genoma TGMV: os recombinantes correspondentes a estas mudanças tornaram-se incapazes de invadir o mesofilo (Morra & Petty, 2000).

O tropismo de tecido é dependente também de fatores do hospedeiro, pois embora o TGMV infecte o mesofilo de *N. benthamiana*, esse vírus é restrito ao floema em feijoeiro. Entretanto, os fatores do hospedeiro que determinam essa característica ainda não foram identificados (Morra & Petty, 2000). Estudos semelhantes realizados com duas estirpes de TGMV que induzem sintomas distintos identificaram uma região compreendendo a porção 3' do gene *MP* e a região intergênica do DNA-B (entre os genes *MP* e *NSP*) como responsável pela diferença nos sintomas induzidos pelas duas estirpes (Saunders *et al.*, 2001).

2.4. Interações geminivírus-hospedeiro

O sucesso da disseminação do vírus pela planta implica na infecção de novas células hospedeiras e constante replicação viral nessas células. Os begomovírus são altamente dependentes de fatores do hospedeiro para sua proliferação. O genoma viral não codifica uma DNA polimerase, e diversos fatores acessórios codificados pelo hospedeiro são requeridos para a replicação e o movimento sistêmico do vírus (Gutierrez, 2000). Como os begomovírus infectam células vegetais totalmente diferenciadas, é necessário ativar a transcrição de genes do hospedeiro envolvidos no processo de síntese de enzimas e outros fatores necessários para a replicação de DNA. Diversos trabalhos comprovaram que a proteína Rep dos begomovírus é responsável pela ativação da síntese de DNA em células totalmente diferenciadas. Essa ativação se dá pela indução do acúmulo de PCNA ("proliferating cell nuclear antigen"), uma proteína que está associada à síntese de DNA em plantas (Nagar *et al.*, 1995; Palmer *et al.*, 1998; Egelkroust *et al.*, 2001; Nagar *et al.*, 2002). Alguns membros da família *Geminiviridae* induzem não somente a expressão e acúmulo de PCNA, mas também interferem com a regulação do ciclo celular do hospedeiro (Ascencio-Ibanez *et al.*, 2008).

As plantas possuem diferentes mecanismos de defesa em resposta à infecção viral. A capacidade do vírus em suprimir os mecanismos de defesa que serão ativados pela sua presença torna-se imprescindível para o sucesso do processo de infecção. Trabalhos realizados por diferentes grupos de pesquisadores utilizando patossistemas distintos envolvendo begomovírus demonstraram que as proteínas Trap, NSP, AC4, betaC1 e V2 são capazes de modular mecanismos primários e específicos de defesa contra vírus (Voinnet *et al.*, 1999; Fontes *et al.*, 2004; Vanitharani *et al.*, 2004; Cui *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2010), provavelmente como uma forma de

maximizar a replicação viral em termos quantitativos (permitindo o acúmulo de maiores quantidades de partículas virais na célula infectada) e temporais (diminuindo o tempo necessário para o estabelecimento da infecção sistêmica).

Utilizando o sistema duplo-híbrido de levedura foi possível demonstrar que a proteína Trap do TGMV inativa uma proteína cinase denominada SNF1 ("sucrose non-fermenting 1"). Essa inativação leva a um aumento da suscetibilidade da planta ao vírus, por ser a cinase SNF1 um regulador chave de respostas a estresses celulares que reduzem a disponibilidade de ATP (Hao *et al.*, 2003). Trap também interage e inativa outra cinase, ADK ("adenosine kinase"), responsável pela síntese de 5'-AMP a partir de adenosina e ATP (Wang *et al.*, 2003). As duas interações provavelmente estão interligadas, pois a cinase SNF1 é ativada por 5'-AMP. O fato de Trap regular negativamente SNF1 e ADK sugere que as respostas metabólicas mediadas por SNF1 são um componente importante da resposta de defesa a vírus, e que os begomovírus desenvolveram uma estratégia de contra-ataque baseada na inativação dos dois componentes iniciais dessa via de defesa (SNF1 e ADK).

O silenciamento de RNA engloba uma série de processos nucleares e citoplasmáticos envolvidos na regulação da expressão gênica a nível pós-transcricional, por meio da degradação sequência-específica de mRNAs alvos (Brodersen *et al.*, 2008). O silenciamento de RNA constitui também um mecanismo eficiente de defesa de plantas contra vírus (Blevins *et al.*, 2006; Raja *et al.*, 2010). Proteínas virais com a capacidade de suprimir o silenciamento de RNA em diferentes pontos da via metabólica já foram identificadas em um grande número de vírus de plantas e mesmo em alguns vírus de animais (Voinnet *et al.*, 2000; Pfeffer *et al.*, 2002; Qu & Morris, 2002; Chapman *et al.*, 2004; Dunoyer *et al.*, 2004; Roth *et al.*, 2004; de Vries & Berkhout, 2008; Glick *et al.*, 2008). No caso dos begomovírus bissegmentados, as proteínas Trap e

AC4 já foram identificadas como supressoras de silenciamento (Voinnet *et al.*, 1999; van Wezel *et al.*, 2001; Vanitharani *et al.*, 2004; Trinks *et al.*, 2005). O papel diferenciado de Trap e AC4 na supressão de silenciamento pode conferir características distintas ao desenvolvimento da doença causada por diferentes espécies de begomovírus (Vanitharani *et al.*, 2004). Para outros begomovírus monossegmentados, como o *Tomato leaf curl virus* (ToLCV), a proteína V2 é determinante de patogenicidade e supressora de silenciamento (Sharma *et al.*, 2010). Embora o mecanismo de atuação dessas proteínas ainda não tenha sido elucidado, resultados recentes demonstram uma relação de causa e efeito entre a inativação da cinase ADK e a supressão de silenciamento, ambas mediadas por Trap (Wang *et al.*, 2005). Esses resultados sugerem que a atividade de ADK é necessária para o silenciamento, e que os begomovírus suprimem o silenciamento via inibição de ADK.

ADK reduz a quantidade de citocininas ativas por meio da fosforilação e conversão em formas de baixa atividade (Moffatt *et al.*, 2000). Balijs *et al.* (2010) investigaram se a inibição de ADK pela proteínas AC2/C2 afeta a expressão de genes que respondem a citocinina. A expressão da Trap do TGMV em folhas de *Nicotiana benthamiana* aumentou a atividade do promotor ARR5, o qual responde a citocinina. A aplicação de citocinina exógena levou a maior suscetibilidade à infecção viral. Estes resultados indicam que a alteração na expressão destes genes é importante para a infecção pelo TGMV e que a indução de sintomas pode estar relacionada, ao menos em parte, ao maior acúmulo dos produtos de genes que respondem a citocinina.

Além da ação de Trap na supressão do silenciamento e no aumento da expressão de genes que respondem a citocinina, esta proteína também atua como um ativador transcricional de genes requeridos tardiamente no ciclo de infecção viral (Sunter & Bisaro, 1991; Sunter & Bisaro, 1992). Recentemente foi demonstrado que a interação

do fator transcricional PEAPOD2 de *Arabidopsis thaliana* com Trap e com a região promotora do gene *CP* ativa a expressão deste gene (Lacatus & Sunter, 2009). Conjuntamente, estes resultados demonstram a multifuncionalidade desta proteína no ciclo de infecção viral.

Alguns estudos têm demonstrado que supressores virais do silenciamento de RNA podem afetar a regulação de genes do hospedeiro mediada por miRNAs (Chapman *et al.*, 2004). O maior acúmulo de dez miRNAs em plantas infectadas pelos begomovírus *African cassava mosaic virus* (ACMV), *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) e *Cotton leaf curl Multan virus*/Cotton leaf curl betasatellite (CLCuMV/CLCuMB) refletiu na diferença de severidade dos sintomas causados por esses vírus (Amin *et al.*, 2011).

Interações envolvendo as proteínas de movimento MP e NSP também já foram relacionadas. A interação entre as proteínas MP e NSP foi demonstrada por meio da relocalização de NSP por MP em protoplastos de *N. tabacum* e também pela interação física demonstrada no sistema duplo-híbrido de levedura (Sanderfoot & Lazarowitz, 1995; Mariano *et al.*, 2004).

McGarry *et al.* (2003) identificaram e caracterizaram funcionalmente uma acetiltransferase de *Arabidopsis* que interage diretamente com a NSP do *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV). Foi demonstrado que esta proteína, altamente conservada em plantas, é uma proteína nuclear que pode acetilar as histonas H2A e H3 *in vitro*, e que também acetila a proteína capsidial viral, mas não a proteína NSP.

A interação de proteínas cinase do tipo serina/treonina, denominadas LeNIK (*Lycopersicon esculentum* "NSP-interacting kinase") e GmNIK (*Glycine max* "NSP-interacting kinase") com a proteína NSP foi demonstrada utilizando-se o sistema duplo-híbrido de levedura (Mariano *et al.*, 2004). Esta interação foi associada ao modelo

guarda de resistência em plantas, ou seja, NSP seria um fator de virulência que se liga a NIK para que não ocorra a indução de uma resposta de resistência (Mariano *et al.*, 2004). A interação entre as proteínas NIK e NSP foi alvo de um estudo posterior com o objetivo de elucidar sua função no ciclo de infecção viral (Fontes *et al.*, 2004). Neste estudo demonstrou-se que as NIKs são proteínas com propriedade de receptores que se localizam em membranas, e que a interação com NSP inibe essa atividade. Dessa forma, a interação entre NSP e NIK seria uma forma de suprimir uma resposta de defesa da planta ao vírus. A proteína transmembrana NIK é um receptor autêntico, que uma vez fosforilado desencadeia uma cascata de sinalização que tem como intermediário a proteína ribossomal L10 (Rocha *et al.*, 2008), e como produto final a expressão de genes de defesa contra begomovírus (Santos *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2010). NSP também interage com outra serina/treonina cinase celular, NsAK ("NSP-associated kinase") (Florentino *et al.*, 2006). Entretanto, ao contrário de NIK, NsAK seria uma proteína que contribui com a infecção viral. De fato, a inibição da atividade de NsAK atenua o desenvolvimento dos sintomas.

Recentemente foram relatadas interações entre a proteína MP e as proteínas sinaptotagmina A (SYTA) e HSC70 ("heat shock cognate 70 Kda") de *Arabidopsis thaliana* (Krenz *et al.*, 2010; Lewis & Lazarowitz, 2010). A interação da MP do CaLCuV com SYTA de *A. thaliana* foi comprovada utilizando-se o sistema de recrutamento SOS de levedura (Lewis & Lazarowitz, 2010). SYTA regula o transporte célula-a-célula da MP do CaLCuV e é necessária para o movimento sistêmico e infecção de *A. thaliana*. Em ensaio de duplo-híbrido verificou-se a interação entre HSC70 de *A. thaliana* e a MP do begomovírus *Abutilon mosaic virus* (AbMV). Esta interação foi confirmada *in vivo* utilizando-se o ensaio de complementação de fluorescência bimolecular (BiFC) (Krenz *et al.*, 2010). Os resultados sugerem que a

interação HSC70 e MP é importante para o transporte viral e indução de sintomas pelo AbMV.

Os begomovírus são capazes de interferir com a via de ubiquitinação e com a sinalização pela via do jasmonato (Lozano-Duran *et al.*, 2011). A ubiquitinação de uma proteína ocorre em etapas e envolve três enzimas denominadas E1 (enzima ativadora da ubiquitina), E2 (enzima conjugadora) e E3 (ubiquitina ligase). A família mais abundante de ligases E3 compreende as CRLs ("cullin ring ligases"). Exemplos de CRL incluem os complexos SCFs (Skp1/Cullin1/F-box), reguladores fundamentais de muitos processos celulares como a resposta ao jasmonato, auxina, giberelina, etileno e ácido abscísico (Dreher & Callis, 2007). Em ensaio de duplo-híbrido em leveduras verificou-se a interação entre a proteína C2 do *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) e a proteína CSN5 de *A. thaliana*, um componente do complexo CSN (Lozano-Duran *et al.*, 2011). O complexo CSN atua na remoção do motivo RUB da subunidade CUL1 ("cullin 1") de CRLs, o qual é necessário para sua ativação (Gusmaroli *et al.*, 2004). A interação entre as proteínas C2 e CSN5 interfere com a atividade do complexo CSN e também com os processos regulados pelo complexo SCF, uma vez que a ativação de SCF é dependente da atividade do complexo CSN.

A análise do transcriptoma de plantas transgênicas expressando a proteína C2 do TYLCSV revelou que a via dependente do complexo SCF mais afetada nas plantas transgênicas é a via do jasmonato. Adicionalmente, o tratamento com jasmonato exógeno prejudica a infecção viral, sugerindo que a supressão da resposta ao jasmonato pode ser crucial para a infecção causada pelo TYLCSV (Lozano-Duran *et al.*, 2011). O tratamento de plantas de *A. thaliana* com jasmonato atenua a infecção pelo BCTV, e a infecção de plantas de *A. thaliana* com o CaLCuV induz a repressão da resposta ao jasmonato (Ascencio-Ibanez *et al.*, 2008). Esses resultados indicam que a supressão da

resposta ao jasmonato é requerida para o sucesso da infecção por geminivírus. Portanto, é provável que a proteína C2 altere a resposta ao jasmonato por meio de seu efeito sobre a via de ubiquitinação (complexo CSN/ CUL1/ SCF) (Lozano-Duran *et al.*, 2011).

A interação entre a proteína C2 do BSCTV e a proteína S-adenosilmetionina descarboxilase (SAMDC1) de *A.thaliana* foi demonstrada utilizando-se o sistema duplo-híbrido de evidura (Zhang *et al.*, 2011). A análise bioquímica revelou que C2 estabiliza SAMDC1 durante a infecção viral. A análise genética mostrou que a perda de função de SAMDC1 resulta em suscetibilidade reduzida à infecção por um mutante deficiente na proteína C2 do BSCTV, o que foi relacionado a um aumento na metilação do DNA viral. Um ensaio de expressão transiente demonstrou que ambas as proteínas (C2 do BSCTV e SAMDC1) possuem atividade supressora de silenciamento de RNA. Os resultados indicam que a proteína C2 pode interferir com a defesa antiviral mediada pelo silenciamento de RNA por meio da regulação positiva da estabilidade da proteína SAMDC1, que normalmente é ubiquitinada e degradada pelo proteassomo.

2.5. Begomovírus em tomateiro no Brasil

Durante as duas últimas décadas, os begomovírus têm emergido como um dos principais patógenos de plantas, particularmente em regiões tropicais e subtropicais, causando severas perdas econômicas (Polston & Anderson, 1997; Moriones & Navas-Castillo, 2000; Morales, 2006). No Brasil, a cultura do tomateiro (*Solanum lycopersicum*) tem sido uma das mais afetadas (Faria *et al.*, 2000; Ribeiro *et al.*, 2003; Zerbini *et al.*, 2005).

O primeiro relato de begomovírus em tomateiro no Brasil foi feito na década de 1970 (Costa *et al.*, 1975). O vírus foi caracterizado e denominado *Tomato golden mosaic virus* (TGMV). Além do TGMV, outros cinco vírus transmitidos por mosca-

branca foram identificados, porém sem causar danos de importância econômica (Matyis *et al.*, 1975). Isso provavelmente ocorria porque o biótipo A de *B. tabaci*, o único presente no país naquela época, coloniza o tomateiro com baixa eficiência (Bedford *et al.*, 1994).

