

DIRCE FERREIRA LUZ

**Natureza recombinante e propriedades patogênicas do
DNA-A do begomovírus ToCMV-[MG-Bt1]**

Tese 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
2003**

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

T

L979n
2003

Luz , Dirce Ferreira, 1978-

Natureza recombinante e propriedades patogênicas do
DNA-A do begomovírus ToCMV-[MG-Bt1] / Dirce
Ferreira Luz. – Viçosa : UFV, 2003
60p. : il.

Orientador: Márcia Rogéria de Almeida
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de

Viçosa

1. Begomovírus - Diversidade genética. 2. Begomovírus
- Análise de infectividade. 3. Begomovírus - Clonagem. 4.
Begomovírus - Biologia molecular. 5. ToCMV-[MG-Bt1]
(Tomato crumple mottle vírus). I. Universidade Federal
de Viçosa. II. Título.

CDD 19.ed. 574.88

CDD 20.ed. 574.88

DIRCE FERREIRA LUZ

**Natureza recombinante e propriedades patogênicas do
DNA-A do begomovírus ToCMV-[MG-Bt1]**

Tese 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: 26 de fevereiro de 2003.

Prof^ª. Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Conselheira)

Prof. Francisco Murilo Zerbini

Prof. Mauro Pires Moraes

Dra. Maria de Fátima Grossi de Sá

Prof^ª. Márcia Rogéria de Almeida
(Orientadora)

Ao meu querido pai Dely Gomes Luz “*in memoriam*”,
dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade, determinação e força de vontade que tive para que este trabalho fosse realizado.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) pelo apoio acadêmico, institucional e financeiro.

À professora Márcia Rogéria de Almeida, pelo apoio.

À professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes, pela orientação, pelas sugestões e pelo acompanhamento durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Maurílio A. Moreira e Sérgio Côrtes pelo incentivo, amizade e colaboração.

À todos os colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas pela colaboração na obtenção dos resultados.

À minha mãe Eulair, meus irmãos, Délio, Herculano, Marisi, Márcio, Dely e demais familiares pelo amor.

À Marcus Vinicius, pela compreensão e companheirismo proporcionados em todos os momentos.

À todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

DIRCE FERREIRA LUZ, filha de Dely Gomes Luz e Eulair Soares Ferreira, nasceu em 30 de março de 1978, em Janaúba - MG.

Em dezembro de 2000 graduou-se em Biologia-Licenciatura, pela Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros - MG.

Em março de 2001 ingressou-se no curso de Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, defendendo a dissertação em fevereiro de 2003.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Organização estrutural e funcional do genoma de Begomovírus	5
2.2 Replicação do DNA viral	12
2.3 Movimento do vírus na planta	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Análise filogenética de begomovírus que infectam tomateiros.....	19
3.2 Caracterização biológica do DNA-A de ToCMV-[MG-Bt1]	21
3.2.1 Material vegetal	21
3.2.2 Inoculação por biolística	21
3.2.3 Diagnóstico molecular.....	22
3.2.3.1 Material vegetal e extração de DNA	22
3.2.3.2 PCR	23

3.2.3.3 Análise de “Southern Blots”	23
3.3 Produção da proteína codificada pela ORF AC5 em sistema heterólogo de expressão	25
3.3.1 Amplificação por PCR da região codificadora do gene viral AC5 a partir do componente viral clonado ToCMV-A, estirpe [MG-Bt1]	25
3.3.2 Clonagem do gene AC5 no vetor de expressão PinPoint Xa-3	26
3.3.3 Expressão da proteína recombinante	26
3.3.4 Purificação da proteína recombinante e detecção por meio de “imunoblotting”	27
4. RESULTADOS	29
4.1 Análise filogenética e eventos de recombinação entre begomovírus que infectam tomateiros recentemente identificados no Brasil	29
4.2 Caracterização biológica de ToCMV-[MG-Bt1]-A	37
4.2.1 O componente A de ToCMV-[MG-Bt1] é capaz de infectar seu hospedeiro natural <i>Lycopersicon esculentum</i>	37
4.2.2 Gama de hospedeiro de ToCMV-[MG-Bt1]-A	41
4.3 Expressão heteróloga da proteína codificada pela ORF AC5 em bactérias	46
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	49
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

RESUMO

LUZ, Dirce Ferreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2003.
Natureza recombinante e propriedades patogênicas do DNA-A do begomovírus ToCMV-[MG-Bt1]. Orientadora: Márcia Rogéria de Almeida.
Conselheiros: Elizabeth Pacheco Batista Fontes e Maria Cristina Baracat Pereira.

Espécies do gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) encontradas no hemisfério ocidental tem tipicamente um genoma bissegmentado que consiste em dois componentes genômicos de 2,6 Kb, denominados DNA-A e DNA-B. Atualmente, a grande diversidade de begomovírus patogênicos identificados tem sido explicada pela alta frequência de eventos de recombinação. Relatos adicionais também tem evidenciado a importância dos eventos de recombinação inter-espécies na evolução dos begomovírus e na sua emergência como patógenos relevantes na agricultura. Utilizando-se um programa computacional para detecção de recombinação foram observados eventos de recombinação estatisticamente significantes entre as sequências completas do componente DNA-A de begomovírus que infectam tomateiros, recentemente identificados no Brasil. As progênies recombinantes exibiram diferentes propriedades biológicas e propriedades patológicas aumentadas quando comparadas com os seus prováveis predecessores. O

DNA-A de *Tomato chlorotic mottle virus* ToCMV-[MG-Bt1], de Minas Gerais, da região de Betim, identificado e clonado por nosso grupo, possui um genoma híbrido no qual o módulo compatível de replicação (ACI e a origem de replicação) foi provavelmente doado por ToCMV-[BA-Se1] e as sequências remanescentes parecem ter sido originadas de *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV). Apesar do alto grau de conservação de sequência com os seus predecessores, ToCMV-[MG-Bt1] difere significativamente nas suas propriedades biológicas. De fato, ToCMV-[MG-Bt1] infectou seu hospedeiro natural *Lycopersicon esculentum*, induziu sintomas atenuados e acumulou DNA viral nas folhas apicais na ausência de um DNA-B cognato. Foi caracterizada a patogenicidade deste DNA-A clonado e infeccioso através de uma gama de hospedeiros, e a efetividade foi avaliada via inclusão de um DNA-B compatível em ensaios de infectividade. O DNA-A de ToCMV-[MG-Bt1] sozinho é capaz de infectar sistematicamente e causar sintomas nos hospedeiros permissíveis *Nicotiana benthamiana*, *Chenopodium amaranticolor* e *Chenopodium quinoa*. Ele move-se sistematicamente em *Datura stramonium*, mas causa uma infecção assintomática. O acúmulo do DNA viral nas plantas infectadas foi confirmado por PCR. A inclusão de um componente B compatível nos ensaios de infectividade não alterou a sintomatologia das doenças mediadas pelo ToCMV-[MG-Bt1]-A, também não aumentou o nível do DNA-A nos hospedeiros permissíveis. Assim, os resultados deste trabalho forneceram evidências adicionais sobre os eventos de recombinação inter-espécies que podem desempenhar um papel significativo na diversidade dos geminivírus e na sua emergência como patógenos importantes na agricultura.

ABSTRACT

LUZ, Dirce Ferreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2003.
Recombinant nature and pathogenical properties of the begomovirus ToCMV-[MG-Bt1]-DNA-A. Adviser: Márcia Rogéria de Almeida. Committee members: Elizabeth Pacheco Batista Fontes and Maria Cristina Baracat Pereira.