No início da década de 1990, um complexo de begomovírus surgiu em tomateiro no Brasil, coincidindo com a introdução e disseminação do biótipo B de *B. tabaci* (Ambrozevicius *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2003). Ao contrário do biótipo A, o biótipo B possui maior gama de hospedeiros e é altamente adaptado para alimentação e oviposição em plantas de tomateiro, aumentando a probabilidade de transmissão de begomovírus para essa cultura (Schuster *et al.*, 1990). Desde então, oito espécies de begomovírus já foram descritas: *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV), *Tomato leaf distortion virus* (ToLDV), *Tomato mild mosaic virus* (ToMIMV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) e *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) (Faria & Maxwell, 1999; Fernandes *et al.*, 2006; Calegario *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008), e a existência de outras seis foi sugerida a partir da análise de sequências parciais (Ribeiro *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2008).

O ToRMV foi identificado em tomateiros no Triângulo Mineiro em 1996 (Rezende *et al.*, 1996; Zerbini *et al.*, 1996). Levantamento de campo realizado em junho de 2000 nos municípios de Araguari, Indianópolis e Uberlândia indicou a prevalência do ToRMV, detectado em 73% das 148 amostras coletadas e positivas para begomovírus (Fernandes, 2001). O vírus foi caracterizado biologicamente e molecularmente (Fernandes *et al.*, 2006).

O ToYYSV foi detectado em São João de Bicas, Minas Gerais, causando sintomas mais severos em tomateiro do que aqueles ocasionados pelo ToRMV (Ambrozevicius *et al.*, 2002). Plantas de tomateiro infectadas pelo ToYYSV apresentam mosaico amarelo intenso e subcrescimento acentuado, com redução de área foliar e enrolamento foliar. O vírus foi caracterizado biologicamente e molecularmente (Calegario *et al.*, 2007). A análise das sequências dos componentes genômicos do ToYYSV indicou um relacionamento filogenético mais próximo com begomovírus isolados de *Sida* sp., como o *Sida mottle virus* (SiMoV), *Sida yellow mosaic virus* (SiYMV) e *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV) (Andrade *et al.*, 2006a).

Levantamentos realizados para acessar a diversidade de begomovírus em tomateiro indicam que determinadas espécies tornaram-se prevalentes em diferentes regiões do país (Castillo-Urquiza *et al.*, 2007; Cotrim *et al.*, 2007; Castillo-Urquiza, 2008; Fernandes *et al.*, 2008). O sequenciamento direto de fragmentos de PCR de amostras de tomateiro coletadas na região central do estado de São Paulo nos anos de 2003 e 2004 revelou como espécie predominante o ToSRV, presente em 50% das amostras analisadas. O ToYVSV e o SiMoV também estavam presentes (Cotrim *et al.*, 2007). A mesma estratégia foi utilizada para identificar begomovírus em amostras de tomateiro coletadas entre 2002 e 2004 no Distrito Federal e nos estados da Bahia, Goiás, Minas Gerais, Pernambuco e São Paulo. Verificou-se a presença do ToSRV em 61% das amostras, além do ToYVSV, *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV) e duas possíveis novas espécies (Fernandes *et al.*, 2008).

Nos anos de 2005 e 2007 foi realizado um estudo sobre a diversidade de begomovírus em duas importantes regiões produtoras de tomate no sudeste do Brasil, Paty do Alferes (RJ) e Coimbra (MG). A análise de sequências do genoma completo do DNA-A revelou que em Paty do Alferes o ToYVSV era o vírus predominante,

encontrado em 56% das amostras analisadas, seguido pelo ToCmMV. Já em Coimbra o ToCmMV foi o único vírus encontrado infectando tomateiro (Castillo-Urquiza, 2008).

Acredita-se que a emergência dos begomovírus que infectam tomateiro no Brasil seja resultado da transferência horizontal de vírus nativos que infectam plantas silvestres ou invasoras pelo biótipo B da mosca-branca. Uma vez presentes no novo hospedeiro, esses vírus evoluíram rapidamente via recombinação e pseudo-recombinação, dando origem às espécies atualmente detectadas no campo. A predominância de algumas espécies pode ser devida a diferenças na adaptação ao tomateiro ou na eficiência de transmissão pelo vetor (Castillo-Urquiza *et al.*, 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Origem e manutenção dos isolados virais

Os isolados ToRMV-[MG-Ub1] e ToYSV-[MG-Bi2] foram obtidos a partir de tomateiros apresentando sintomas de infecção por begomovírus coletados na Zona Metalúrgica de MG (municípios de Bicas; MG-Bi2) e no Triângulo Mineiro (município de Uberlândia; MG-Ub1). Os clones infecciosos correspondentes ao DNA-A e DNA-B dos isolados ToRMV-[MG-Ub1] e ToYSV-[MG-Bi2] foram construídos por (Fernandes *et al.*, 2006) e (Calegario *et al.*, 2007), respectivamente. Os clones infecciosos são mantidos na forma de estoques de glicerol a -80°C.

3.2. Construção dos vírus recombinantes

Para a construção do recombinante ToY-ToR(MP/NSP), contendo os genes *MP* e *NSP* do ToRMV-B e as regiões promotoras dos genes *MP* e *NSP* do ToYSV (BLi e BRi, respectivamente), foram desenhados os oligonucleotídeos ToYSV-BLi e ToYSV-BRi3' (Tabela 1) para amplificar um fragmento correspondente à BLi, região comum e BRi do ToYSV-B. O fragmento amplificado foi clonado no plasmídeo pBluescript II KS+ (pKS+, Stratagene), gerando o clone pToY-BRi/BLi. A região genômica do ToRMV-B contendo os genes *MP* e *NSP* foi amplificada utilizando-se os oligonucleotídeos ToRMV-MP e ToRMV-NSP (Tabela 1) e inserida no clone pToY-BRi/BLi, gerando o clone pToY-ToR(MP/NSP). Por fim, o fragmento contendo BLi e a região comum do ToYSV foi amplificado utilizando-se os oligonucleotídeos ToYSV-BLi e ToYSV-RC (Tabela 1) e ligado diretamente ao clone pToY-ToR(MP/NSP), gerando o recombinante pToY1.2-ToR(MP/NSP).

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para a construção dos recombinantes. Os sítios de clivagem das enzimas de restrição utilizadas para a clonagem dos fragmentos gerados estão sublinhados.

Oligonucleotídeos	Sequência	Fragmento amplificado
ToRMV MP	5'- <u>CCCGGG</u> CTCCCTATTTTCAATAATGG-3'	MP e NSP
ToRMV NSP	5'- <u>GAATTC</u> ATCTACATAGTTAATTTG-3'	
ToRMV BLi	5'- <u>CTCGAG</u> CGCAGCGACAATGTTTG-3'	BLi, região
ToRMV BRi 3'	5'- <u>GAATTC</u> TCAAATTA ACTATGTAGATG-3'	comum e BRi
ToRMV BLi	5'- <u>CTCGAG</u> CGCAGCGACAATGTTTG-3'	BLi e região
ToRMV RC	5'- <u>GAGCTC</u> AATTA AAAATGGAAAGCG-3'	comum
ToRMV NSP	5'- <u>GAATTC</u> ATCTACATAGTTAATTTG-3'	MP, NSP, BLi e
ToRMV RC	5'- <u>GAGCTC</u> AATTA AAAATGGAAAGCG-3'	região comum
ToYSV MP	5'-ATT <u>CCCGGG</u> AAACATTCAGCTGCG-3'	MP e NSP
ToYSV NSP	5'- <u>GAATTC</u> GCGTTTATTAATATG-3'	
ToYSV BLi	5'- <u>ATCGAT</u> TAATATAATAAAAATAGGC-3'	BLi, região
ToYSV BRi 3'	5'- <u>GAATTC</u> AATAACGCGAAAAGACG-3'	comum e BRi
ToYSV BRi 5'	5'- <u>GATATC</u> TGGTTGCCGCTCG-3'	BRi
ToYSV BRi 3'	5'- <u>GAATTC</u> AATAACGCGAAAAGACG -3'	
ToYSV BLi	5'- <u>ATCGAT</u> TAATATAATAAAAATAGGC-3'	BLi e região
ToYSV RC	5'- <u>CCACGT</u> CAATGGAGGCAAAAATC-3'	comum

Para a construção do recombinante recíproco ToR-ToY(MP/NSP) foi realizado o mesmo procedimento descrito acima, gerando-se o clone pToR1.2-ToY(MP/NSP), o qual apresenta a região intergênica e as regiões promotoras do ToRMV (BRi e BLi), e as regiões codificadoras do ToYSV (genes *MP* e *NSP*).

Para a construção do recombinante ToR-ToY(BRi), contendo apenas a região BRi do ToYSV e o restante do genoma do ToRMV-B, foram utilizados os oligonucleotídeos ToRMV-NSP e ToRMV-RC (Tabela 1) para amplificação de um fragmento correspondente aos genes *MP* e *NSP* e a região BLi juntamente com a região comum do ToRMV-B. O fragmento amplificado foi inserido no plasmídeo pKS+, gerando o clone pToR-BLi/MP/NSP. Em seguida a região BRi do ToYSV foi amplificada utilizando-se os oligonucleotídeos ToYSV-BRi5' e ToYSV-BRi3' (Tabela 1) e inserida no clone pToR-BLi/MP/NSP, gerando o clone pToR-ToY(BRi). Por fim, o fragmento contendo BLi e a região comum do ToRMV foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos ToRMV-BLi e ToRMV-RC (Tabela 1) e inserido no clone pToR-ToY(BRi), gerando o clone pToR1.2-ToY(BRi).

Na Figura 2 são apresentadas as representações esquemáticas dos diferentes recombinantes gerados.

3.3. Inoculação dos componentes recombinantes

Os DNAs-B recombinantes, acompanhados dos DNAs-A cognatos (que apresentam a mesma região comum do DNA-B recombinante), foram inoculados via biobalística (Aragão *et al.*, 1996) em plantas de tomateiro cv. Santa Clara com dois pares de folhas definitivas, e de *Nicotiana benthamiana* com três pares de folhas definitivas, sempre utilizando-se 2 µg de cada componente genômico. As plantas

inoculadas foram mantidas em casa-de-vegetação durante toda a duração dos experimentos.

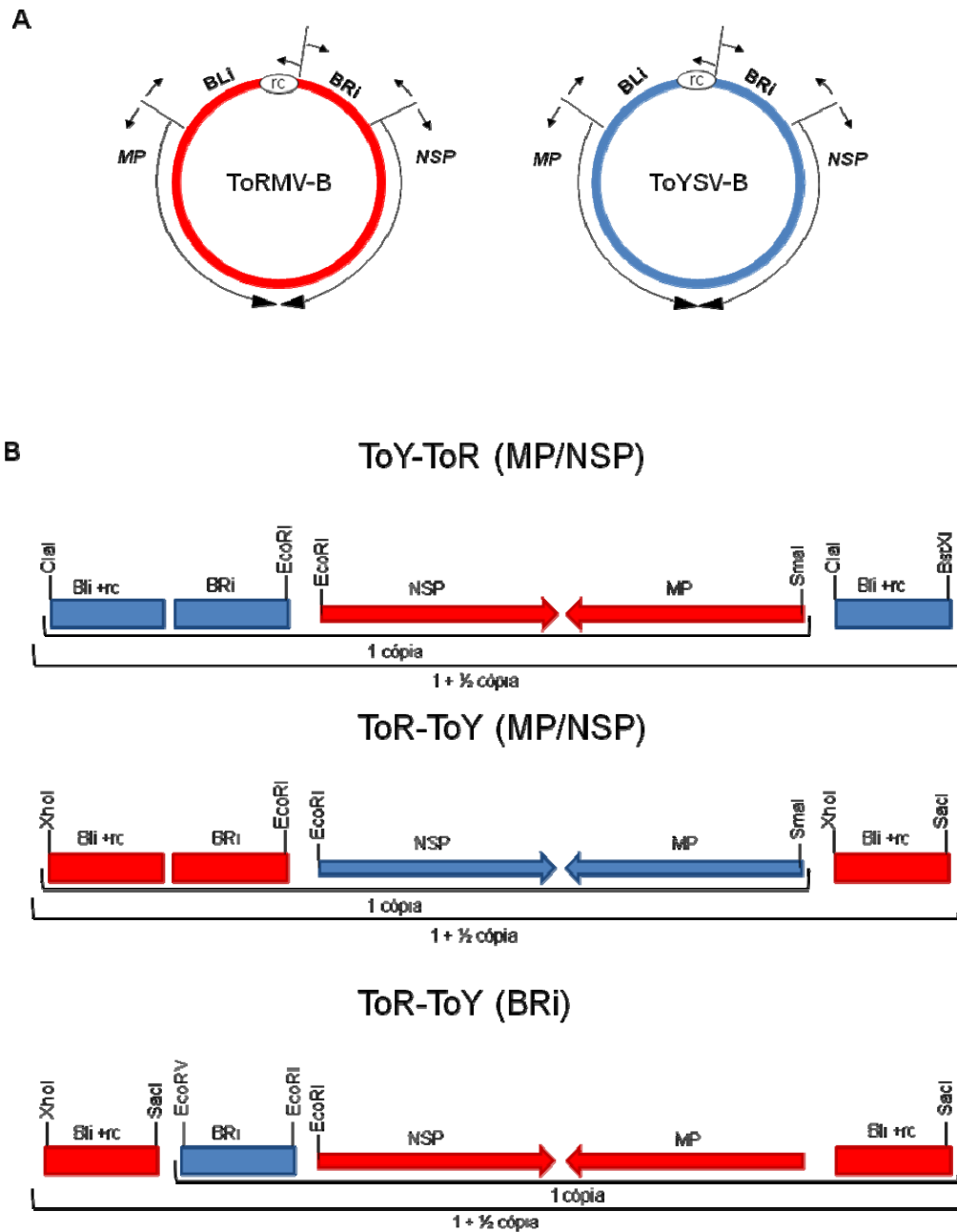


Figura 2. **A.** Organização genômica do componente B do ToRMV (vermelho) e do ToYSV (azul), indicando-se as regiões amplificadas para a construção dos recombinantes (BLi, BRi, RC e os genes *MP* e *NSP*). **B.** Representação esquemática dos diferentes recombinantes entre o ToRMV (vermelho) e o ToYSV (azul). No esquema também estão indicadas as enzimas de restrição utilizadas para construção dos recombinantes.

3.4. Extração de DNA total e confirmação da infecção

Aos 14 e 28 dias após a inoculação foi realizada a extração de DNA total (Dellaporta *et al.*, 1983) de folhas sistêmicas das plantas inoculadas. Para a confirmação da infecção viral, o DNA extraído foi utilizado como molde para reação de PCR utilizando-se oligonucleotídeos universais para begomovírus (PAL1c1978 e PAR1v496) (Rojas *et al.*, 1993).

3.5. Acúmulo de DNA viral nas plantas infectadas

O acúmulo de DNA viral foi determinado por PCR quantitativo em tempo real (qPCR). As reações foram preparadas para um volume final de 10 µl utilizando-se o "Fast SYBR Green master mix" (Applied Biosystems) conforme as instruções do fabricante, e foram analisadas em um termociclador CFX96 (Bio-Rad). Oligonucleotídeos específicos para os vírus foram desenhados utilizando-se o software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems), e sua especificidade foi testada em reações de PCR convencional utilizando-se os clones contendo o DNA-A completo de cada vírus (10^6 cópias por reação). Para a quantificação do DNA viral, curvas padrão foram preparadas utilizando-se diluições seriadas desses mesmos clones (10^0 a 10^6 cópias do genoma viral por reação). As curvas padrão foram obtidas por análise de regressão dos valores de Ct de cada uma das três repetições de uma dada diluição em relação ao log da quantidade de DNA em cada diluição. Para a quantificação absoluta do número de cópias do genoma viral nos diferentes tratamentos, 100 ng de DNA total de plantas infectadas foram usados em reações de qPCR contendo os oligonucleotídeos específicos de cada vírus. Cada amostra foi analisada em triplicata.

3.6. Hibridização *in situ*

Folhas de *N. benthamiana* infectadas sistemicamente com o ToYSV, o ToRMV e os diferentes recombinantes para o DNA-B foram coletadas aos 28 dias após a inoculação e fixadas em paraformaldeído 4%. Após lavagem dos fragmentos com etanol 30%, estes foram desidratados em série alcoólica crescente (30-100%), infiltrados com xilol:etanol (1:3, 1:1, 3:1) por 24 horas (trocas realizadas pela manhã, ao meio dia e no final da tarde), e em xilol puro por mais 12 horas. Após a segunda incubação em xilol puro foi adicionada parafina de inclusão (1/3 do volume de xilol do frasco) e o material foi colocado em estufa a 65°C por 12-16 horas. A proporção parafina:xilol foi aumentada durante 24 horas com três trocas durante esse período, e em seguida foram realizadas mais duas substituições com parafina pura. O tecido foi então montado em um bloco de parafina e seções de 10 µm foram obtidas em micrótomo de mesa (Spencer 820, American Optical) e fixadas em lâminas tratadas com silano. Foram obtidas seções a partir de duas plantas infectadas.

A hibridização foi realizada conforme descrito anteriormente (Alves-Junior *et al.*, 2009). A sonda para o ToYSV, correspondente aos nucleotídeos 1423-2148 do DNA-A, foi obtida após a digestão com *Pst* I do clone pToYSV-A 1.2 (Andrade *et al.*, 2006a). A sonda para o ToRMV, corresponde aos nucleotídeos 1711-2147 do DNA-A, foi obtida após a digestão com *Cla* I e *EcoR* I do clone Ub1-49 (Fernandes *et al.*, 2006). Ambas as sondas, para o ToRMV e para o ToYSV, foram marcadas com tetrametil-rodamina-5-dUTP (Roche Applied Sciences).

4. RESULTADOS

4.1. Efeito dos genes *MP* e *NSP* do ToRMV na severidade de sintomas, no acúmulo de DNA viral em tomateiro e *N. benthamiana*, e no tropismo de tecido em *N. benthamiana*

Em tomateiro, o recombinante ToY-ToR(MP/NSP) induziu sintomas aos 14 dpi, mais tardiamente em relação ao ToYSV, que induz sintomas aos 12 dpi, porém mais precocemente em relação ao ToRMV, que induz sintomas aos 16 dpi (Tabela 2). Os sintomas induzidos pelo recombinante, que incluem manchas cloróticas e leve distorção foliar (Figura 3C), são mais atenuados em relação aos induzidos pelo ToYSV (Figura 3A), porém mais severos do que os induzidos pelo ToRMV (Figura 3B).

Tabela 2. Período latente e infectividade dos vírus recombinantes e dos vírus parentais (ToRMV e ToYSV) em plantas de tomateiro e *N. benthamiana*.

Tratamento	Tomateiro		<i>N.benthamiana</i>	
	Período latente (dias) ^a	Infectadas/Inoculadas ^b	Período latente (dias)	Infectadas/Inoculadas
ToRMV (A+ B)	16	3/20	14	8/10
ToYSV-A+ ToY-ToR(MP/NSP)	14	5/20	10	12/12
ToRMV-A+ ToR-ToY(MP/NSP)	16	1/20	12	7/12
ToRMV-A+ ToR-ToY(BRi)	16	2/20	12	6/12
ToYSV (A+B)	12	8/10	7	8/10

^a Número de dias entre a inoculação e o aparecimento de sintomas.

^b Número de plantas infectadas/número de plantas inoculadas, confirmadas por PCR com oligonucleotídeos universais para begomovírus.

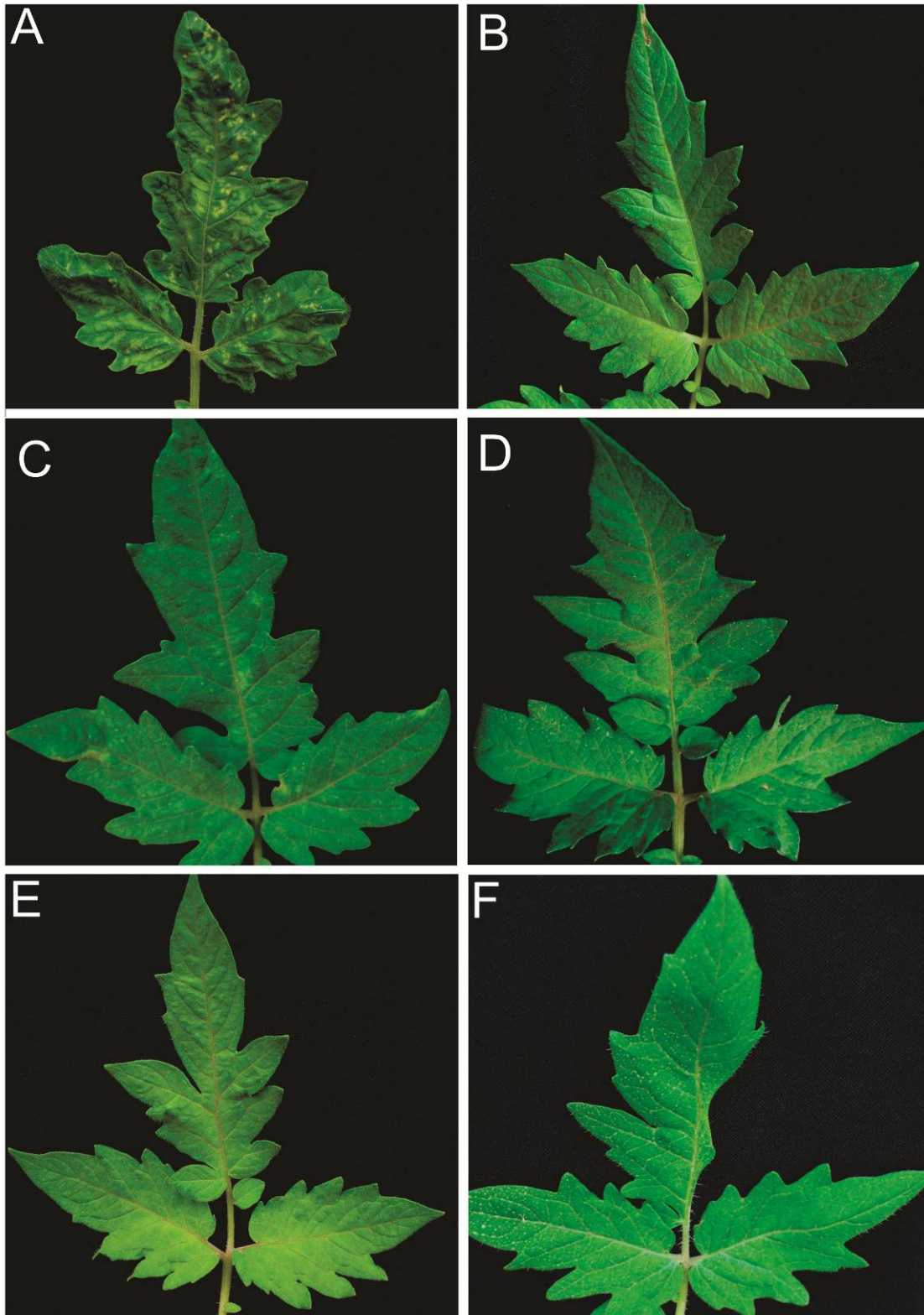


Figura 3. Sintomas induzidos pelo ToYSV, ToRMV e pelos vírus recombinantes em tomateiro aos 21 dpi. **A.** Tomateiro infectado pelo ToYSV, apresentando mosaico, manchas amarelas e deformação foliar severos. **B.** Tomateiro infectado pelo ToRMV, apresentando mosaico atenuado. **C.** Tomateiro infectado pelo recombinante ToY-ToR(MP/NSP). **D.** Tomateiro infectado pelo recombinante ToR-ToY(MP/NSP). **E.** Tomateiro infectado pelo recombinante ToR-ToY(BRi). **F.** Tomateiro sadio.

Para verificar se a menor severidade dos sintomas induzidos pelo recombinante ToY-ToR(MP/NSP) pode estar correlacionada com menor acúmulo de DNA viral, DNA total foi extraído de plantas infectadas sistemicamente aos 14 e 28 dpi e utilizado como molde para análise do acúmulo viral por qPCR. Os resultados demonstraram que o acúmulo de DNA viral do recombinante ToY-ToR(MP/NSP) é inferior ao acúmulo do ToYHSV e superior ao do ToRMV aos 14 dpi, e inferior a ambos os vírus aos 28 dpi (Figura 4A). O recombinante apresentou um comportamento semelhante ao ToYHSV, caracterizado pela redução dos níveis de DNA viral de 14 para 28 dpi.

Quando inoculado em *N. benthamiana*, o recombinante ToY-ToR(MP/NSP) novamente induziu sintomas menos severos em relação aos induzidos pelo ToYHSV (Figura 5A) e mais severos em relação aos induzidos pelo ToRMV (Figura 5B). Os sintomas surgiram aos 10 dpi, comparado a 7 dpi para o ToYHSV e 14 dpi para o ToRMV (Tabela 2), e foram caracterizados por manchas cloróticas e deformação foliar (Figura 5C). O acúmulo de DNA do ToY-ToR(MP/NSP) foi analisado aos 14 e 28 dpi, sendo menor em comparação ao acúmulo do ToYHSV e maior em relação ao ToRMV, embora nesse último caso sem diferença estatística (Figura 4B).

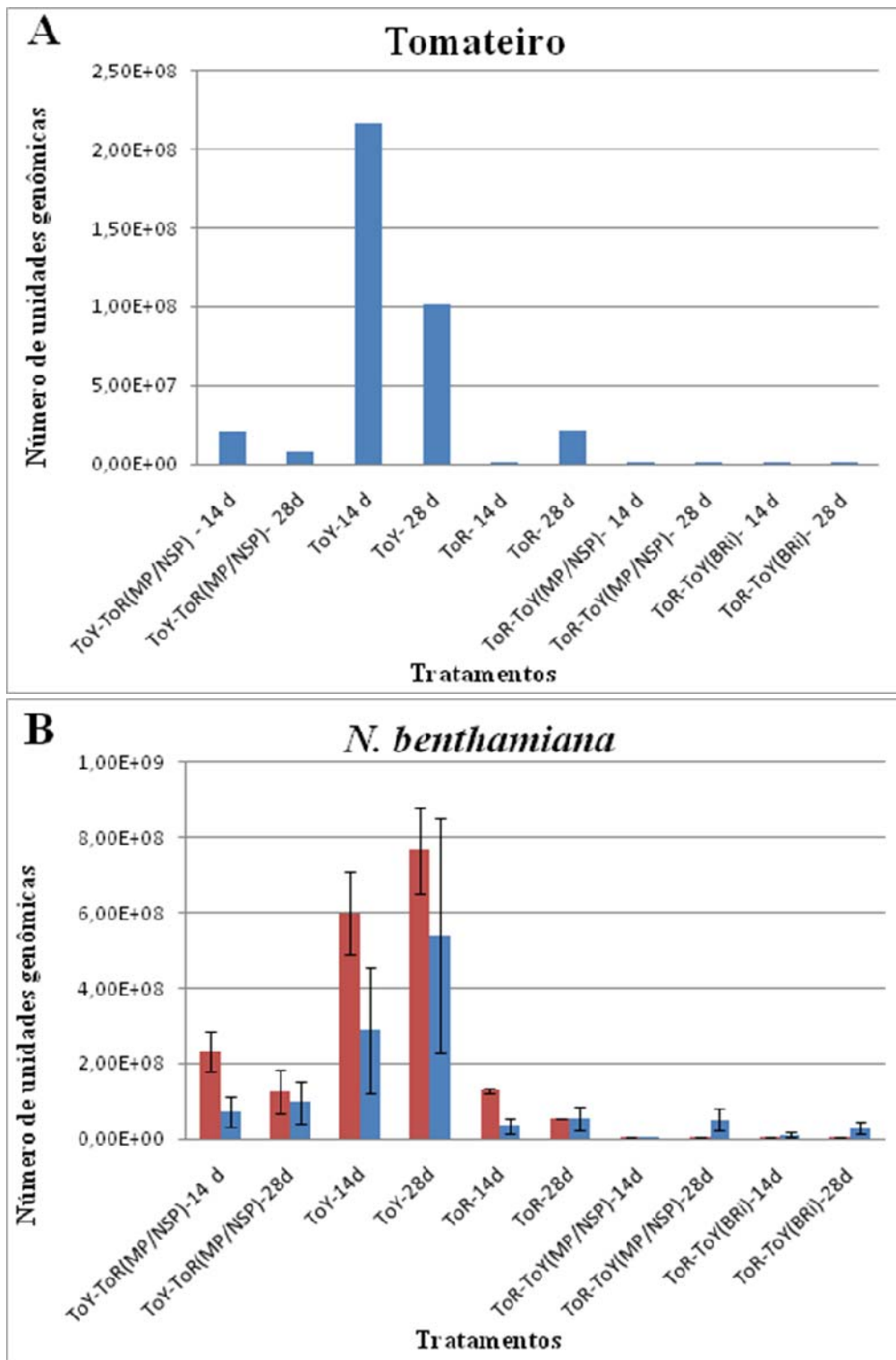


Figura 4. Acúmulo de DNA viral em plantas de tomateiro (A) e *N.benthamiana* (B) inoculadas com o ToYSV, ToRMV e com os vírus recombinantes. O DNA total foi extraído de folhas infectadas sistemicamente aos 14 e 28 dpi e o acúmulo de DNA viral foi analisado por meio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) utilizando-se oligonucleotídeos específicos para cada vírus. As barras azuis e vermelhas referem-se a dois experimentos independentes. Não foi possível realizar análise estatística do experimento em tomateiro pois o número de plantas infectadas para alguns tratamentos foi inferior a três.