Species of *Begomovirus* genus (*Geminiviridae* family) found in the Western Hemisphere typically have a bipartite genome that consists of two 2.6-kb DNA genomic components, DNA-A and DNA-B. A current consensus prediction for the extent of begomovirus diversity holds that a high frequency of recombination resulted in the recent emergence of highly pathogenic virus genotypes causing a variety of serious begomovirus diseases. We have provided further evidence for the importance of interspecies recombination in begomovirus evolution and emergence as agriculturally relevant pathogens. Using the Recombination Detection Program software, we detected statistically significant recombination events among full-length DNA-A component sequences of recently identified tomato-infecting begomovirus from Brazil. The recombinant progenies exhibited different biological and enhanced pathological properties as compared to their probable predecessors. The *Tomato*

chlorotic mottle virus ToCMV-[MG-Bt1] DNA-A, identified and cloned by our group, possesses a hybrid genome on which the replication compatible module (AC1 and replication origin) was likely donated by ToCMV-[BA-Se1] and the remaining sequences appear to have originated from *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV). Despite the high degree of sequence conservation with its predecessors, ToCMV-[MG-Bt1] differs significantly in its biological properties. In fact, ToCMV-[MG-Bt1] DNA-A infected its natural host *Lycopersicon esculentum*, induced mild symptoms and accumulated viral DNA in the apical leaves in the absence of a cognate DNA-B. We have further characterized the pathogenesis of this infectious cloned DNA-A by determining its host range properties and the effectiveness of inclusion of a compatible DNA-B component in the infectivity assays. ToCMV-[MG-Bt1] DNA-A is able to infect systemically and cause symptoms in the permissive hosts *Nicotiana benthamiana*, *Chenopodium amaranticolor* and *Chenopodium .quinoa*. It moves systemically in *Datura stramonium*, but causes an asymptomatic infection. The accumulation of viral DNA in the infected plants was confirmed by PCR. Inclusion of a compatible DNA-B component in the infectivity assay did not alter the symptomatology of ToCMV-[MG-Bt1] DNA-A-mediated disease, nor did it increase the DNA-A level in a permissive host. Our results further support the notion that interspecies recombination may play a significant role in geminivirus diversity and emergence as agriculturally important pathogens.

1. INTRODUÇÃO

Os geminivírus constituem um dos maiores e mais importantes grupos de vírus de plantas, causando grandes restrições à produtividade agrícola, particularmente em regiões tropicais e sub-tropicais (Simone *et al.*, 1990; Brown & Bird, 1992; Polston & Anderson, 1997; Moriones & Navas-Castillo, 2000). Doenças causadas por geminivírus tem se tornado uma grande ameaça à tomaticultura brasileira, devido a introdução de um novo biótipo da mosca-branca, *Bemisa tabaci*, que coloniza tomateiros com alta eficiência (Ribeiro *et al.*, 1998). Eventos de recombinação inter-espécies tem provavelmente contribuído significativamente para a diversidade das begomoviroses e na emergência de novos patógenos (Deng *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1997; Fondong *et al.*, 2000).

Os geminivírus estão incluídos na família *Geminiviridae*, sendo caracterizados por apresentarem uma estrutura morfológica única composta por capsídeos icosaedros geminados (Lazarowitz, 1992), empacotados com um genoma de DNA fita simples circular, que replica via um intermediário de DNA fita dupla no núcleo de células infectadas (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). Os membros da família *Geminiviridae* podem ser classificados em quatro gêneros - *Mastrevirus*, *Curtovirus*,

Topocuvirus e *Begomovirus* - de acordo com o inseto vetor, com o tipo de hospedeiro e com a organização genômica, podendo apresentar uma configuração de componente simples ou duplo (Rybicki, 1994; Padidam *et al.*, 1995; Rybicki *et al.*, 2000).

O maior gênero dessa família é o *Begomovirus*, que possui organização genômica mono ou bissegmentada. Este gênero infecta dicotiledôneas como o feijão e o tomate e possui a mosca-branca como inseto-vetor. Até o momento, os begomovírus identificados no hemisfério ocidental possuem genomas bissegmentados, todavia, no hemisfério oriental, além dos bissegmentados, também foram identificados begomovírus com um único componente genômico, como o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV, Kheyr-Pour *et al.*, 1991; Navot *et al.*, 1991), o *Tomato leaf curl virus* (ToLCV, Dry *et al.*, 1993), entre outros.

Os componentes genômicos dos begomovírus bissegmentados são denominados DNA-A e DNA-B, os quais são organizados em unidades de transcrição divergente, separadas por uma região intergênica (IR) de aproximadamente 200 pb, que contém a origem de replicação e dois promotores divergentes (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). O DNA-A é o responsável pela replicação e transcrição do DNA viral, enquanto que o DNA-B é o responsável pelo movimento do vírus na planta (Lazarowitz, 1992).

No componente A, estão localizados os genes *CP*, *Rep*, *TrAP*, *REn* e a ORF AC4, que codificam todas as informações necessárias para a replicação e encapsidação do DNA viral e, no componente B, se localizam os genes *MP* e *NSP*, que estão relacionados com a infecção sistêmica do hospedeiro. O gene *CP* - *AVI* codifica para a proteína capsidial CP (*coat protein*), sendo sua presença necessária para que haja a transmissão por insetos (Azzam *et al.*, 1994; Kallender *et al.*, 1988).

O gene *Rep - AC1* codifica para a proteína Rep (*replication associated protein*), sendo a única proteína requerida para a replicação do genoma viral (Elmer *et al.*, 1988; Fontes *et al.*, 1992, 1994a,b). O gene *TrAP - AC2* codifica a proteína TrAP (*trans-activating protein*), a qual funciona como um transativador da expressão dos genes *CP* e *NSP* (Sunter & Bisaro, 1991, 1992). O gene *REn - AC3* codifica a proteína REn (*replication enhancer protein*), que atua como um fator acessório na amplificação do DNA viral (Sunter *et al.*, 1990). Já no componente B, o gene *NSP - BVI* codifica a proteína NSP (*nuclear shuttle protein*), que facilita o movimento intracelular núcleo-citoplasma do genoma viral e o gene *MP - BCI* codifica a proteína MP (*movement protein*), que é a proteína clássica de movimento célula-célula (Sanderfoot & Lazarowitz, 1996).

Além de sua importância econômica, os geminivírus também são considerados modelos ideais para o estudo de replicação e expressão gênica em plantas, devido à sua simplicidade genômica, e ao fato de replicarem no núcleo da célula hospedeira via intermediário de DNA fita dupla. Além disso, o genoma viral não codifica DNA polimerase e RNA polimerase e, consequentemente, os geminivírus utilizam extensivamente a maquinaria de replicação e transcrição da célula hospedeira. Atualmente, as pesquisas com geminivírus visam principalmente à caracterização de fatores do hospedeiro que interagem com o vírus durante o processo infeccioso e fontes de resistência aos geminivírus, de forma a reduzir as perdas agronômicas por eles causadas.

Recentemente, um novo begomovírus que infecta tomateiros foi identificado na região de Betim-MG e seu componente genômico A foi clonado e sequenciado (Machado, 2000). A análise filogenética, com base na sequência de nucleotídeos, classificou o vírus como uma nova espécie do gênero *Begomovirus* designada *Tomato*

chlorotic mottle virus (ToCMV). O componente genômico clonado de ToCMV possui 2.625 nucleotídeos e uma organização genômica similar àquela do DNA-A de outros begomovírus, exceto pela presença de uma ORF adicional AC5 com a capacidade de codificar uma proteína de 250 resíduos de aminoácidos, deduzida da fita complementar de ToCMV. Embora a ORF AC5 tenha sido identificada no genoma de outros begomovírus como *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV) (Kheyr-Pour *et al.*, 2000), não se sabe se corresponde a um gene viral funcional.