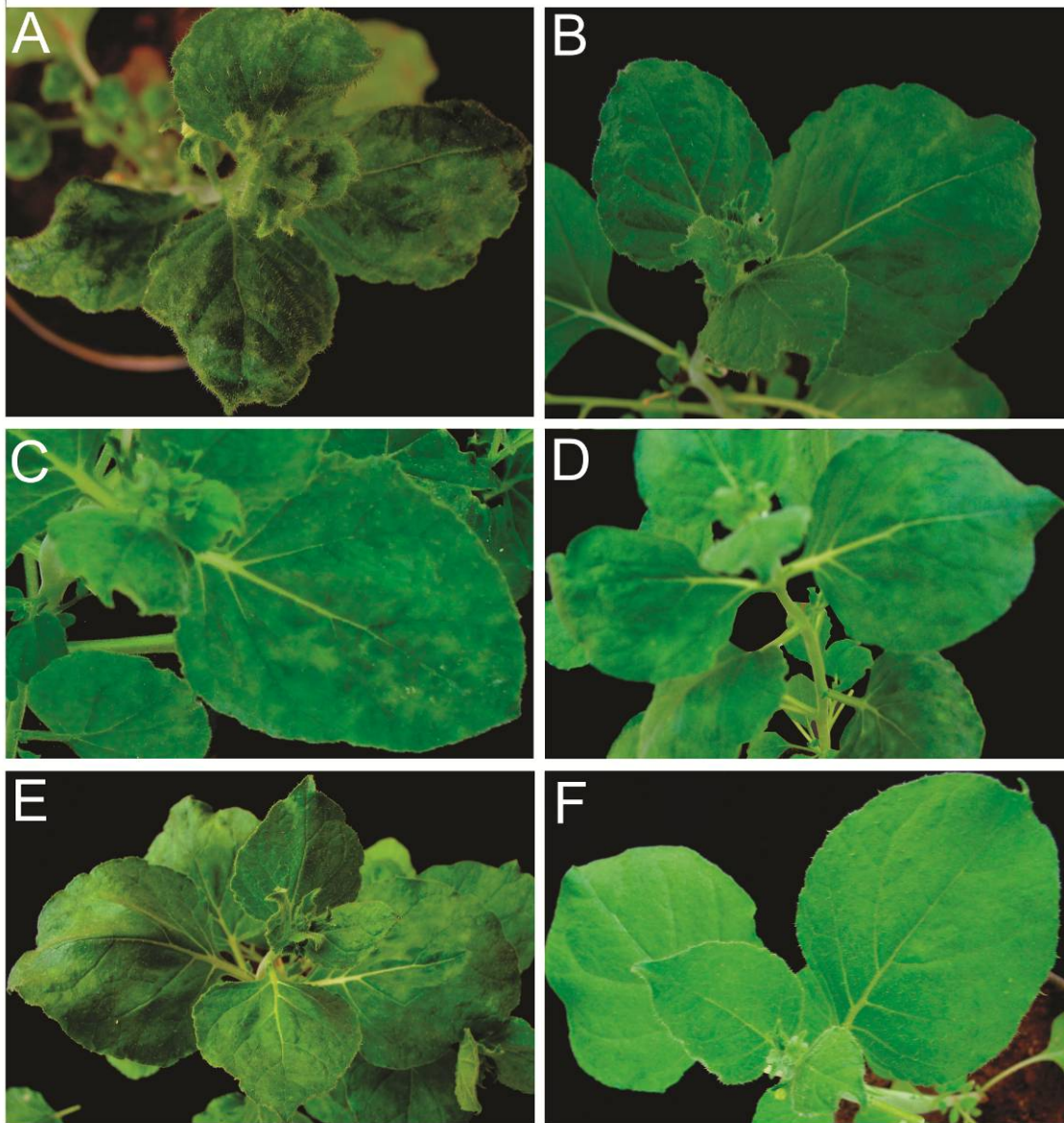


Figura 5. Sintomas induzidos pelo ToYSV, ToRMV e pelos vírus recombinantes em *N. benthamiana* aos 21 dpi. **A.** *N. benthamiana* infectada pelo ToYSV, apresentando mosaico e deformação foliar severos. **B.** *N. benthamiana* infectada pelo ToRMV, apresentando mosaico atenuado. **C.** *N. benthamiana* infectada pelo recombinante ToY-ToR(MP/NSP). **D.** *N. benthamiana* infectada pelo recombinante ToR-ToY(MP/NSP). **E.** *N. benthamiana* infectada pelo recombinante ToR-ToY(BRi). **F.** *N. benthamiana* sadia.

Ensaio de hibridização *in situ* utilizando seções semifinas de folhas de *N. benthamiana* infectadas pelo ToY-ToR(MP/NSP) foram realizados para avaliar o tropismo de tecido do vírus recombinante em relação aos dois vírus parentais. Em *N. benthamiana*, o ToYSV é capaz de infectar as células do tecido vascular (Tabela 3; Figuras 6C e D) e do mesofilo foliar (Tabela 3; Figuras 7C e D), enquanto o ToRMV é detectado apenas nas células do tecido vascular (Tabela 3; Figuras 6E e F), mas não nas células do mesofilo (Tabela 3; Figuras 7E e F). Esses resultados estão em total concordância com os obtidos por (Alves-Junior *et al.*, 2009).

O recombinante ToY-ToR(MP/NSP), semelhantemente ao ToYSV e ao contrário do ToRMV, é capaz de invadir células do mesofilo (Tabela 3; Figuras 9A e B), além do tecido vascular (Tabela 3; Figuras 8A e B). Assim, a troca das proteínas MP e NSP do ToYSV pelas do ToRMV não alterou o tropismo de tecido do ToYSV. Entretanto, uma menor porcentagem de núcleos de células do mesofilo foram marcados na planta infectada pelo recombinante em comparação à planta infectada pelo ToYSV (Tabela 3).

Em conjunto, estes resultados indicam que as proteínas MP e NSP do ToRMV, quando introduzidas no *background* genético do ToYSV, reduzem sua adaptação ao tomateiro e a *N. benthamiana*.

Tabela 3. Tropismo de tecido do ToYSV, ToRMV e vírus recombinantes em *N. benthamiana*.

Tratamento	Sonda	Mesofilo	Feixe vascular
água	ToYSV	8/205 (4) ^a	14/290 (5)
ToYSV	ToYSV	364/476 (76)	301/449 (67)
ToRMV	ToRMV	19/213 (9)	102/167 (61)
ToY-ToR(MP/NSP)	ToYSV	284/471 (60)	257/471 (55)
ToR-ToY(MP/NSP)	ToRMV	7/204 (3)	69/150 (46)
ToR-ToY(BRi)	ToRMV	210/470 (45)	318/561 (57)

^a Número de núcleos marcados/total de núcleos contados (porcentagem de núcleos marcados). O número total de núcleos foi contado com base na marcação com DAPI.

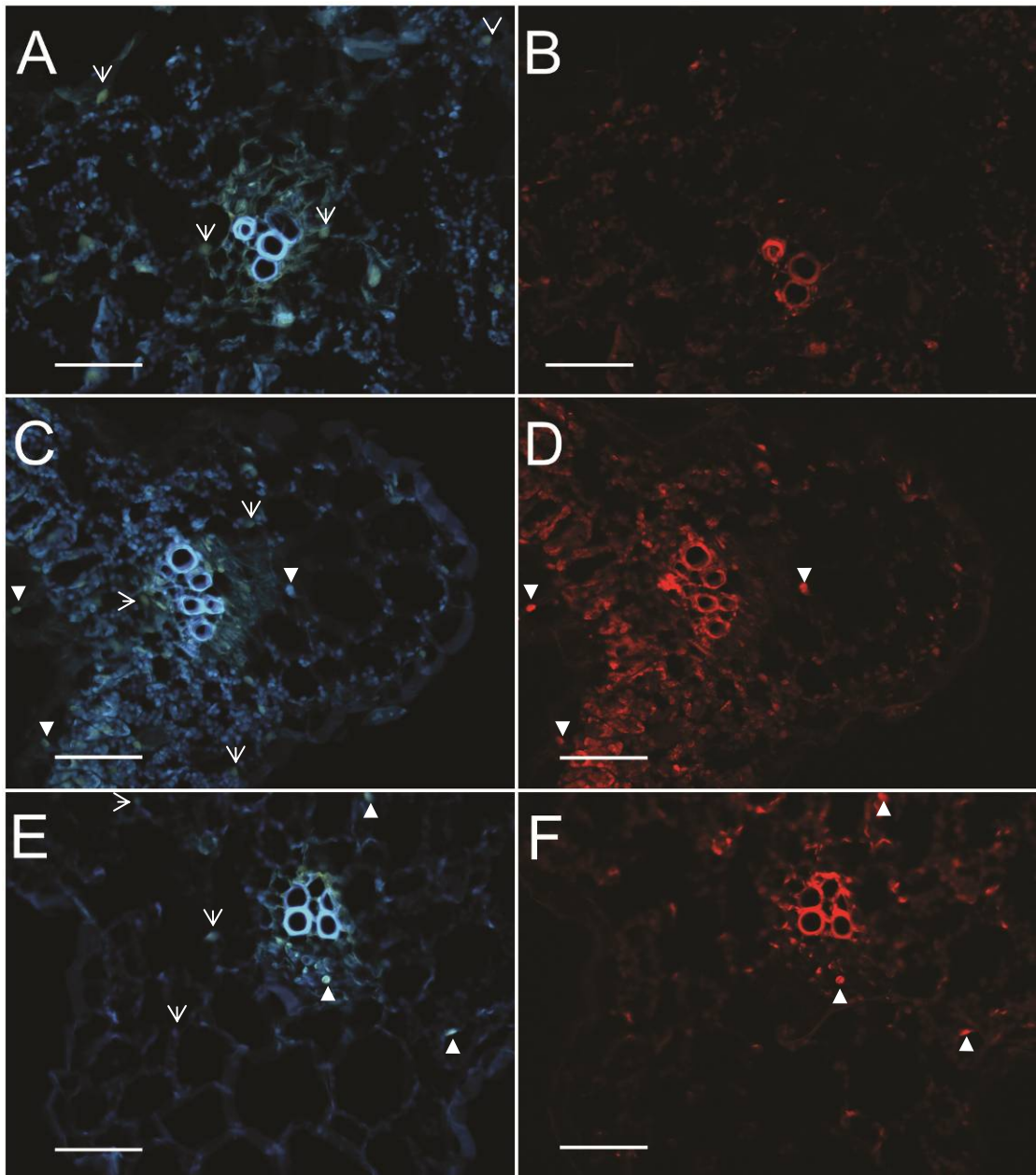


Figura 6. Localização do ToYSV e ToRMV em células do tecido vascular em *N. benthamiana* por meio de hibridização *in situ* aos 28 dpi. Secções transversais obtidas de folhas infectadas sistemicamente foram hibridizadas com sondas específicas para cada vírus e observadas em microscópio de fluorescência. **A, C, E.** DAPI. **B, D, F.** Rodamina. **A, B.** Secção obtida de *N. benthamiana* sadia e hibridizada com sonda específica para o ToYSV. **C, D.** Infecção pelo ToYSV. **E, F.** Infecção pelo ToRMV. Os triângulos indicam exemplos de núcleos infectados, e as setas indicam exemplos de núcleos saudios.

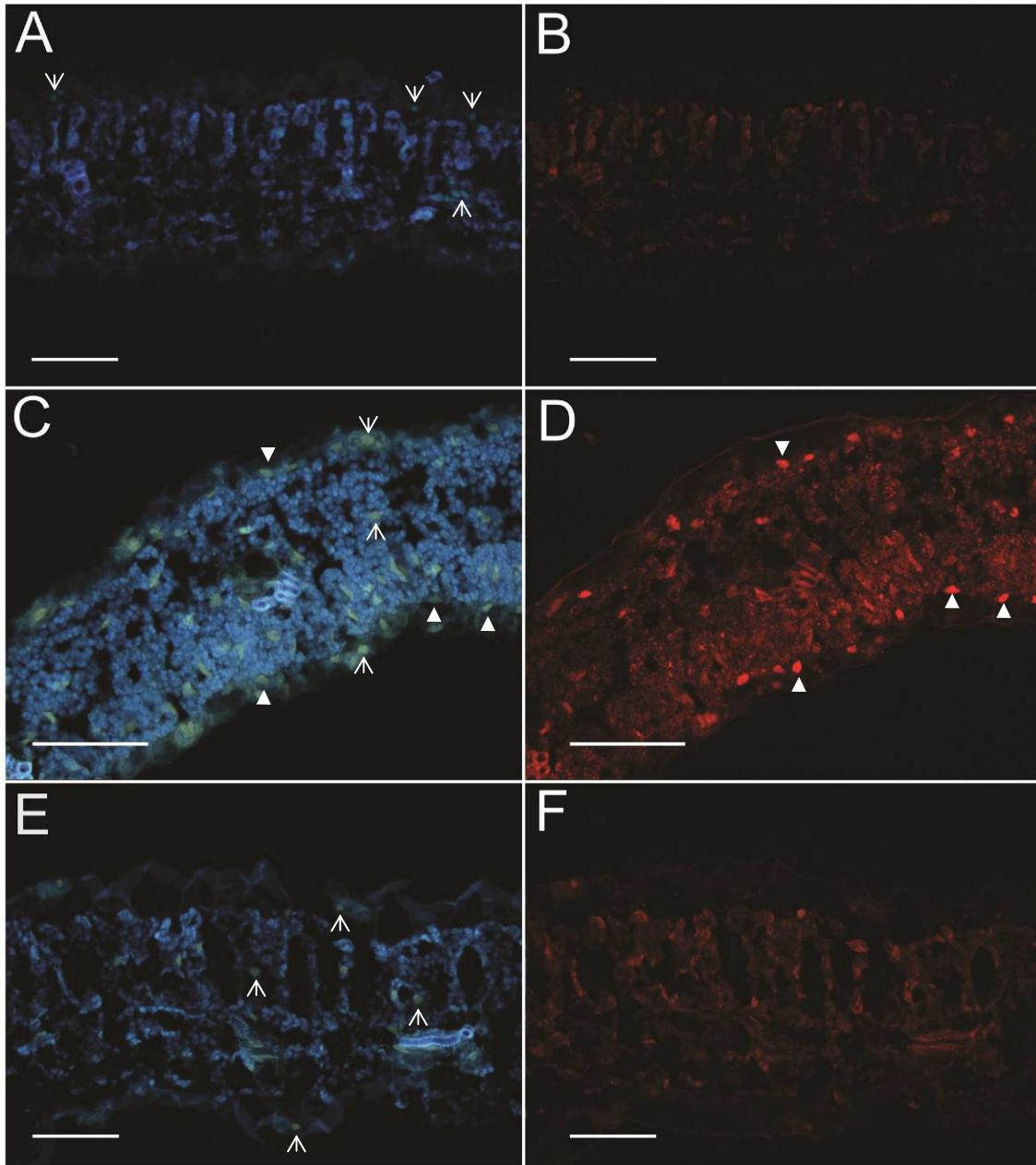


Figura 7. Localização do ToYSV e ToRMV em células do mesofilo em *N. benthamiana* por meio de hibridização *in situ* aos 28 dpi. Secções transversais obtidas de folhas infectadas sistemicamente foram hibridizadas com sondas específicas para cada vírus e observadas em microscópio de fluorescência. **A, C, E.** DAPI. **B, D, F.** Rodamina. **A, B.** Secção obtida de *N. benthamiana* sadia e hibridizada com sonda específica para o ToYSV. **C, D.** Infecção pelo ToYSV. **E, F.** Infecção pelo ToRMV. Os triângulos indicam exemplos de núcleos infectados, e as setas indicam exemplos de núcleos saudios.

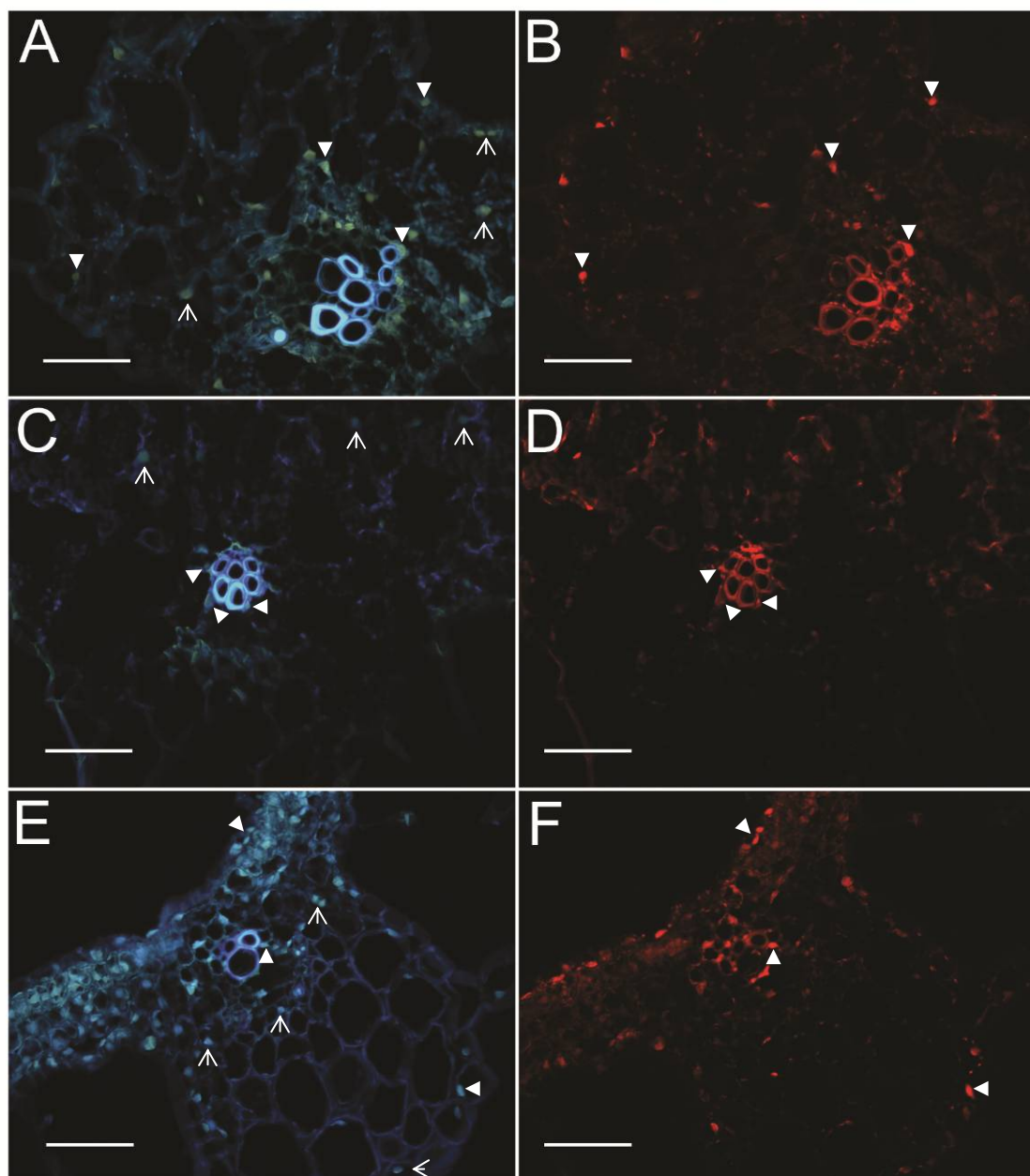


Figura 8. Localização dos vírus recombinantes em células do tecido vascular em *N. benthamiana* por meio de hibridização *in situ* aos 28 dpi. Secções transversais obtidas de folhas infectadas sistemicamente foram hibridizadas com sondas específicas para cada vírus e observadas em microscópio de fluorescência. **A, C, E.** DAPI. **B, D, F.** Rodamina. **A, B.** Infecção pelo recombinante ToY-ToR(MP/NSP). **C, D.** Infecção pelo recombinante ToR-ToY (MP/NSP). **E, F.** Infecção pelo recombinante ToR-ToY(BRi). Os triângulos indicam exemplos de núcleos infectados, e as setas indicam exemplos de núcleos saudáveis.

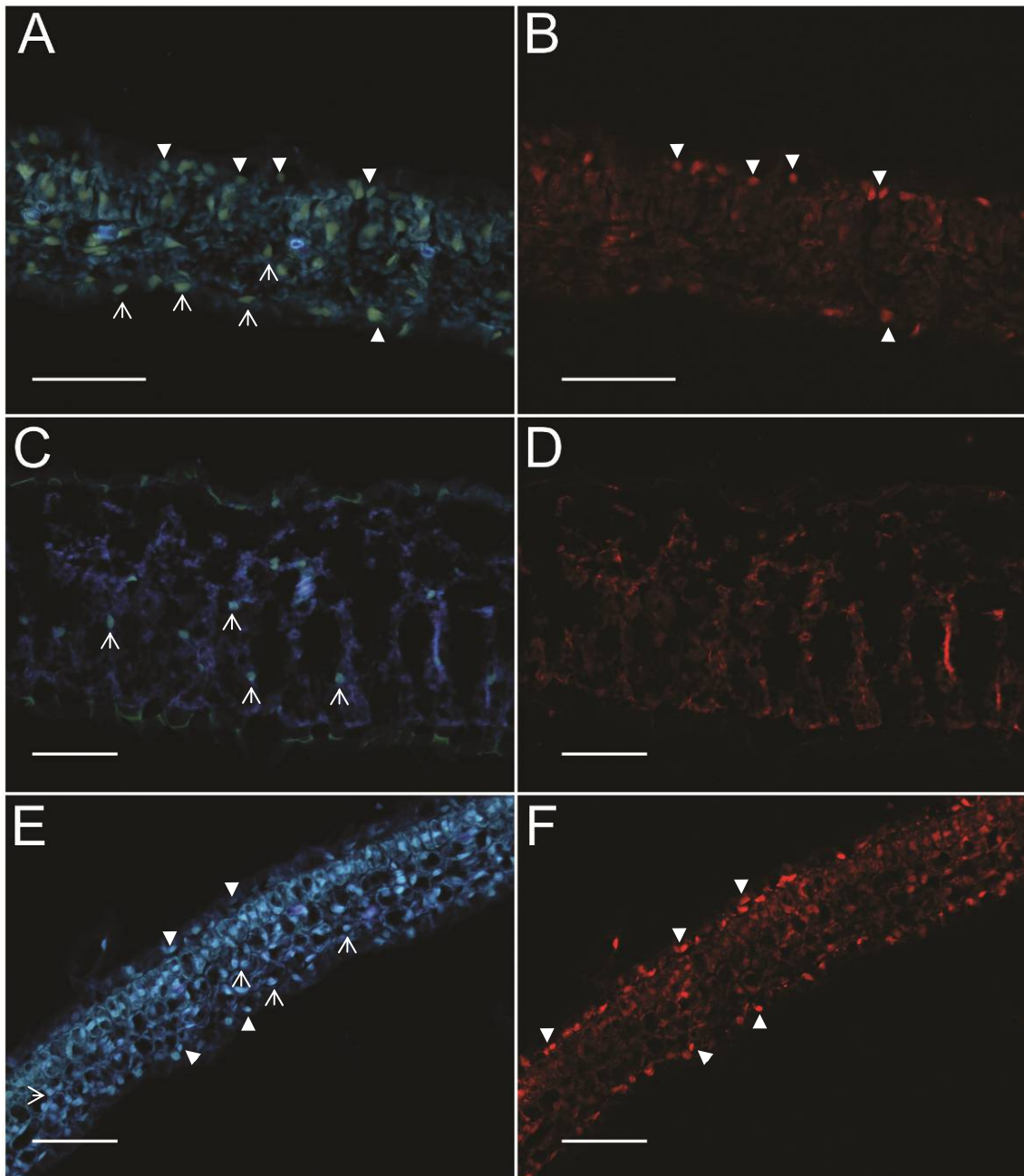


Figura 9. Localização dos vírus recombinantes em células do mesofilo em *N. benthamiana* por meio de hibridização *in situ* aos 28 dpi. Secções transversais obtidas de folhas infectadas sistemicamente foram hibridizadas com sondas específicas para cada vírus e observadas em microscópio de fluorescência. **A, C, E.** DAPI. **B, D, F.** Rodamina. **A, B.** Infecção pelo recombinante ToY-ToR(MP/NSP). **C, D.** Infecção pelo recombinante ToR-ToY (MP/NSP). **E, F.** Infecção pelo recombinante ToR-ToY(BRi). Os triângulos indicam exemplos de núcleos infectados, e as setas indicam exemplos de núcleos saudios.

4.2. Efeito dos genes *MP* e *NSP* do ToYSV na severidade de sintomas, no acúmulo de DNA viral em tomateiro e *N. benthamiana*, e no tropismo de tecido em *N. benthamiana*

Plantas de tomateiro inoculadas com o recombinante ToR-ToY(MP/NSP) apresentaram sintomas aos 16 dpi, o mesmo período observado para o ToRMV (Tabela 2). Os sintomas foram caracterizados por mosaico leve (Figura 3D), semelhante ao induzido pelo ToRMV (Figura 3B), porém bem menos severo em relação ao induzido pelo ToYSV (Figura 3A). Semelhantemente ao observado quanto aos sintomas, a análise por qPCR indicou que o acúmulo de DNA do recombinante ToR-ToY(MP/NSP) em tomateiro é semelhante ao do ToRMV aos 14 dpi. Entretanto, o acúmulo de DNA do ToRMV aumentou aos 28 dpi, enquanto o do recombinante permaneceu semelhante (Figura 4A). O acúmulo de DNA do vírus recombinante foi inferior ao do ToYSV (Figura 4A).

Em *N. benthamiana* o ToR-ToY(MP/NSP) induziu sintomas aos 12 dpi, um valor intermediário entre o ToYSV (7 dpi) e o ToRMV (14 dpi) (Tabela 2). Os sintomas induzidos pelo recombinante incluíram leve deformação foliar e pontos cloróticos espalhados pela folha (Figura 5D), ligeiramente mais severos em relação aos induzidos pelo ToRMV (Figura 5B), porém menos severos do que os induzidos pelo ToYSV neste hospedeiro (Figura 5A). A avaliação do acúmulo de DNA viral indicou que aos 14 e 28 dpi o ToR-ToY(MP/NSP) acumula menos que o ToRMV (Figura 4B).

Em conjunto, os resultados indicam que as proteínas MP e NSP do ToYSV contribuem para a indução de sintomas em *N. benthamiana*, porém não são os únicos determinantes virais para essa característica, uma vez que os sintomas apresentados pelo recombinante ToR-ToY(MP/NSP) foram menos severos do que os induzidos pelo ToYSV. Por outro lado, o menor período latente para o recombinante em comparação ao ToRMV sugere que de alguma forma as proteínas MP e NSP do ToYSV permitem

ao vírus se contrapor aos mecanismos de defesa da planta que retardam o início da infecção sistêmica.

Os resultados do ensaio de hibridização *in situ* indicaram que recombinante ToR-ToY(MP/NSP), apesar de possuir os dois genes responsáveis pelo movimento viral do ToYSV, permanece restrito à células do feixe vascular em *N. benthamiana* (Tabela 3; Figuras 8C e D; 9C e D), da mesma forma que o ToRMV. Assim, as proteínas MP e NSP do ToYSV não são capazes de alterar o tropismo de tecido do ToRMV.

Em conjunto, estes resultados demonstram que as proteínas MP e NSP do ToYSV, quando introduzidas no *background* genético do ToRMV, não alteram de forma significativa sua adaptação ao tomateiro, embora contribuam para aumentar a indução de sintomas em *N. benthamiana*. Entretanto, não são suficientes para torná-lo capaz de induzir sintomas na mesma intensidade que o ToYSV, nem para modificar seu tropismo de tecido. Outros genes e/ou regiões regulatórias do ToYSV devem estar envolvidos na adaptação desse vírus ao tomateiro e a *N. benthamiana*.

4.3. Efeito da região BRi do ToYSV na severidade de sintomas, no acúmulo de DNA viral em tomateiro e *N. benthamiana*, e no tropismo de tecido em *N. benthamiana*

Plantas de tomateiro inoculadas com o recombinante ToR-ToY(BRi) apresentaram sintomas aos 16 dpi, o mesmo período observado para o ToRMV (Tabela 2). Os sintomas foram caracterizados por mosaico leve (Figura 3E), semelhante ao induzido pelo ToRMV (Figura 3B) porém menos severo em relação ao induzido pelo ToYSV (Figura 3A). A análise por qPCR indicou que, semelhantemente ao observado em relação aos sintomas, o acúmulo de DNA do recombinante ToR-ToY(BRi) em tomateiro foi semelhante ao do ToRMV aos 14 dpi. Entretanto, o acúmulo de DNA do

recombinante permaneceu constante dos 14 para os 28 dpi, enquanto o do vírus parental aumentou durante esse período (Figura 4A).

Em *N. benthamiana* o ToR-ToY(BRi) induziu sintomas aos 12 dpi, valor intermediário entre o ToYSV (7 dpi) e o ToRMV (14 dpi) (Tabela 3). Os sintomas sistêmicos induzidos pelo recombinante consistiram em distorção foliar e pontos cloróticos espalhados pela folha (Figura 5E), mais severos em relação aos induzidos pelo ToRMV (Figura 5B), porém menos severos do que os induzidos pelo ToYSV neste hospedeiro (Figura 5A). A avaliação do acúmulo de DNA viral indicou que tanto aos 14 quanto aos 28 dpi o DNA viral do recombinante ToR-ToY(BRi) acumulou menos que o DNA viral de ambos os vírus parentais (Figura 4B).

Em conjunto, os resultados indicam que a região BRi contribui para a indução de sintomas em *N. benthamiana*. Porém, o maior acúmulo de DNA viral do ToRMV em relação ao recombinante sugere que a região BRi do ToYSV afetou negativamente o acúmulo de DNA viral no vírus recombinante.

Os ensaios de hibridização *in situ* indicaram que o recombinante ToR-ToY(BRi), apesar de possuir os dois genes responsáveis pelo movimento viral do ToRMV, tornou-se capaz de infectar as células do mesofilo em *N. benthamiana* (Tabela 3; Figuras 8E e F), além das células do tecido vascular (Tabela 3; Figuras 9E e F). Assim, a região BRi do ToYSV é capaz de alterar o tropismo de tecido do ToRMV. Entretanto, uma menor porcentagem de núcleos de células do mesofilo foram marcados na planta infectada pelo recombinante em comparação à planta infectada pelo ToYSV (Tabela 3).

Em conjunto, estes resultados indicam que a região BRi do ToYSV, quando introduzida no restante do genoma do ToRMV, não altera de forma significativa sua adaptação ao tomateiro. Entretanto, contribui para uma melhor adaptação em *N.*

benthamiana, sendo suficiente para torná-lo capaz de induzir sintomas mais severos em relação aos induzidos pelo ToRMV, e de modificar seu tropismo de tecido.