O ToCMV-A, além de preencher os critérios moleculares para classificação taxonômica de uma nova espécie, apresentou diferenças biológicas significativas com relação a outras espécies relacionadas do gênero *Begomovirus*. Enquanto os begomovírus bissegmentados necessitam de seus dois componentes (A e B) para produzirem uma infecção sistêmica no hospedeiro, o componente A do ToCMV foi capaz de infectar sistematicamente *Nicotiana benthamiana* na ausência de seu componente B cognato. Entretanto, as propriedades patogênicas desse componente genômico clonado não foram avaliadas em seu hospedeiro natural (tomateiro) e tampouco em outras plantas indicadoras. Assim, o propósito primordial da presente investigação foi estender a caracterização biológica e molecular do begomovírus ToCMV. Os objetivos específicos consistiram em (1) avaliar filogeneticamente o genoma clonado de ToCMV (Machado, 2000) dentro do cenário atual dos geminivírus brasileiros identificados, verificando sua aparente natureza recombinante, (2) determinar a gama de hospedeiros do componente A do ToCMV e (3) induzir a expressão heteróloga da proteína AC5 em bactéria, com a finalidade de verificar se a referida ORF AC5 é capaz de produzir uma proteína funcional.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DO GENOMA DE BEGOMOVÍRUS

Os geminivírus pertencem a uma grande família de vírus que infectam plantas e são caracterizados por apresentarem um genoma constituído de uma ou duas moléculas de DNA circular fita simples (ssDNA) encapsidadas em partículas geminadas icosaédricas. O genoma viral replica no núcleo de células infectadas via intermediário de DNA fita dupla (dsDNA) (Van Regenmortel *et al.*, 2000). A forma de fita dupla do DNA se associa às histonas na forma de nucleossomos e é transcrita no núcleo das células de plantas infectadas, porém, não é empacotada em vírions. Contudo, tanto as partículas virais quanto o DNA viral genômico são localizados no núcleo das células infectadas (Rushing *et al.*, 1987).

Devido ao fato de se replicarem no núcleo da célula hospedeira via um intermediário de DNA de fita dupla, os geminivírus vem sendo intensamente utilizados como modelos em estudos de replicação de ácidos nucléicos em plantas. Como resultado, existe um grande acúmulo de informações sobre a replicação desse

grupo de vírus. Da mesma forma, alguns geminivírus vem sendo utilizados como modelos em estudos de movimento célula-célula e movimento a longa distância no hospedeiro.

Já foram totalmente sequenciados cerca de 151 espécies e/ou isolados da família *Geminiviridae*. A análise da seqüência desses geminivírus mostra que existe um nonanucleotídeo (TAATATTAC) conservado em todas as espécies, que se localiza na região intergênica de ambos os DNA-A e DNA-B. Esse nonanucleotídeo, também designado por elemento estruturalmente conservado (SCE), foi identificado como sendo a origem de replicação e também como o sítio de clivagem do DNA-A pela proteína de replicação do DNA viral (Rep).(Figura 1)

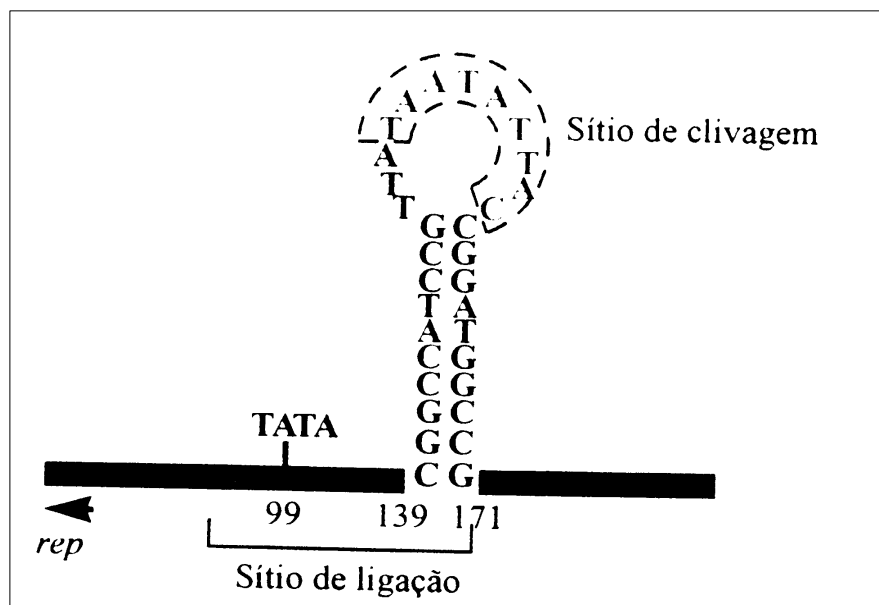


Figura 1 - Esquema da origem de replicação do BGMV. A seqüência comum a todos os geminivírus está indicada pelo semi-círculo pontilhado. O último A do nonanucleotídeo T*AC corresponde à base onde ocorre a clivagem do DNA para o início da replicação. Também está presente na origem de replicação de BGMV (*Bean golden mosaic virus*), o sítio de ligação da proteína viral Rep (Adaptado de Aragão *et al.*, 2000).

O SCE está localizado dentro de uma sequência conservada de 30 nucleotídeos, com o potencial para a formação de uma estrutura em forma de grampo, sendo que a manutenção conformacional dessa estrutura conservada é necessária para a função da origem de replicação (Orozco & Hanley-Bowdoin, 1996). A sequência 5'-TAATATTAC-3', flanqueada pelas sequências repetidas invertidas ricas em CG, representa a alça ("loop") da estrutura em forma de grampo tendo sido identificada como o sítio de início de replicação da fita positiva (Fontes *et al.*, 1994b; Laufs *et al.*, 1995; Heyraud-nitshck *et al.*, 1995 e Orozco *et al.*, 1998). Entretanto, a origem de replicação da fita negativa ainda não foi identificada.

A transcrição dos genes virais ocorre bidirecionalmente (Mullineaux *et al.*, 1993; Townsed *et al.*, 1985). A região comum, CR (nos geminivírus bissegmentados) ou região intergênica, IR (nos geminivírus monossegmentados) delimita duas unidades de transcrição divergentes, uma na fita senso e outra na fita complementar do genoma. Os genes presentes na fita senso (+) são denominados V, enquanto que aquelas presentes na fita complementar (-) são denominadas C (Hanley- Bowdoin *et al.*, 1999), podendo também ser denominadas de acordo com a sua função: gene AC1 ou Rep (*Replicatin associated protein*), gene AC2 ou TrAP (*Trans activating protein*), gene AC3 ou REn (*Replication enhancer protein*), gene BL1 ou MP (*Movement protein*) e gene BR1 ou NSP (*Nuclear shuttle protein*). Os RNAs resultantes da transcrição dos genes presentes no DNA viral são poliadenilados e iniciam-se acima da sequência consenso TATA ou de elementos iniciadores, o que indica que eles são transcritos pela RNA polimerase II do hospedeiro (Hanley- Bowdoin *et al.*, 1999).

A família *Geminiviridae* é dividida em quatro gêneros - *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus* e *Topocuvirus* - baseados na organização genômica, em análises filogenéticas, no tipo de hospedeiro e inseto vetor (Mayo & Pringle, 1998) (tabela 1).