5. DISCUSSÃO

A eficiência de um vírus em estabelecer a infecção sistêmica está relacionada à maior adaptação do vírus ao hospedeiro. Essa maior adaptação pode ser consequência de uma interação mais eficiente entre as proteínas virais e fatores do hospedeiro, que conduzem a uma maior taxa de replicação, movimentos célula-a-célula e longa distância mais rápidos e, ou supressão mais eficiente de respostas de defesa do hospedeiro (Petty *et al.*, 1995). Considera-se que vírus mais adaptados aos seus hospedeiros induzem sintomas mais severos em relação a outros menos adaptados (Petty & Qin, 2001). Dessa forma, no sistema experimental analisado neste estudo, o ToYSV seria mais adaptado ao tomateiro e a *N. benthamiana* em relação ao ToRMV.

O recombinante ToY-ToR(MP/NSP) (genes *MP* e *NSP* provenientes do ToRMV, e o restante do DNA-B proveniente do ToYSV) induziu sintomas mais severos em tomateiro em relação ao ToRMV, porém mais atenuados e tardios do que os induzidos pelo ToYSV, indicando uma perda de adaptação em relação a este último vírus. Da mesma forma, quando inoculado em *N. benthamiana* o recombinante induziu sintomas mais severos em relação ao ToRMV, porém mais atenuados e tardios em relação ao ToYSV. A análise do acúmulo de DNA viral indicou que em *N. benthamiana* o ToY-ToR(MP/NSP) atingiu menor acúmulo em comparação com o ToYSV, entretanto maior acúmulo em comparação com o ToRMV, em concordância com a severidade dos sintomas induzidos pelo recombinante em comparação aos dois vírus parentais. O maior acúmulo do recombinante em relação ao ToRMV pode ser explicado pela capacidade do ToY-ToR(MP/NSP) em invadir as células do mesofilo, assim como o ToYSV. Por outro lado, o menor acúmulo de DNA viral observado para o ToY-ToR(MP/NSP) em relação ao ToYSV pode ser reflexo de interações menos eficientes

entre as proteínas MP e NSP providas pelo ToRMV e as proteínas do hospedeiro, afetando negativamente o movimento viral e acarretando em um menor número de células infectadas pelo recombinante em comparação ao ToYYSV. Adicionalmente, estes resultados podem estar relacionados a uma capacidade das proteínas NSP e MP do ToYYSV em suprimir respostas de defesa do hospedeiro.

Mariano *et al.* (2004) demonstraram a interação de proteínas cinase do tipo serina/treonina ("NSP-interacting kinase", NIK) com a proteína NSP de begomovírus. As NIKs são proteínas com propriedades de receptores que se localizam na membrana e apresentam características bioquímicas condizentes com a sinalização de defesa contra vírus (Fontes *et al.*, 2004). A ligação de NSP a NIK inibe a sua atividade cinase, e a perda da função do gene *NIK* aumenta a suscetibilidade à infecção por begomovírus. Dessa forma, a interação entre NSP e NIK seria uma forma de suprimir uma resposta de defesa da planta ao vírus (Fontes *et al.*, 2004). A proteína NSP do ToYYSV pode interagir mais eficientemente com a proteína NIK em comparação com a NSP do ToRMV, levando a supressão mais acentuada da via de sinalização mediada por essa proteína. Caso essa hipótese seja verdadeira, a via de defesa mediada por NIK estaria influenciando no sucesso da infecção viral pelo recombinante ToY-ToR(MP/NSP). Experimentos adicionais de fosforilação *in vitro* podem ser realizados para verificar a capacidade das NSPs do ToYYSV e do ToRMV em inibir a autofosforilação de NIK.

O recombinante ToR-ToY(MP/NSP) (genes *MP* e *NSP* provenientes do ToYYSV, e o restante do DNA-B proveniente do ToRMV) induziu sintomas semelhantes aos induzidos pelo ToRMV em tomateiro, porém menos severos em relação ao ToYYSV. A análise do acúmulo de DNA viral indicou que o recombinante atingiu níveis semelhantes ao ToRMV, em concordância com a semelhança na intensidade dos sintomas induzidos pelo ToRMV e pelo recombinante. Quando inoculado em *N.*

benthamiana, o recombinante ToR-ToY(MP/NSP) induziu sintomas mais severos em relação ao ToRMV, porém não tão severos quanto os induzidos pelo ToYSV. Entretanto, em desacordo com os sintomas mais severos induzidos pelo ToR-ToY(MP/NSP) em relação ao ToRMV, o acúmulo de DNA viral do recombinante aos 14 dpi e 28 dpi foi ligeiramente menor que o do ToRMV. O ganho de função apresentado pelo recombinante ToR-ToY(MP/NSP), apresentando sintomas mais severos, sugere que as proteínas MP e NSP do ToYSV, apesar de não alterarem o tropismo de tecido do recombinante, podem realizar interações mais eficientes com as proteínas de *N. benthamiana* do que as proteínas homólogas do ToRMV, e conseqüentemente levar a uma maior alteração da fisiologia da planta. Além disso, os resultados indicam que fatores adicionais às proteínas codificadas pelo DNA-B contribuem para a adaptação do ToYSV nesse hospedeiro.

A contribuição dos genes *MP* e *NSP* do ToYSV na adaptação do ToRMV é dependente do hospedeiro, pois em tomateiro não se observou um ganho de função na presença destes genes. A maior severidade dos sintomas induzidos pelo ToYSV no tomateiro deve, portanto, ser determinada por outros genes e, ou regiões regulatórias, atuando de maneira aditiva. Essa hipótese está em consonância com outros trabalhos que demonstram que a adaptação de begomovírus ao hospedeiro é determinada de maneira cooperativa por regiões codificadoras e não codificadoras (Gillette *et al.*, 1998; Petty *et al.*, 2000). Os resultados aqui apresentados sugerem que ambos os componentes (DNA-A e DNA-B) podem contribuir para a melhor adaptação do ToYSV ao tomateiro e a *N. benthamiana*.

O recombinante ToR-ToY(BRi) (região BRi proveniente do ToYSV, e o restante do DNA-B proveniente do ToRMV) induziu sintomas semelhantes aos induzidos pelo ToRMV em tomateiro (menos severos em relação ao ToYSV). O acúmulo de DNA

viral indicou que o vírus recombinante atingiu níveis similares ao ToRMV, em concordância com a semelhança na severidade dos sintomas induzidos pelo ToRMV e pelo vírus recombinante. Quando inoculado em *N.benthamiana*, o recombinante ToR-ToY(BRi) induziu sintomas mais severos em relação ao ToRMV, mas não tão severos quanto os induzidos pelo ToYSV. A análise do tropismo de tecido indicou que apesar de possuir as proteínas responsáveis pelo movimento viral na planta provenientes do ToRMV, o recombinante foi capaz de invadir as células do mesofilo, o que pode explicar os sintomas mais severos induzidos em comparação ao ToRMV. Entretanto, em desacordo com a capacidade de invadir as células do mesofilo, o acúmulo de DNA viral do recombinante aos 14 dpi e 28 dpi foi menor que o do ToRMV.

É possível que a região promotora BRi do ToYSV seja capaz de recrutar proteínas de ligação ao DNA específicas de *N. benthamiana* que, por sua vez, irão interagir de maneira mais eficiente com a proteína Trap (ativadora da transcrição da proteína NSP), conduzindo a uma ativação mais eficiente da transcrição do gene *NSP*.

Sunter & Bisaro (1992) identificaram a região promotora do gene *NSP* (BRi) e a proteína Trap como os determinantes genéticos do TGMV necessários para a invasão do mesofilo em *N. benthamiana*. É possível que a sequência da região BRi afete temporalmente e, ou quantitativamente a expressão do gene *NSP* e, assim, a eficiência do movimento célula-a-célula do vírus (Jeffrey *et al.*, 1996; Poorna *et al.*, 1996). Um limiar crítico de atividade da proteína NSP pode ser necessário para a invasão bem-sucedida do mesofilo a partir do tecido vascular em plantas infectadas sistemicamente. Esse limiar crítico para a atividade da proteína NSP pode ser explicado pela competição entre as proteínas virais e as proteínas do hospedeiro pela maquinaria de transporte intra- e intercelular (Kragler *et al.*, 1998). Quando o gene *NSP* está sob o controle do promotor BRi do ToYSV, o limiar seria alcançado pela expressão aumentada da

proteína NSP, por sua vez mediada por interações mais eficientes entre a região BRi do ToYSV e fatores do hospedeiro. Quando o gene *NSP* está sob o controle do promotor BRi do ToRMV, a expressão de NSP seria insuficiente e o vírus ficaria restrito ao floema. Experimentos futuros com o intuito de avaliar o acúmulo da proteína NSP nas plantas infectadas pelos vírus parentais e recombinantes ajudarão a confirmar a hipótese de que níveis elevados da proteína NSP são requeridos para a infecção das células mesofílicas.

Outra característica que deve ser considerada é que o ToYSV alcança níveis maiores de acúmulo viral em um menor tempo em comparação ao ToRMV (Alves-Junior *et al.*, 2009). Assim, a região BRi do ToYSV poderia permitir ao vírus recombinante invadir as células do mesófilo e causar sintomas mais severos em *N. benthamiana*, entretanto uma menor concentração de fatores virais envolvidos na supressão da resposta de defesa pode estar presente, e o acúmulo de DNA viral é inferior.

O fenótipo de um vírus recombinante representa os efeitos aditivos de ganho de função resultante das sequências regulatórias e das proteínas virais obtidas a partir de um vírus mais adaptado a um determinado hospedeiro, juntamente com qualquer perda de função resultante de interações imperfeitas entre as sequências regulatórias dos dois vírus e as proteínas codificadas por esses vírus. Consequentemente, a adaptação aos hospedeiros conferida pelas sequências regulatórias e pelas proteínas virais do ToYSV será observada apenas se o ganho de função for superior à perda de função .

Os resultados indicam que a região BRi do ToYSV é em parte responsável pelos sintomas induzidos por esse vírus e pela sua capacidade de invadir as células do mesófilo em *N. benthamiana*. Para a confirmação dos resultados obtidos é necessária a construção do recombinante recíproco ToY-ToR(BRi) e a análise de seu tropismo de

tecido: sua restrição ao floema em *N. benthamiana* corroborará os resultados obtidos para os outros recombinantes.

Alguns trabalhos já identificaram a proteína Trap e a proteína homóloga C2 como um fator importante para a patogênese de begomovírus e curtovírus (Vanitharani *et al.*, 2004; Trinks *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2011). Assim, a construção de recombinantes com base na troca da Trap entre o ToYSV e o ToRMV poderia revelar um papel dessa proteína no processo de infecção do ToYSV que justificasse esse vírus ser mais adaptado ao tomateiro e a *N. benthamiana* em comparação com o ToRMV.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, P.F.; GALVÃO, R.M.; ANDRADE, E.C.; MANDELLI, M.S.; FERNANDES, A.V.; ZERBINI, F.M.; FONTES, E.P.B. Detecção e caracterização molecular de novos geminivírus que infectam tomateiros. *Fitopatologia Brasileira*, v. 23, p. 311, 1998.
- ALVES-JUNIOR, M.; ALFENAS-ZERBINI, P.; ANDRADE, E.C.; ESPOSITO, D.A.; SILVA, F.N.; CRUZ, A.C.F.; VENTRELLA, M.C.; OTONI, W.C.; ZERBINI, F.M. Synergism and negative interference during co-infection of tomato and *Nicotiana benthamiana* with two bipartite begomoviruses. *Virology*, v. 387, p. 257-266, 2009.
- AMBROZEVICIUS, L.P.; CALEGARIO, R.F.; FONTES, E.P.B.; CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 27, p. 372-377, 2002.
- AMIN, I.; PATIL, B.L.; BRIDDON, R.W.; MANSOOR, S.; FAUQUET, C.M. A common set of developmental miRNAs are upregulated in *Nicotiana benthamiana* by diverse begomoviruses. *Virology Journal*, v. 8, p. 143, 2011.
- ANDRADE, E.C.; MANHANI, G.G.; ALFENAS, P.F.; CALEGARIO, R.F.; FONTES, E.P.B.; 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, 2006a.
- ANDRADE, E.C.; MANHANI, G.G.; FONTES, E.P.B.; ZERBINI, F.M. Análise parcial dos determinantes genéticos virais responsáveis pela indução de sintomas por begomovírus em tomateiro e *Nicotiana benthamiana*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 31, p. S225, 2006b.
- ARAGÃO, F.J.L.; BARROS, L.M.G.; BRASILEIRO, A.C.M.; RIBEIRO, S.G.; SMITH, F.D.; SANFORD, J.C.; FARIA, J.C.; 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.
- ARGUELLO-ASTORGA, G.R.; GUEVARA-GONZÁLEZ, R.G.; HERRERA-ESTRELLA, L.R.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. Geminivirus replication origins have a group-specific organization of interactive elements: a model for replication. *Virology*, v. 203, p. 90-100, 1994.
- ARGUELLO-ASTORGA, G.R.; RUIZ-MEDRANO, R. An iteron-related domain is associated to Motif 1 in the replication proteins of geminiviruses: Identification of potential interacting amino acid-base pairs by a comparative approach. *Archives of Virology*, v. 146, p. 1465-1485, 2001.
- ASCENCIO-IBANEZ, J.T.; SOZZANI, R.; LEE, T.J.; CHU, T.M.; WOLFINGER, R.D.; CELLA, R.; HANLEY-BOWDOIN, L. Global analysis of *Arabidopsis* gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection. *Plant Physiology*, v. 148, p. 436-454, 2008.

- BALIJI, S.; LACATUS, G.; SUNTER, G. The interaction between geminivirus pathogenicity proteins and adenosine kinase leads to increased expression of primary cytokinin-responsive genes. *Virology*, v. 402, p. 238-247, 2010.
- BEDFORD, I.D.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; ROSELL, R.C.; MARKHAM, P.G. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographical regions. *Annals of Applied Biology*, v. 125, p. 311-325, 1994.
- BELLOWS, T.S.; PERRING, T.M.; GILL, R.J.; HEADRICK, D.H. Description of a new species of *Bemisia*. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 87, p. 195-206, 1994.
- BEZERRA, I.C.; LIMA, M.F.; RIBEIRO, S.G.; GIORDANO, L.B.; ZERBINI, F.M.; ÁVILA, A.C. Occurrence of geminivirus in tomato-producing areas in Submédio São Francisco. *Fitopatologia Brasileira*, v. 22, p. 331, 1997.
- BLEVINS, T.; RAJESWARAN, R.; SHIVAPRASAD, P.V.; BEKNAZARIANTS, D.; SI-AMMOUR, A.; PARK, H.S.; VAZQUEZ, F.; ROBERTSON, D.; MEINS, F.; HOHN, T.; POOGGIN, M.M. Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acids Research*, v. 34, p. 6233-6246, 2006.
- BRIDDON, R.W. Cotton leaf curl disease, a multicomponent begomovirus complex. *Molecular Plant Pathology*, v. 4, p. 427-434, 2003.
- BRIDDON, R.W.; PINNER, M.S.; STANLEY, J.; MARKHAM, P.G. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology*, v. 177, p. 85-94, 1990.
- BRIDDON, R.W.; STANLEY, J. Subviral agents associated with plant single-stranded DNA viruses. *Virology*, v. 344, p. 198-210, 2006.
- BRODERSEN, P.; SAKVARELIDZE-ACHARD, L.; BRUUN-RASMUSSEN, M.; DUNOYER, P.; YAMAMOTO, Y.Y.; SIEBURTH, L.; VOINNET, O. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science*, v. 320, p. 1185-1190, 2008.
- BROWN, J.K.; COATS, S.; FROHLICH, D.R.; BEDFORD, I.D.; MARKHAM, P.G. Characterization and distribution of esterase electromorphs in the whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae). *Biochemistry and Genetics*, v. 33, p. 205-214, 1995.
- CALEGARIO, R.F.; FERREIRA, S.S.; ANDRADE, E.C.; 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.; FONTES, E.P.B. A novel nucleocytoplasmic traffic GTPase identified as a functional target of the bipartite geminivirus nuclear shuttle protein. *Plant Journal*, v. 55, p. 869-880, 2008.
- CASTILLO-URQUIZA, G.P. *Diversidade e estrutura genética de begomovírus em duas regiões produtoras de tomate do Sudeste do Brasil*. Tese D.S. Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 107 p., 2008.

- CASTILLO-URQUIZA, G.P.; BESERRA JR., J.E.A.; BRUCKNER, F.P.; LIMA, A.T.M.; VARSANI, A.; ALFENAS-ZERBINI, P.; ZERBINI, F.M. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Archives of Virology*, v. 153, p. 1985-1989, 2008.
- CASTILLO-URQUIZA, G.P.; BESERRA JUNIOR, J.E.A.; ALFENAS-ZERBINI, P.; VARSANI, A.; LIMA, A.T.M.; BARROS, D.R.; ZERBINI, F.M. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato in Paty do Alferes, Rio de Janeiro state, Brazil. *Virus Reviews and Research*, v. 12, p. 233, 2007.
- CHAPMAN, E.J.; PROKHNEVSKY, A.I.; GOPINATH, K.; DOLJA, V.V.; CARRINGTON, J.C. Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes & Development*, v. 18, p. 1179-1186, 2004.
- CHATTERJI, A.; PADIDAM, M.; BEACHY, R.N.; FAUQUET, C.M. Identification of replication specificity determinants in two strains of tomato leaf curl virus from New Delhi. *Journal of Virology*, v. 73, p. 5481-5489, 1999.
- COSTA, A.S.; OLIVEIRA, A.R.; SILVA, D.M. Transmissão mecânica do mosaico dourado do tomateiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia*, v. 6, p. 147, 1975.
- COTRIM, M.A.; KRAUSE-SAKATE, R.; NARITA, N.; ZERBINI, F.M.; PAVAN, M.A. Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. *Summa Phytopathologica*, v. 33, p. 300-303, 2007.
- CUI, X.F.; LI, G.X.; WANG, D.W.; HU, D.W.; 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.
- CUI, X.F.; TAO, X.R.; XIE, Y.; FAUQUET, C.M.; ZHOU, X.P. A DNA beta associated with Tomato Yellow Leaf Curl China Virus is required for symptom induction. *Journal of Virology*, v. 78, p. 13966-13974, 2004.
- DAVIES, J.W.; STANLEY, J.; DONSON, J.; MULLINEAUX, P.M.; BOULTON, M.I. Structure and replication of geminivirus genomes. *Journal of Cell Science*, v. 7, p. 95-107, 1987.
- DE VRIES, W.; BERKHOUT, B. RNAi suppressors encoded by pathogenic human viruses. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 40, p. 2007-2012, 2008.
- DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 1, p. 19-21, 1983.
- DING, C.J.; QING, L.; LI, Z.H.; LIU, Y.; QIAN, Y.J.; ZHOU, X.P. Genetic Determinants of Symptoms on Viral DNA Satellites. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, p. 5380-5389, 2009.
- DREHER, K.; CALLIS, J. Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants. *Annals of Botany*, v. 99, p. 787-822, 2007.
- DUNOYER, P.; LECELLIER, C.H.; PARIZOTTO, E.A.; HIMBER, C.; VOINNET, O. Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell*, v. 16, p. 1235-1250, 2004.

- EGELKROUT, E.M.; ROBERTSON, D.; HANLEY-BOWDOIN, L. Proliferating cell nuclear antigen transcription is repressed through an E2F consensus element and activated by geminivirus infection in mature leaves. *Plant Cell*, v. 13, p. 1437-1452., 2001.
- FARIA, J.C.; BEZERRA, I.C.; ZERBINI, F.M.; RIBEIRO, S.G.; LIMA, M.F. Situação atual das geminiviroses no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 25, p. 125-137, 2000.
- FARIA, J.C.; MAXWELL, D.P. Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. *Phytopathology*, v. 89, p. 262-268, 1999.
- FARIA, J.C.; SOUZA-DIAS, J.A.C.; SLACK, S.; MAXWELL, D.P. A new geminivirus associated with tomato in the State of São Paulo, Brazil. *Plant Disease*, v. 81, p. 423, 1997.
- FAUQUET, C.M.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; MORIONES, E.; STANLEY, J.; ZERBINI, F.M.; ZHOU, X. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology*, v. 153, p. 783-821, 2008.
- FERNANDES, A.V.; ANDRADE, E.C.; ALFENAS, P.F.; GALVÃO, R.M.; ZERBINI, F.M.; FONTES, E.P.B. Clonagem e caracterização de novos geminivírus que infectam *Sida rhombifolia*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 23, p. 317, 1998.
- FERNANDES, F.R.; ALBUQUERQUE, L.C.; GIORDANO, L.B.; BOITEUX, L.S.; ÁVILA, A.C.; INOUE-NAGATA, A.K. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes*, v. 36, p. 251-258, 2008.
- FERNANDES, J.J. *Caracterização e diversidade genética de geminivírus associados ao tomateiro na região do Triângulo Mineiro*. Tese D.S. Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 192 p., 2001.
- FERNANDES, J.J.; CARVALHO, M.G.; ANDRADE, E.C.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; FONTES, E.P.B.; ZERBINI, F.M. Biological and molecular properties of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Plant Pathology*, v. 55, p. 513-522, 2006.
- FLORENTINO, L.H.; SANTOS, A.A.; FONTENELLE, M.R.; PINHEIRO, G.L.; ZERBINI, F.M.; BARACAT-PEREIRA, M.C.; FONTES, E.P.B. A PERK-like receptor kinase interacts with the geminivirus nuclear shuttle protein and potentiates viral infection. *Journal of Virology*, v. 80, p. 6648-6656, 2006.
- FONTENELLE, M.R.; LUZ, D.F.; GOMES, A.P.; FLORENTINO, L.H.; ZERBINI, F.M.; 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.; EAGLE, P.A.; SIPE, P.S.; LUCKOW, V.A.; HANLEY-BOWDOIN, L. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, p. 8459-8465, 1994.
- FONTES, E.P.B.; LUCKOW, V.A.; 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.; 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.; KLEINOW, T.; ABERLE, H.J.; WEGE, C.; HULSER, D.; JESKE, H. Yeast two-hybrid systems confirm the membrane association and oligomerization of BC1 but do not detect an interaction of the movement proteins BC1 and BV1 of Abutilon mosaic geminivirus. *Archives of Virology*, v. 149, p. 2349-2364, 2004.
- FRISCHMUTH, S.; WEGE, C.; HULSER, D.; 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.
- GAFNI, Y.; EPEL, B.L. The role of host and viral proteins in intra and inter-cellular trafficking of geminiviruses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 60, p. 231-241, 2002.
- GALVÃO, R.M.; FERNANDES, A.V.; ALMEIDA, J.D.; ALFENAS, P.F.; ANDRADE, E.C.; FONTES, E.P.B. Molecular characterization of two new tomato-infecting geminiviruses and the *Sida*-infecting geminiviruses complex from Brazil. In: International Workshop on Bemisia and Geminiviral diseases, San Juan - Puerto Rico. 1998. p.L-93.
- GALVÃO, R.M.; MARIANO, A.C.; LUZ, D.F.; ALFENAS, P.F.; ANDRADE, E.C.; ZERBINI, F.M.; ALMEIDA, M.R.; FONTES, E.P.B. A naturally occurring recombinant DNA-A of a typical bipartite begomovirus does not require the cognate DNA-B to infect *Nicotiana benthamiana* systemically. *Journal of General Virology*, v. 84, p. 715-726, 2003.
- GILBERTSON, R.L.; SUDARSHANA, M.; JIANG, H.; ROJAS, M.R.; LUCAS, W.J. Limitations on geminivirus genome size imposed by plasmodesmata and virus-encoded movement protein: Insights into DNA trafficking. *Plant Cell*, v. 15, p. 2578-2591, 2003.
- GILLETTE, W.K.; MEADE, T.J.; JEFFREY, J.L.; PETTY, I.T. Genetic determinants of host-specificity in bipartite geminivirus DNA A components. *Virology*, v. 251, p. 361-369, 1998.
- GLADFELTER, H.J.; EAGLE, P.A.; FONTES, E.P.B.; BATTS, L.; HANLEY-BOWDOIN, L. Two domains of the AL 1 protein mediate geminivirus origin recognition. *Virology*, v. 239, p. 186-197, 1997.
- GLICK, E.; ZRACHYA, A.; LEVY, Y.; METT, A.; GIDONI, D.; BELAUSOV, E.; CITOVSKY, V.; GAFNI, Y. Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 105, p. 157-161, 2008.
- GUSMAROLI, G.; FENG, S.; DENG, X.W. The Arabidopsis CSN5A and CSN5B subunits are present in distinct COP9 signalosome complexes, and mutations in their JAMM domains exhibit differential dominant negative effects on development. *Plant Cell*, v. 16, p. 2984-3001, 2004.

- GUTIERREZ, C. Geminivirus DNA replication. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 56, p. 313-329, 1999.
- GUTIERREZ, C. DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminiviruses. *EMBO Journal*, v. 19, p. 792-799, 2000.
- GUTIERREZ, C.; RAMIREZ-PARRA, E.; CASTELLANO, M.M.; SANZ-BURGOS, A.P.; LUQUE, A.; MISSICH, R. Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. *Veterinary Microbiology*, v. 98, p. 111-119, 2004.
- HANLEY-BOWDOIN, L.; SETTLAGE, S.B.; OROZCO, B.M.; NAGAR, S.; 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.; 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.; ROBINSON, D.J. Natural genomic and antigenic variation in white-fly transmitted geminiviruses (begomoviruses). *Annual Review of Phytopathology*, v. 39, p. 369-398, 1999.
- HEYRAUD-NITSCHKE, F.; SCHUMACHER, S.; LAUFS, J.; SCHAEFER, S.; SCHELL, J.; GRONENBORN, B. Determination of the origin cleavage and joining domain of geminivirus Rep proteins. *Nucleic Acids Research*, v. 23, p. 910-916, 1995.
- HOFER, P.; BEDFORD, I.D.; MARKHAM, P.G.; JESKE, H.; FRISCHMUTH, T. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. *Virology*, v. 236, p. 288-295, 1997.
- INGHAM, D.J.; PASCAL, E.; LAZAROWITZ, S.G. Both bipartite geminivirus movement proteins define viral host range, but only BL1 determines viral pathogenicity. *Virology*, v. 207, p. 191-204, 1995.
- JEFFREY, J.L.; POOMA, W.; PETTY, I.T. Genetic requirements for local and systemic movement of tomato golden mosaic virus in infected plants. *Virology*, v. 223, p. 208-218., 1996.
- JOVEL, J.; RESKI, G.; ROTHENSTEIN, D.; RINGEL, M.; FRISCHMUTH, T.; JESKE, H. *Sida micrantha* mosaic is associated with a complex infection of begomoviruses different from *Abutilon mosaic virus*. *Archives of Virology*, v. 149, p. 829-841, 2004.
- JUPIN, I., HEROCOURT, F., BENZ, B., GRONENBORN, B. DNA replication specificity of TYLCV geminivirus is mediated by the amino-terminal 116 amino acids of the Rep protein. *FEBS Letters*, v. 262, p. 116-120, 1995.
- KRAGLER, F.; MONZER, J.; SHASH, K.; XOCONOSTLE-CAZARES, B.; LUCAS, W.J. Cell-to-cell transport of proteins: requirement for unfolding and characterization of binding to a putative plasmodesmal receptor. *Plant Journal*, v. 15, p. 367-381, 1998.
- KRENZ, B.; WINDEISEN, V.; WEGE, C.; JESKE, H.; KLEINOW, T. A plastid-targeted heat shock cognate 70 kDa protein interacts with the *Abutilon mosaic virus* movement protein. *Virology*, v. 401, p. 6-17, 2010.

- LACATUS, G.; SUNTER, G. The Arabidopsis PEAPOD2 transcription factor interacts with geminivirus AL2 protein and the coat protein promoter. *Virology*, v. 392, p. 196-202, 2009.
- LAUFS, J.; TRAUT, W.; HEYRAUD, F.; MATZEIT, G.; ROGERS, S.G.; SCHELL, J.; 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, 1995.
- LAZAROWITZ, S.G. Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 11, p. 327-349, 1992.
- LEVY, A.; TZFIRA, T. Bean dwarf mosaic virus: A model system for the study of viral movement. *Molecular Plant Pathology*, v. 11, p. 451-461, 2010.
- LEWIS, J.D.; LAZAROWITZ, S.G. Arabidopsis synaptotagmin SYTA regulates endocytosis and virus movement protein cell-to-cell transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 107, p. 2491-2496, 2010.
- LIN, B.; AKBAR BEHJATNIA, S.A.; DRY, I.B.; RANGLES, J.W.; REZAIAN, M.A. High-affinity Rep-binding is not required for the replication of a geminivirus DNA and its satellite. *Virology*, v. 305, p. 353-363, 2003.
- LOURENÇÃO, A.L.; NAGAI, H. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. *Bragantia*, v. 53, p. 53-59, 1994.
- LOZANO-DURAN, R.; ROSAS-DIAZ, T.; GUSMAROLI, G.; LUNA, A.P.; TACONNAT, L.; DENG, X.W.; BEJARANO, E.R. Geminiviruses subvert ubiquitination by altering CSN-mediated derubylation of SCF E3 ligase complexes and inhibit jasmonate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, v. 23, p. 1014-1032, 2011.
- MAHAJAN, N.; PARAMESWARI, C.; VELUTHAMBI, K. Severe stunting in blackgram caused by the *Mungbean yellow mosaic virus* (MYMV) KA27 DNA B component is ameliorated by co-infection or post-infection with the KA22 DNA B: MYMV nuclear shuttle protein is the symptom determinant. *Virus Research*, v. 157, p. 25-34, 2011.
- MANSOOR, S.; BRIDDON, R.W.; ZAFAR, Y.; STANLEY, J. Geminivirus disease complexes: An emerging threat. *Trends in Plant Sciences*, 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.; 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.
- MATYIS, J.C.; SILVA, D.M.; OLIVEIRA, A.R.; COSTA, A.S. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. *Summa Phytopathologica*, v. 1, p. 267-275, 1975.
- McGARRY, R.C.; BARRON, Y.D.; CARVALHO, M.F.; HILL, J.E.; GOLD, D.; CHEUNG, E.; KRAUS, W.L.; LAZAROWITZ, S.G. A novel Arabidopsis acetyltransferase interacts with the geminivirus movement protein NSP. *Plant Cell*, v. 15, p. 1605-1618, 2003.
- MELO, P.C.T. Mosca branca ameaça produção de hortaliças. Campinas, SP, Brazil: Asgrow do Brasil Sementes Ltda., Technical Bulletin, 1992.