Tabela 1- Classificação dos geminivírus

Gênero	Membro característico	Hospedeiro	Inseto vetor	Estrutura do genoma
<i>Begomovirus</i>	BGMV	Dicotiledôneas	mosca-branca	mono ou bissegmentado
<i>Mastrevirus</i>	MSV	Monocotiledôneas	cigarrinha	monossegmentado
<i>Curtovirus</i>	BCTV	Dicotiledôneas	cigarrinha	monossegmentado
<i>Topocuvirus</i>	TPCTV	Dicotiledôneas	cigarrinha	monossegmentado

Adaptado de Rybicki, 1994; Palmer & Rybicki, 1998; Timmermans *et al.*, 1994; Van Regenmortel *et al.*, 2000

A organização genômica dos begomovírus monossegmentados, como TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*), é representada por seis genes, quatro na fita complementar do genoma que codificam as proteínas envolvidas na replicação, transcrição e encapsidação do genoma viral, além de C4, relacionado com o desenvolvimento de sintomas sistêmicos (Jupin *et al.*, 1994 e Desbiez *et al.*, 1995), e dois genes na fita senso, envolvidos com o movimento intracelular e célula-a-célula do genoma viral. Segundo Chatchawankanphanich & Maxuell, 2002, na fita senso, o gene *CP* ou *VI* que codifica a proteína do capsídeo é parcialmente sobreposto ao gene *V2* que codifica uma proteína de 13-kDa. Os quatro genes da fita complementar são designados *C1* (que codifica para a proteína Rep, 40 kDa), *C2* (que codifica para a proteína TrAP, 15 kDa), *C3* (que codifica para a proteína REn, 15 kDa) e *C4* (que codifica para uma proteína de 11 kDa). A região intergênica - IR - está localizada entre o códon de início do gene *C1* e o gene *V2*. Na porção 5' da IR, que corresponde a uma região de 166 nucleotídeos, anterior a estrutura conservada de grampo, há uma

sequência ATCGGTGT que é repetida e representa o sítio de ligação da proteína Rep, localizado entre a sequência TATA e o códon de início do gene *CI*.

O genoma da grande maioria dos begomovírus bissegmentados está organizado de acordo com a Figura 2. O membro típico dos begomovírus bissegmentados é o BGMV (*Bean golden mosaic virus*). Os componentes genômicos, DNA-A e DNA-B, possuem tamanhos semelhantes, com cerca de 2.600 nucleotídeos, mas não apresentam homologia de sequência, exceto pela região comum (RC), com aproximadamente 200 nucleotídeos que é altamente conservada entre eles. Na RC, estão localizadas a origem de replicação e os promotores da síntese dos mRNAs virais (Lazarowitz *et al.*, 1992; Fontes *et al.*, 1994b). Ambos os componentes são necessários para a infecção viral nas plantas. O DNA-A está relacionado com os processos de replicação e encapsidação do genoma viral e o DNA-B codifica os genes envolvidos no movimento sistêmico do vírus na planta e desenvolvimento de sintomas (Stanley & Gay, 1983).

No DNA-A, o gene *AVI* ou *CP*, que codifica a proteína do capsídeo, é transcrito no sentido viral, e os genes *AC1*, que codifica a proteína Rep (proteína associada à replicação), *AC2*, que codifica a proteína TrAP (proteína de transativação) e *AC3*, que codifica a proteína Ren (ativadora da replicação), são transcritos no sentido complementar. Além disso, é também observado a presença da ORF *AC4* (transcrita no sentido complementar) que apresenta função diferenciada entre os geminivírus mono e bissegmentados. Nos monossegmentados, essa ORF está relacionada com o desenvolvimento de sintomas sistêmicos (Jupin *et al.*, 1994). Nos bissegmentados a função de *AC4* é desconhecida, mas sabe-se que mutações nessa ORF não resultam em qualquer alteração no fenótipo de plantas infectadas com o vírus mutante (Gröning *et al.*, 1994). Em alguns vírus emergentes, tais como

ToCMV (Galvão *et al*, 2003) e WmCSV (Kheyr-Pour *et al* 2000) e TRMV (*Tomato rugose mosaic virus*) é também verificada a presença de um novo gene *AC5*, codificado pelo DNA-A. A função do gene *AC5* complementar ao gene *AVI* localizado no sentido viral, ainda não foi elucidada. Já no DNA-B, o gene *BV1*, que codifica a proteína NSP (proteína de movimento núcleo-citoplasma), é transcrito no sentido viral, e o gene *BC1*, que codifica a proteína MP (proteína de movimento célula a célula) é transcrito no sentido complementar.

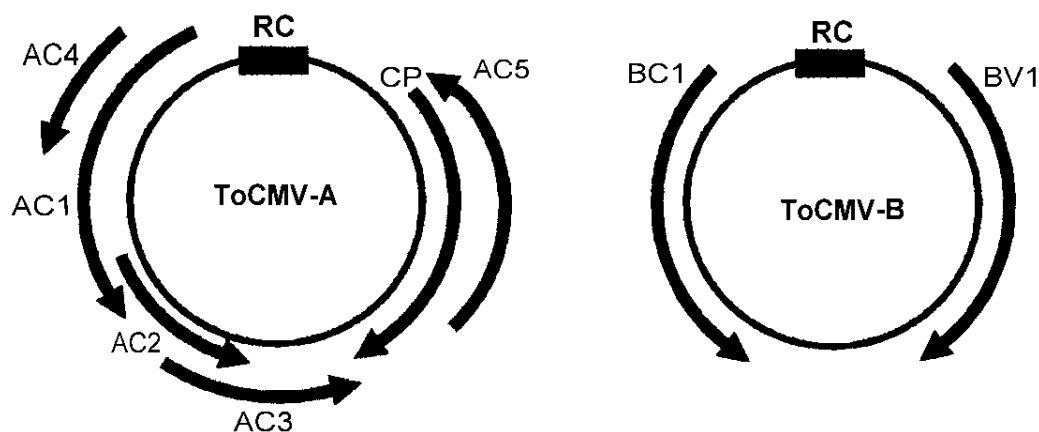


Figura 2 - Organização genômica do gênero *Begomovirus*. RC = região comum. Proteínas CP - capsídeo, “coat protein”; Rep - proteína associada à replicação, “replication associated protein”; TrAP - proteína de transativação, “Trans-activating protein”; REn - ativador de replicação, “replication enhancer protein”; AC4; AC5; MP - proteína de movimento célula-a-célula, “movement protein” e NSP - proteína de transporte, “nuclear shuttle protein”, adaptado de Machado, (2000).

A proteína do capsídeo (CP) está relacionada com vários processos durante o ciclo de vida do vírus. A primeira função é a encapsidação do ssDNA e formação de partículas virais que protegem o DNA viral durante a transmissão por insetos (Azzam *et al.*, 1994) ou transmissão mecânica (Frischmuth & Stanley, 1998). Todavia, observa-se que na propagação dos geminivírus por meio de inoculação mecânica, vírus mutantes incapazes de sintetizar a CP não são selecionados, mesmo

que a propagação ocorra em várias gerações sugerindo que a capa protéica provavelmente possui alguma função adicional que ainda não foi determinada (Faria *et al.*, 1994). A proteína associada a replicação (Rep) é a única proteína essencial para a replicação do genoma viral de ambos os DNA-A e DNA-B (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1990), devido a sua função de ligação e clivagem do sítio de iniciação da replicação viral que permite o reconhecimento seletivo da origem de replicação do vírus (Fontes *et. al.*, 1992:1994a 1994b). Ela não possui, entretanto, atividade de DNA polimerase. Dessa forma, não é considerada uma replicase, mas sim, uma enzima associada à replicação do DNA (Laufs *et al.*, 1995). A proteína de transativação (TrAP) é um transativador necessário para a expressão dos genes de sentido viral *AVIe BVI* (Sunter & Bisaro, 1991).

A proteína ativadora da transcrição (Ren), embora seu mecanismo de atuação ainda não esteja elucidado, está possivelmente relacionada com a estabilidade do sistema de replicação, já que o acúmulo do DNA viral torna-se mais elevado na presença desta proteína (Sunter *et al.*, 1990). A proteína AC4 não possui função definida, mas foi sugerido que o seu papel durante a infecção viral, seja atuar como um regulador transcricional (Gröning *et al.*, 1994). A proteína AC5 não foi caracterizada funcionalmente. A proteína de transporte (NSP) realiza o transporte do DNA através do envelope nuclear, enquanto que a proteína de movimento (MP), realiza as funções de movimento célula-a-célula, aumentando o limite de exclusão dos plasmodesmas (Sanderfoot *et al.*, 1996; Noueir *et al.*, 1994).

2.2 REPLICAÇÃO DO DNA VIRAL

O processo de replicação de todos os membros da família *Geminiviridae* ocorre no núcleo das células infectadas, onde o ssDNA é convertido em dsDNA intermediário, também denominado de RF (forma replicativa). A RF serve como molde para síntese de novos ssDNA e para mRNA virais. Pouco se sabe sobre a síntese da fita complementar e conversão do genoma do vírion em DNA fita dupla, mas todas as evidências indicam que ela é realizada por fatores do hospedeiro, não contando, portanto, com a participação de nenhum produto viral (Palmer & Rybicki, 1998). Nos mastrevírus foi identificado um oligonucleotídeo encapsidado em associação com o DNA viral, apresentando maior homologia com a região intergênica viral. Esse oligonucleotídeo não foi encontrado para begomovírus e curtovírus (Donson *et al.*, 1984).

A proteína Rep é a única proteína viral absolutamente requerida para a replicação do vírus. Em begomovírus, Rep é uma proteína codificada pelo gene *ACI*. Já em mastrevírus, é expressa a partir de um mRNA processado, dando origem a dois produtos (repA e repB). Já em topocuvírus e curtovírus, na fita complementar, o gene *CI* codifica para a proteína Rep.

Muitas atividades bioquímicas têm sido demonstradas para a proteína Rep, incluindo propriedades de ligações específicas à ssDNA e dsDNA (Fontes *et al.*, 1992), clivagem e ligação do DNA em seqüências específicas (Laufs *et al.*, 1995), hidrólise de ATP, e iniciadora do mecanismo de replicação por círculo rolante (RCR). A proteína Rep não tem homologia com nenhuma DNA polimerase conhecida e de fato todas as evidências indicam que ela não tem atividade de DNA polimerase, a qual seria proporcionada por enzimas do hospedeiro (Laufs *et al.*, 1995).

Nos modelos sugeridos na literatura, Rep reconhece uma sequência na região 5' da estrutura em forma de grampo, SCE (elemento estruturalmente conservado), localizado na região intergênica ou região comum, a qual se liga com alta afinidade e especificidade (Fontes *et al.*, 1994 a, b) alcançando então, o sítio de clivagem (TAATATTAC) com o auxílio da proteína Ren, com a qual provavelmente se oligomeriza parecendo estabilizar os complexos entre Rep e os fatores do hospedeiro (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). A proteína Rep exibe atividade de endonuclease sequência-específica e hidrolisa o nonanucleotídeo (5' TAATATT A⁽⁺¹⁾C 3') na posição indicada para o início de replicação do genoma viral. (Laufs *et al.*, 1995). Desse modo, a fita senso é estendida a partir da extremidade 3'-OH livre, reconhecida como "primer" pela maquinaria replicativa da célula e uma atividade de helicase parece ser requerida para o deslocamento da fita senso clivada. Assim, a DNA polimerase sintetiza uma nova fita vírion, sendo covalentemente ligada a si mesma, pela ação da própria Rep, dando origem a um novo genoma do vírion (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). Este mecanismo de replicação do genoma viral, denominado mecanismo de replicação por círculo rolante, pode ser dividido em três etapas: a) conversão de ssDNA viral em dsDNA (RF); b) síntese de uma molécula de ssDNA linear de sentido viral, contendo várias unidades genômicas (multímero ou contâmero), usando como molde a fita complementar da RF; e c) clivagem e re-ligação das unidades genômicas do multímero, gerando moléculas circulares de ssDNA correspondentes ao genoma viral (Laufs *et al.*, 1995; Timmermans *et al.*, 1994).

Por causa de sua limitada capacidade codificante, os geminivírus fornecem apenas os fatores requeridos para iniciar a replicação por círculo rolante e usam a DNA polimerase da planta para amplificar seus genomas (Egelkorout *et al.*, 2001).

Assim, é necessário que as células infectadas por geminivírus estejam sintetizando DNA, caso contrário, as enzimas responsáveis pela síntese não estarão presentes em concentrações suficientes para permitir a replicação dos vírus. Entretanto, os geminivírus replicam seu genoma em células diferenciadas (Coelho *et al.*, 1992; Nagar *et al.*, 1995; Lucy *et al.*, 1996). Como consequência, esses vírus precisam induzir a síntese de enzimas hospedeiras (responsáveis pela síntese da RF (forma replicativa) e de novas fitas de ssDNA de sentido viral), antes da replicação (Nagar *et al.*, 1995). Com isso, o processo de replicação de geminivírus contribui para o estudo dos mecanismos que mediam e regulam a replicação do DNA e o ciclo celular em plantas (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999).

Há evidências de que o TGMV ((*Tomato golden mosaic virus*) altera o controle do ciclo celular na planta hospedeira *Nicotiana benthamiana*. Uma grande fração das células infectadas por TGMV contém a cromatina condensada, o que é característico da prófase mitótica (Bass *et al.*, 2000). Células não infectadas, imediatamente adjacentes às células positivas ao DNA viral, não mostraram sinais de reentrarem no ciclo celular, demonstrando que o TGMV age de maneira autônoma na célula para reprogramar o seu hospedeiro. Tem sido proposto que TGMV altera o controle do ciclo celular em plantas por meio de ligações das proteínas codificadas pelos genes *AC1* (Rep) e *AC3* (Ren) à retinoblastoma (pRB) (Settlage *et al.*, 2000). Essas interações podem evitar a fosforilação da retinoblastoma que é um requerimento para as células reentrarem no ciclo celular durante a infecção por geminivírus. Experimentos recentes mostram que TGMV é confinado às células vasculares quando a ligação de Rep/pRB/Ren é comprometida.

Em plantas infectadas, as partículas virais geralmente acumulam-se no núcleo, formando agregados irregulares ou arranjos hexagonais cristalinos (Davies &

Stanley, 1989). As infecções, de um modo geral, resultam em alterações ultraestruturais no núcleo, que podem ser reflexo da alteração do sistema de transcrição normal do hospedeiro para o sistema de transcrição viral. Tais alterações incluem, por exemplo, o reposicionamento da cromatina e hipertrofia do nucléolo segregando para regiões granulares e fibrilares, além de formação de anéis fibrilares (Kim *et al.*, 1978).

2.3 MOVIMENTO DO VÍRUS NA PLANTA

Para que a infecção causada por um vírus de plantas seja produtiva, é necessário que o vírus se mova da célula inoculada e se espalhe sistematicamente pela planta. Isso depende não só de sua habilidade em replicar seu genoma, mas também de sua capacidade de mover célula-célula a partir do local de inoculação alcançando o sistema vascular e atingindo novos tecidos não infectados.

O movimento no interior de seu hospedeiro pode ser dividido em dois processos: a) movimento célula-célula, normalmente via plasmodesmas, que envolve o movimento célula-célula do vírion; b) movimento a longa distância, onde o vírus atinge o sistema vascular, normalmente o floema e é transportado para partes distantes da planta hospedeira como parte do fluxo de fotoassimilados (Lucas & Gilbertson, 1994).

Qualquer vírus de plantas deve atravessar a parede celular para se propagar sistematicamente. Para atravessar a parede celular, esses vírus codificam proteínas de movimento (MPs), que são requeridas para a infecção sistêmica no hospedeiro. Por sua vez, as MPs não são estruturais e não estão envolvidas na replicação e encapsidação do DNA viral.

Os geminivírus replicam no núcleo das células infectadas, onde são retidas todas as formas de DNA viral replicado, então, além da parede celular, o envelope nuclear também representa uma barreira para o movimento. Esses vírus necessitam de uma etapa adicional de transporte para efetivar a sua entrada e saída do núcleo celular (Palmer & Rybicki, 1998). Para isso, os geminivírus codificam duas proteínas de movimento, MP e Nsp que atuam de maneira cooperativa para facilitar o movimento célula-a-célula.