- MOFFATT, B.A.; WANG, L.; ALLEN, M.S.; STEVENS, Y.Y.; QIN, W.; SNIDER, J.; VON SCHWARTZENBERG, K. Adenosine kinase of Arabidopsis: Kinetic properties and gene expression. *Plant Physiology*, v. 124, p. 1775-1785, 2000.
- MORALES, F.J. History and current distribution of begomoviruses in Latin America. *Advances in Virus Research*, v. 67, p. 127-162, 2006.
- MORALES, F.J.; ANDERSON, P.K. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology*, v. 146, p. 415-441, 2001.
- MORALES, F.J.; JONES, P.G. The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. *Virus Research*, v. 100, p. 57-65, 2004.
- MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J. *Tomato yellow leaf curl virus*, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Research*, v. 71, p. 123-134, 2000.
- MORRA, M.R.; PETTY, I.T.D. Tissue specificity of geminivirus infection is genetically determined. *Plant Cell*, v. 12, p. 2259-2270, 2000.
- NAGAR, S.; HANLEY-BOWDOIN, L.; 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.; 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.
- NARANJO, S.E.; ELLSWORTH, P.C. Challenges and opportunities for pest management of *Bemisia tabaci* in the new century. *Crop Protection*, v. 20, p. 707, 2001.
- NOUEIRY, A.O.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell*, v. 76, p. 925-932, 1994.
- OROZCO, B.M.; HANLEY-BOWDOIN, L. Conserved sequence and structural motifs contribute to the DNA binding and cleavage activities of a geminivirus replication protein. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, p. 24448-24456, 1998.
- OROZCO, B.M.; MILLER, A.B.; SETTLAGE, S.B.; HANLEY-BOWDOIN, L. Functional domains of a geminivirus replication protein. *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, p. 9840-9846, 1997.
- PADIDAM, M.; BEACHY, R.N.; FAUQUET, C.M. The role of AV2 ("precoat") and coat protein in viral replication and movement in tomato leaf curl geminivirus. *Virology*, v. 224, p. 390-404, 1996.
- PALMER, K.E.; RYBICKI, E.P. The molecular biology of mastreviruses. *Advances in Virus Research*, v. 50, p. 183-234, 1998.
- PALMER, K.E.; SCHNIPPENKOETTER, W.H.; RYBICKI, E.P. Geminivirus isolation and DNA extraction. *Methods in Molecular Biology*, v. 81, p. 41-52, 1998.
- PAPROTKA, T.; METZLER, V.; JESKE, H. The first DNA 1-like alphasatellites in association with New World begomoviruses in natural infections. *Virology*, v. 404, p. 148-157, 2010.

- PEDERSEN, T.J.; HANLEY-BOWDOIN. Molecular characterization of the AL3 protein encoded by a bipartite geminivirus. *Virology*, v. 202, p. 1070-1075, 1994.
- PETTY, I.T.; CARTER, S.C.; MORRA, M.R.; JEFFREY, J.L.; OLIVEY, H.E. Bipartite geminivirus host adaptation determined cooperatively by coding and noncoding sequences of the genome. *Virology*, v. 277, p. 429-438, 2000.
- PETTY, I.T.D.; MILLER, C.G.; MEADE-HASH, T.J.; SCHAFFER, R.L. Complementable and noncomplementable host adaptation defects in bipartite geminiviruses. *Virology*, v. 212, p. 263-267, 1995.
- PETTY, I.T.D.; QIN, Y. Genetic analysis of bipartite geminivirus tissue tropism. *Virology*, v. 291, p. 311-323, 2001.
- PFEFFER, S.; DUNOYER, P.; HEIM, F.; RICHARDS, K.E.; JONARD, G.; ZIEGLER-GRAFF, V. P0 of *Beet western yellows virus* is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology*, v. 76, p. 6815-6824, 2002.
- POLSTON, J.E.; ANDERSON, P.K. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Disease*, v. 81, p. 1358-1369, 1997.
- POOMA, W.; GILLETTE, W.K.; JEFREY, J.L.; PETTY, I.T.D. Host and viral factors determine the dispensability of coat protein for bipartite geminivirus movement. *Virology*, v. 218, p. 264-268, 1996.
- QU, F.; MORRIS, T.J. Efficient infection of *Nicotiana benthamiana* by *Tomato bushy stunt virus* is facilitated by the coat protein and maintained by p19 through suppression of gene silencing. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 15, p. 193-202, 2002.
- RAJA, P.; WOLF, J.N.; BISARO, D.M. RNA silencing directed against geminiviruses: Post-transcriptional and epigenetic components. *Biochimie Biophysica Acta*, v. 1799, p. 337-351, 2010.
- RAMOS, P.L.; GUEVARA-GONZALEZ, R.G.; PERAL, R.; ASCENCIO-IBANEZ, J.T.; POLSTON, J.E.; ARGUELLO-ASTORGA, G.R.; VEGA-ARREGUIN, J.C.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. Tomato mottle Taino virus pseudorecombines with PYMV but not with ToMoV: Implications for the delimitation of cis- and trans-acting replication specificity determinants. *Archives of Virology*, v. 148, p. 1697-1712, 2003.
- RENTERIA-CANETT, I.; XOCONOSTLE-CAZARES, B.; RUIZ-MEDRANO, R.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. Geminivirus mixed infection on pepper plants: Synergistic interaction between PHYVV and PepGMV. *Virology Journal*, v. 8, p. 104, 2011.
- REZENDE, E.A.; FILGUEIRA, F.A.R.; ZERBINI, F.M.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; FERNANDES, J.J.; GILBERTSON, R.L. Tomato infected with geminivirus in greenhouse conditions at Uberlândia-MG, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 21, p. 424, 1996.
- RIBEIRO, S.G.; AMBROZEVICIUS, L.P.; ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; CALEGARIO, R.F.; FERNANDES, J.J.; LIMA, M.F.; MELLO, R.N.; ROCHA, H.; ZERBINI, F.M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology*, v. 148, p. 281-295, 2003.

- RIBEIRO, S.G.; BEZERRA, I.C.; LIMA, M.F.; ÁVILA, A.C.; GIORDANO, L.B. Occurrence of geminivirus in tomato plants in Bahia. In: VIII Encontro Nacional de Virologia (Resumos), São Lourenço, MG. SBV, 1996. p.290.
- RIBEIRO, S.G.; MARTIN, D.P.; LACORTE, C.; SIMÕES, I.C.; ORLANDINI, D.R.S.; INOUE-NAGATA, A.K. Molecular and biological characterization of *Tomato chlorotic mottle virus* suggests that recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses. *Phytopathology*, v. 97, p. 702-711, 2007.
- RIBEIRO, S.G.; MELLO, L.V.; BOITEUX, L.S.; KITAJIMA, E.W.; FARIA, J.C. Tomato infection by a geminivirus in the Federal District, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 19, p. 330, 1994.
- ROCHA, C.S.; SANTOS, A.A.; MACHADO, J.P.B.; FONTES, E.P.B. The ribosomal protein L10/QM-like protein is a component of the NIK-mediated antiviral signaling. *Virology*, v. 380, p. 165-169, 2008.
- ROJAS, A.; KVARNHEDEN, A.; MARCENARO, D.; VALKONEN, J.P.T. Sequence characterization of Tomato leaf curl Sinaloa virus and *Tomato severe leaf curl virus*: Phylogeny of New World begomoviruses and detection of recombination. *Archives of Virology*, v. 150, p. 1281-1299, 2005a.
- ROJAS, M.R.; GILBERTSON, R.L.; RUSSELL, D.R.; 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.; GILBERTSON, R.L. Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology*, v. 43, p. 361-394, 2005b.
- ROJAS, M.R.; JIANG, H.; SALATI, R.; XOCONOSTLE-CAZARES, B.; SUDARSHANA, M.R.; LUCAS, W.J.; 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.
- ROJAS, M.R.; NOUEIRY, A.O.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. Bean dwarf mosaic geminivirus movement proteins recognize DNA in a form- and size-specific manner. *Cell*, v. 95, p. 105-113, 1998.
- ROMAY, G.; CHIRINOS, D.; GERAUD-POUEY, F.; DESBIEZ, C. Association of an atypical alphasatellite with a bipartite New World begomovirus. *Archives of Virology*, v. 155, p. 1843-1847, 2010.
- ROTH, B.M.; PRUSS, G.J.; VANCE, V.B. Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Research*, v. 102, p. 97-108, 2004.
- SANDERFOOT, A.A.; INGHAM, D.J.; 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.; 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.

- SANTOS, A.A.; CARVALHO, C.M.; FLORENTINO, L.H.; RAMOS, H.J.O.; FONTES, E.P.B. Conserved threonine residues within the A-loop of the receptor NIK differentially regulate the kinase function required for antiviral signaling. *PLoS One*, v. 4, 2009.
- SANTOS, A.A.; LOPES, K.V.G.; APFATA, J.A.C.; FONTES, E.P.B. NSP-interacting kinase, NIK: A transducer of plant defence signalling. *Journal of Experimental Botany*, v. 61, p. 3839-3845, 2010.
- SAUNDERS, K.; BEDFORD, I.D.; BRIDDON, R.W.; MARKHAM, P.G.; WONG, S.M.; STANLEY, J. A unique virus complex causes *Ageratum yellow vein disease*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 97, p. 6890-6895, 2000.
- SAUNDERS, K.; BEDFORD, I.D.; STANLEY, J. Adaptation from whitefly to leafhopper transmission of an autonomously replicating nanovirus-like DNA component associated with *ageratum yellow vein disease*. *Journal of General Virology*, v. 83, p. 907-913, 2002.
- SAUNDERS, K.; STANLEY, J. A nanovirus-like DNA component associated with yellow vein disease of *Ageratum conyzoides*: Evidence for interfamilial recombination between plant DNA viruses. *Virology*, v. 264, p. 142-152, 1999.
- SAUNDERS, K.; WEGE, C.; VELUTHAMBI, K.; JESKE, H.; STANLEY, J. The distinct disease phenotypes of the common and yellow vein strains of *Tomato golden mosaic virus* are determined by nucleotide differences in the 3'-terminal region of the gene encoding the movement protein. *Journal of General Virology*, v. 82, p. 45-51, 2001.
- SCHAFFER, R.L.; MILLER, C.G.; PETTY, I.T.D. Virus and host-specific adaptations in the BL1 and BR1 genes of bipartite geminiviruses. *Virology*, v. 214, p. 330-338, 1995.
- SCHUSTER, D.J.; MUELLER, T.F.; KRING, J.B.; PRICE, J.F. Relationship of the sweetpotato whitefly to a new tomato fruit disorder. *HortScience*, v. 25, p. 1618-1620, 1990.
- SHARMA, P.; IKEGAMI, M.; KON, T. Identification of the virulence factors and suppressors of posttranscriptional gene silencing encoded by *Ageratum yellow vein virus*, a monopartite begomovirus. *Virus Research*, v. 149, p. 19-27, 2010.
- 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. Subviral DNAs associated with geminivirus disease complexes. *Veterinary Microbiology*, v. 98, p. 121-129, 2004.
- STANLEY, J.; BISARO, D.M.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; FAUQUET, C.M.; HARRISON, B.D.; RYBICKI, E.P.; STENGER, D.C. Family *Geminiviridae*. In: FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. (Ed.). *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p. 301-326.
- STENGER, D.C.; REVINGTON, G.N.; STEVENSON, M.C.; BISARO, D.M. Replicational release of geminivirus genomes from tandemly repeated copies: Evidence for rolling-circle replication of a plant viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 88, p. 8029-8033, 1991.

- SUNTER, G.; BISARO, D.M. Transactivation in a geminivirus: AL2 gene product is needed for coat protein expression. *Virology*, v. 180, p. 416-422, 1991.
- SUNTER, G.; 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.; HARTITZ, M.D.; HORMUZDI, S.G.; BROUGH, C.L.; BISARO, D.M. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required for coat protein accumulation while ORF AL3 is necessary for efficient DNA replication. *Virology*, v. 179, p. 69-77, 1990.
- TENG, K.L.; CHEN, H.; LAI, J.B.; ZHANG, Z.H.; FANG, Y.Y.; XIA, R.; ZHOU, X.P.; GUO, H.S.; XIE, Q. Involvement of C4 protein of Beet severe curly top virus (Family *Geminiviridae*) in virus movement. *PLoS One*, v. 5, 2010.
- TRINKS, D.; RAJESWARAN, R.; SHIVAPRASAD, P.V.; AKBERGENOV, R.; OAKELEY, E.J.; VELUTHAMBI, K.; HOHN, T.; 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.
- TYLER, K.L.; FIELDS, B.N. Pathogenesis of viral infections. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Eds.) *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. p. 173-218.
- UNSELD, S.; RINGEL, M.; HÖFER, P.; HÖHNLE, M.; JESKE, H.; BEDFORD, I.D.; MARKHAM, P.G.; FRISCHMUTH, T. Host range and symptom variation of pseudorecombinant virus produced by two distinct bipartite geminiviruses. *Archives of Virology*, v. 145, p. 1449-1454, 2000.
- VAN WEZEL, R.; LIU, H.; TIEN, P.; STANLEY, J.; HONG, Y. Gene C2 of the monopartite geminivirus *Tomato yellow leaf curl virus-China* encodes a pathogenicity determinant that is localized in the nucleus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 14, p. 1125-1128, 2001.
- VANITHARANI, R.; CHELLAPPAN, P.; PITA, J.S.; 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.; LEDERER, C.; BAULCOMBE, D.C. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell*, v. 103, p. 157-167, 2000.
- VOINNET, O.; PINTO, Y.M.; 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.; BISARO, D.M. Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Journal of Virology*, v. 79, p. 7410-7418, 2005.
- WANG, H.; HAO, L.H.; SHUNG, C.Y.; SUNTER, G.; BISARO, D.M. Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Plant Cell*, v. 15, p. 3020-3032, 2003.

- WEGE, C.; POHL, D. Abutilon mosaic virus DNA B component supports mechanical virus transmission, but does not counteract begomoviral phloem limitation in transgenic plants. *Virology*, v. 365, p. 173-186, 2007.
- ZERBINI, F.M.; ANDRADE, E.C.; BARROS, D.R.; FERREIRA, S.S.; LIMA, A.T.M.; ALFENAS, P.F.; MELLO, R.N. Traditional and novel strategies for geminivirus management in Brazil. *Australasian Plant Pathology*, v. 34, p. 475-480, 2005.
- ZERBINI, F.M.; ZAMBOLIM, E.M.; CARRIJO, I.V.; GILBERTSON, R.L. A new bipartite geminivirus infecting tomatoes in Minas Gerais, Brazil. *Phytopathology*, v. 86, p. S1, 1996.
- ZHANG, Z.; CHEN, H.; HUANG, X.; XIA, R.; ZHAO, Q.; LAI, J.; TENG, K.; LI, Y.; LIANG, L.; DU, Q.; ZHOU, X.; GUO, H.; XIE, Q. BSCTV C2 attenuates the degradation of SAMDC1 to suppress DNA methylation-mediated gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, v. 23, p. 273-288, 2011.