Tem sido demonstrado que a proteína de movimento MP (*movement protein*, também denominada BC1) associa-se à membrana celular e altera a arquitetura dos plasmodesmas, facilitando o transporte de genomas virais associados às proteínas ou até mesmo empacotados na forma de vírions (Norueiry *et al.*, 1994). A proteína Nsp (*nuclear shuttle protein*, também denominada BV1) transporta o DNA viral do núcleo para o citoplasma e vice-versa.

Em begomovírus, a proteína Nsp transportara o DNA viral através dos poros da membrana nuclear utilizando as vias normais de exportação/importação usadas por proteínas celulares, RNAs e ribonucleoproteínas. Em seguida, a proteína MP realiza o transporte do DNA viral para as células adjacentes via plasmodesmas. Ainda não é claro se o transporte intercelular e nucleocitoplasmático do DNA viral é na forma de ssDNA ou dsDNA (Pascal *et al.*, 1994). A proteína Nsp (~27 kDa) de SqLCV (*Squash leaf curl virus*) realiza o tráfico de ssDNA e dsDNA do núcleo para o citoplasma, tem sido localizada no núcleo de células infectadas, interagindo especificamente com o ssDNA. A proteína MP (~30 kDa) aumenta o limite de exclusão dos plasmodesmas e potencializa o movimento de dsDNA célula-a-célula (Norueiry *et al.*, 1994). Estudos indicam que a proteína NSP de BDMV (*Bean dwarf*

mosaic virus) tem afinidade com as duas formas de DNA ssDNA e dsDNA (Rojas *et al.*, 1998).

O requerimento da proteína capsidial (CP) é de fundamental importância para o movimento dos vírus pertencentes aos gêneros *Mastrevirus* e *Curtovirus* (Unsold *et al.*, 2001), uma vez que eles são limitados ao floema e dependem especificamente do fluxo de fotoassimilados para causarem infecção sistêmica no hospedeiro. Há exceção apenas do CSMV (*Chloris striate mosaic virus*) e MSV (*Maize streak virus*) os quais foram encontrados em células do mesófilo.

Begomovírus são encontrados em muitos tipos de células, incluindo córtex, mesófilo e epiderme (Timmermans *et al.*, 1994). As formas encapsidadas estão envolvidas na dispersão a longa distância de begomovírus monossegmentados. Em alguns casos, sugere-se que o movimento sistêmico do DNA-A na ausência do DNA-B pode ser mediado por vírions (Palmer & Ribicki, 1998). Já nos begomovírus bissegmentados, tanto MP quanto NSP fazem o reconhecimento do DNA viral de maneira específica em sua forma e comprimento, não sendo necessária a proteína capsidial para realizar esta função de movimento (Rojas *et al.*, 1998).

A CP de todos os geminivírus está envolvida em vários processos durante o ciclo de vida do vírus (Unsold *et al.*, 2001). A sua função predominante é a encapsidação do ssDNA e formação de partículas virais protegidas durante a transmissão pelo inseto vetor (Azzam *et al.*, 1994) ou transmissão mecânica (Frischmuth & Stanley, 1998).

A CP de geminivírus monossegmentados é absolutamente essencial para o movimento do vírus (Boulton *et al.*, 1989; Lazarowitz *et al.*, 1989; Briddon *et al.*, 1989), contudo, a CP de geminivírus bissegmentados é dispensável para infecção sistêmica de algumas espécies de plantas hospedeiras, indicando um envolvimento da

CP de begomovírus com a especificidade do hospedeiro (Stanley & Townsed, 1986; Gardiner *et al.*, 1988; Pooma *et al.*, 1996). Em begomovírus bissegmentados, mutações na CP reduziram o acúmulo de ssDNA, em níveis ainda detectáveis (Jeffrey *et al.*, 1996). Ainda não está claro se o acúmulo de ssDNA é mediado simplesmente pelo fato de a CP se ligar ao ssDNA e o encapsidar, ou se há uma regulação gênica específica que interrompe a replicação do dsDNA para produzir ssDNA (Palmer & Ribicki, 1998). Mutantes da CP de TGMV foram capazes de infectar sistematicamente *Nicotiana benthamiana* (um hospedeiro em que o vírus é bem adaptado), mas em *Nicotiana tabacum* ou *Datura stramonium* os sintomas ficaram restritos às folhas inoculadas. Assim também, mutantes de CP de BGMV foram capazes de infectar sistematicamente *Phaseolus vulgaris* (hospedeiro em que o vírus é bem adaptado), mas não foram capazes de infectar sistematicamente *Nicotiana benthamiana*. Isso sugere que a CP é intimamente relacionada com o grau de adaptação do vírus com o hospedeiro e é requerida para o movimento sistêmico nas relações de pouca adaptação entre o vírus e o hospedeiro (Pooma *et al.*, 1996, Faria & Zerbini, 2000).

Em mastrevírus e curtovírus, as proteínas CP e MP interagem especificamente, realizando funções equivalentes à MP e NSP de begomovírus bissegmentados (Liu *et al.*, 1999; Kotlizky *et al.*, 2000). Assim, a CP liga ao ssDNA, transporta o DNA viral através da membrana nuclear e interage com a MP para mediar o movimento do complexo CP-ssDNA célula-célula via plasmodesmas (Palmer & Ribicki, 1998).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas - BIOAGRO, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. Inicialmente, foi construída uma árvore filogenética baseada na sequência de ToCMV e a natureza recombinante desse componente viral foi avaliada utilizando o “Recombination Detection Program”. Posteriormente, foram conduzidos dois experimentos, sendo um deles visando determinar a infectividade do novo vírus ToCMV-[MG-Bt1]-A em plantas indicadoras e o outro visando expressar o gene viral AC5 em bactérias e purificar a proteína recombinante, com a finalidade de produzir anticorpos.

3.1 Análise filogenética de begomovírus que infectam tomateiros

As análises filogenéticas foram conduzidas em matrizes de sequências alinhadas usando a opção “neighbor-joining and bootstrap” (1000 replicações) do “software DNAMAN 3.0”. As fontes e os números de acesso ao “GenBank” de sequências do DNA-A de geminivirus usadas são fornecidas na Tabela 2. O programa utilizado para identificar os eventos de recombinação está disponível no site <http://www.uct.ac.za/depts/microbiology/microdescription.htm>.

Tabela 2- Nomes de vírus e números de acesso as sequências genômicas

Abreviação	Nome do vírus	Número de acesso
AbMV	<i>Abutilon mosaic virus</i>	X15983
ACMV-[CM]	<i>African cassava mosaic virus-[Cameroon]</i>	AF112352
AYVV	<i>Ageratum yellow vein virus</i>	X74516
BCaMV	<i>Bean calico mosaic virus</i>	AF110189
BDMV	<i>Bean dwarf mosaic virus</i>	M88179
BGMV-[BZ]	<i>Bean golden mosaic virus-[Brazil]</i>	M88686
BGYMV-[GT]	<i>Bean golden yellow mosaic virus-[Guatemala]</i>	M91604
CaLCuV	<i>Cabbage leaf curl virus</i>	U65529
CLCuMV-[26]	<i>Cotton leaf curl Multan virus-[26]</i>	AJ002458
EACMV-CM	<i>East african cassava mosaic virus-Cameroon</i>	AF112354
HYVMV	<i>Honeysuckle yellow vein mosaic virus</i>	AB020781
ICMV	<i>Indian cassava mosaic virus</i>	Z24758
OYVMV-[201]	<i>Okra yellow vein Faisalabad virus- [201]</i>	AJ002451
PaLCuV	<i>Papaya leaf curl virus</i>	Y15934
PHYVV	<i>Pepper huasteco yellow vein virus</i>	X70418
PYMV-PA	<i>Potato yellow mosaic virus-Panama</i>	Y15034
SiGMCRV	<i>Sida golden mosaic Costa Rica virus</i>	X99550
SiGMFV	<i>Sida golden mosaic Florida virus</i>	AF049336
SiGMHNV	<i>Sida golden mosaic Honduras virus</i>	Y11097
SYMV	<i>Sida yellow mosaic virus</i>	AY090558
SiMoV	<i>Sida mottle virus</i>	AY090555
SLCV	<i>Squash leaf curl virus</i>	M38183
TbLCCNV	<i>Tobacco leaf curl China virus</i>	AF240675
TGMV-YV	<i>Tomato golden mosaic virus - Yellow vein</i>	K02029
ToLCrV-[IC]	<i>Tomato leaf crumple virus-[IC]</i>	AF101476
ToCMV-[BA-Se1]	<i>Tomato chlorotic mottle virus-[BA-Se1]</i>	AF490004
ToCMV-[MG-Bt1]	<i>Tomato chlorotic mottle virus-[MG-Bt1]</i>	AY090557
ToLCBDV	<i>Tomato leaf curl Bangladesh virus</i>	AF188481
ToLCBV	<i>Tomato leaf curl Bangalore virus</i>	Z48182
ToLCLV	<i>Tomato leaf curl Laos virus</i>	AF195782
ToLCNDV-Mld	<i>Tomato leaf curl New Delhi virus-Mild</i>	U15016
ToLCTWV	<i>Tomato leaf curl Taiwan virus</i>	U88692
ToLCV	<i>Tomato leaf curl virus</i>	S53251
ToMHV	<i>Tomato mosaic Havana virus</i>	Y14874
ToMoTV	<i>Tomato mottle Taino virus</i>	AF012300
ToMoV	<i>Tomato mottle virus</i>	L14460
ToRMV-[Ub1]	<i>Tomato rugose mosaic virus-[Uberlândia]</i>	AF291705
ToSRV	<i>Tomato severe rugose virus</i>	AY029750
TYLCV	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	X15656
TYLCSV	<i>Tomato yellow leaf curl Sardinia virus</i>	X61153
TYLCV-[PT]	<i>Tomato yellow leaf curl virus-[Portugal]</i>	AF105975
TYLCV-[IR]	<i>Tomato yellow leaf curl virus-[Iran]</i>	AJ132711
TYLCTHV-[2]	<i>Tomato yellow leaf curl Thailand virus-[2]</i>	AF141922
WmCSV	<i>Watermelon chlorotic stunt virus</i>	AJ245652

3.2 Caracterização biológica do DNA-A de ToCMV-[MG-Bt1]

3.2.1 Material vegetal

Com o objetivo de caracterizar biologicamente o ToCMV-A, plantas indicadoras comumente utilizadas em Virologia Vegetal, além de plantas específicas para o vírus em questão, foram utilizadas em ensaios de infectividade. Plantas pertencentes às famílias Cucurbitaceae, Solanaceae, Leguminosae e Chenopodiaceae, incluindo *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana clevelandii*, *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium amaranticolor*, *Datura stramonium*, *Euphorbia eteria* e *Lycopersicon esculentum* foram testadas quanto à sua capacidade de atuarem como hospedeiras do vírus, observando a presença de sintomas, a presença de infecção latente e, se os sintomas induzidos pelo vírus foram do tipo local ou sistêmico.

3.2.2 Inoculação por biobalística

Nos ensaios de infectividade foram utilizados como fonte de inóculo o DNA dos clones pUFV 393 e pUFV 398, além dos controles pTG 1.3A e pTG 1.4B, descritos na Tabela 3.

O DNA plasmidial dos clones pUFV 393, pUFV 398, pTG 1.3A (Bisaro *et al.*, 1982) e pTG 1.4B (Hamilton *et al.*, 1983) foram isolados utilizando-se o “Plasmid Midi Kit” (QIAGEN), conforme recomendações do fabricante. A integridade do DNA foi avaliada em gel de agarose 1% (p/v) e a concentração determinada por espectrofotometria. Para os ensaios de biobalística, aproximadamente 10 µg de DNA dos clones pUFV393 (TCrLYV-B) (Galvão *et al.*,

2003), pUFV398 (ToCMV-A), bem como as combinações de TGMV-A e TGMV-B foram precipitados em micropartículas de tungstênio na presença de CaCl₂ 1 M, espermidina 13 mM e etanol 70% (v/v) e depositadas em três membranas carreadoras. Em seguida, estas membranas foram colocadas no acelerador de partículas, e foram aceleradas a 550 psi contra as plantas indicadoras. Um dia após o bombardeamento, as plantas foram transplantadas para vasos, transferidas para casa de vegetação e observadas quanto ao aparecimento de sintomas típicos de infecção viral.

As amostras foram coletadas e submetidas a testes de PCR, com a finalidade de se confirmar a presença de geminivírus.

Tabela 3 - Clones utilizados no ensaio biológico

Clone	Descrição	Vírus de origem
pTG1.3A	1,3 Cópias do componente A de TGMV entre duas origens de replicação	TGMV-A
pTG1.4B	1,4 Cópias do componente B de TGMV entre duas origens de replicação	TGMV-B
pUFV393	1,34 Cópias do componente B de TCrLYV entre duas origens de replicação	TCrLYV-B
pUFV398	1,45 Cópias do componente A de ToCMV entre seqüências idênticas do gene AC1	ToCMV-A

3.2.3 Diagnóstico molecular

3.2.3.1 Material vegetal e extração de DNA

Folhas jovens sadias e folhas infectadas de todas as plantas indicadoras utilizadas neste experimento foram coletadas, congeladas e conservadas a -80°C até o uso. O DNA viral de cada uma das amostras foi extraído segundo o método de DELLAPORTA *et al.* (1983).

3.2.3.2 PCR

Para confirmar a presença de geminivírus nas plantas sintomáticas, o DNA obtido foi usado como molde em reações de PCR utilizando oligonucleotídeos degenerados, que amplificam fragmentos específicos dos componentes A e B de geminivírus, descritos na Tabela 4 (Rojas et al., 1993). As reações de amplificação foram conduzidas em um termociclador MJ RESEARCH Peltier Thermal Cycler 200 com incubação inicial de 1 minuto a 94°C, seguido por 30 ciclos consecutivos de 94°C por 45 segundos para desnaturação, 45°C por 1 minuto para anelamento e extensão por 1 minuto a 72°C. Após os ciclos, as reações foram submetidas a um período adicional de polimerização de 10 minutos a 72°C. Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1% (p/v) e corado com brometo de etídeo 0,1 µg/mL.

Tabela 4 - Oligonucleotídeos degenerados para o componente A ou B

Oligonucleotídeo	Seqüência	Região amplificada	Tamanho esperado do fragmento amplificado
PAL1v1978	5'GCAT <u>CTGCAGG</u> CCCACTYGTCTTYCCNGT3'	Parte de AR1, a região comum e uma parte de AL1	+/- 1,1Kb
PAR1c496	5'AATA <u>CTGCAGG</u> GCTTYCTRTRACATRGG3'		
PCR1	5'CTAG <u>CTGCAGC</u> CATATTTACRARWATGCCA3'	Parte de BL1 até o primeiro nucleotídeo da região comum	+/- 0,6Kb
PBL1v2040	5'GCCT <u>CTGCAGC</u> CARTGTRGGRTCKATCTTCATACA3'		

* As regiões sublinhadas correspondem ao sítio da endonuclease da restrição PstI. Os oligonucleotídeos nas posições degeneradas são representados por uma única letra do código da ambigüidade da IUPAC: R=A, G; W=A, T; K=G, T; Y=C, T; e N=A, C, G, T

3.2.3.3 Análise de “Southern Blot”

Sondas específicas para o componente A e B de geminivírus foram preparadas a partir dos plasmídeos pUFV393 (TCrLYV-B) e pUFV398 (ToCMV-A) (Tabela 3). O plasmídeo pUFV393 foi digerido com *EcoRI* e *BamHI*, e o plasmídeo

pUFV398 foi digerido com *EcoRI* e *SacI*. Os fragmentos de 1,6 Kb de pUFV393 e de 1,7 Kb de pUFV398 foram purificados do gel de agarose 1% (p/v) pelo “Kit Prep-A-Gene” (BIORAD). Os fragmentos virais purificados foram então marcados com flúor-12-UTP (Stratagene), usando a técnica de marcação por oligonucleotídeos iniciadores aleatórios e extensão da cadeia pelo fragmento Klenow da DNA polimerase I de *Escherichia coli*, conforme recomendado pelo fabricante.

Os DNAs plasmidiais pUFV393 e pUFV398 foram utilizados como controles, além do DNA de *Nicotiana benthamiana* (planta sadia) digerido com *SacI*. Aproximadamente 10 µg de DNA total de *N. benthamiana* infectada com ToCMV-A foram digeridos com *SacI* e 10 µg de DNA de *N. benthamiana* infectada com a construção ToCMV-A e TCrLYV-B foram digeridas com *SacI* e *EcoRI* e separadas por eletroforese em gel de agarose 0,5% (p/v).

Após a eletroforese, o gel foi tratado sucessivamente com solução de depuração (HCl 0,25 M) por 15 minutos, com solução de denaturação (NaCl 1,5 M e NaOH 0,5 M) por duas vezes durante trinta minutos e com solução de neutralização (Tris-HC 0,5 M, NaCl 3 M) por duas vezes durante trinta minutos (Sambrook *et al.*, 1989). Em seguida, o DNA foi transferido por capilaridade para membrana de náilon em tampão SSC 10X (NaCl 3 M e Na₃C₆H₅O₇ 3,3 M) por no mínimo 12 horas.

A membrana foi pré-hibridizada a 60 °C em 30 mL de SSC 6X, Denhardt's 10X (Sambrook *et al.*, 1989), SDS 1% (p/v), NaPPi 2% (p/v) e 1,2 mg de ssDNA por 12 horas. A reação de hibridização também foi conduzida a 60 °C, por 24 horas, em 20 mL de SSC 3X, Denhardt's 5X, SDS 1% (p/v), NaPPi 0,2% (p/v), EDTA 0,002 M, Tris-HCl 0,02 M (pH 7,5) e 0,8 mg de ssDNA, contendo 50 ng de sonda marcada. Após a hibridização, a membrana foi lavada duas vezes por trinta minutos a 60 °C com a solução de SSC 1X, SDS 0,1% (p/v) e pirofosfato de sódio 0,2 % (p/v) e mais

duas vezes com solução de SSC 0,1X, SDS 0,1% (p/v) e pirofosfato de sódio 0,2% (p/v). Os sinais de hibridização foram visualizados mediante o uso do sistema de detecção não-radioativo da Stratagene, de acordo com as recomendações do fabricante.

3.3 Produção da proteína codificada pela ORF AC5 em sistema heterólogo de expressão

3.3.1 Amplificação por PCR da região codificadora do gene viral AC5 a partir do componente viral clonado ToCMV-A, estirpe [MG-Bt1]

O gene AC5 foi amplificado a partir do DNA de pUFV290, que contém o componente A de ToCMV-[MG-Bt1] clonado no vetor pUC118, com os oligonucleotídeos específicos AL5p290F465 - 5`CAGTTTGGGATCCGCTCTTTTGGG3` (posição 35 a 56) e AL5p290R1289- 5`CGTTCTCCATATGATTCTCGTAC3`, (coordenadas 836 a 858) de ToCMV. As reações de amplificação foram conduzidas em um termociclador MJ RESEARCH Peltier Thermal Cycler 200 com incubação inicial de 1 minuto a 94°C, seguido por 30 ciclos consecutivos de 94°C por 45 segundos para desnaturação, 50°C por 1 minuto para anelamento e extensão por minuto a 72°C. Após os ciclos, as reações foram submetidas a um período adicional de polimerização de 10 minutos a 72°C. O produto da reação foi analisado em gel de agarose 1% (p/v) e corados com brometo de etídeo 0,1 µg/mL.

3.3.2 Clonagem do gene AC5 no Vetor de Expressão PinPoint Xa-3

O fragmento amplificado de aproximadamente 750 pb obtido na reação de PCR, descrita acima, foi purificado do gel de agarose 1% (p/v) pelo “Kit Prep-A-Gene” (BIORAD), digerido com a enzima de restrição *HincII* (615 pb) e clonado no vetor PinPoint™ Xa-3 (PROMEGA), previamente digerido com a enzima *EcoRV* e defosforilado.

A reação de ligação do fragmento amplificado ao vetor PinPoint™ Xa-3 foi conduzida na proporção de 3:1 do fragmento a ser clonado e o vetor, respectivamente, em um volume de 20 µL, na presença de 0,5 U da enzima T4 DNA ligase (GIBCO/BRL), Tris-HCl 50 mM (pH 7,6), MgCl₂ 10 mM, ATP 1 mM, DTT 1 mM e 5% (p/v) de polietilenoglicol 8000. A mistura incubada a 4°C por 16 horas.

O produto da reação de ligação foi utilizado para transformação de 200 µL de células competentes de *Escherichia coli*, estirpe BL21 (DE3) (NOVAGEN), preparadas como descrito por Sambrook *et al.* (1989). A mistura foi mantida à 0°C por 30 minutos. Após um choque térmico de 1 minuto a 42°C, foi adicionado 1 mL de meio LB (Luria Broth base - SIGMA) e a mistura foi incubada a 37°C por 1 hora. Em seguida, as células foram sedimentadas por centrifugação, ressuspensas em 100 µL de meio LB e distribuídas em placa de Petri com meio LB, contendo o antibiótico ampicilina (100 µg/mL), para seleção das colônias transformantes. Dentre os transformantes, o recombinante positivo foi identificado pelo tamanho do inserto e denominado pUFV481.

3.3.3 Expressão da proteína recombinante

Inicialmente, três colônias individuais transformadas com pUFV481, com o vetor PinPoint™ Xa-controle ou com o vetor PinPoint™ Xa-3 foram transferidas

para 3 mL de meio LB, contendo biotina 2 M e ampicilina 100 g/ml, e crescidas a 37°C, durante 12-16 horas a 180 rpm. Após este período de incubação, 500 L de cultura foram utilizados para inocular 50 mL de LB contendo biotina 2 M e ampicilina 100 g/mL e incubadas a 37°C, durante 1 hora a 180 rpm.

Para a indução da proteína recombinante, foi utilizado IPTG 1 mM em todas as culturas, as quais foram, posteriormente, incubadas a 37°C durante 5 horas a 180 rpm. Após este período de incubação, as células foram centrifugadas a 14.000 x g por 5 minutos e lisadas com 4 mL do tampão da amostra [Tris-HCl 15 mM (pH6,8), SDS 2% (p/v), β-mercaptoetanol 5% (v/v), glicerol 20% (v/v) e azul de bromofenol 0,0025% (p/v)] a 95°C por 5 minutos. A expressão da proteína recombinante foi avaliada por meio de “imunoblottings” - usando o sistema conjugado estreptavidina fosfatase-alcálica.

3.3.4 Purificação da proteína recombinante e detecção por meio de “imunoblotting”

A purificação da proteína recombinante foi conduzida a partir de extratos protéicos de culturas de bactéria transformada com pUFV481 e induzidas em larga escala como descrito anteriormente, seguido por cromatografia de afinidade em resinas SoftLink™ (PROMEGA) - com capacidade de ligação de 20-40 nmoles de proteína biotinilada por milímetro de resina. As células tratadas com IPTG, após a centrifugação a 8.000 x g por 10 minutos a 4°C, foram ressuspensas em 1/10 do volume inicial da cultura (13 mL) com o tampão de lise [Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), NaCl 50 mM, glicerol 5% (v/v), PMSF 50 mM e Triton X-100 1 % (v/v)], rompidas mecanicamente por ultra-sonicação em “Ultrasonic Homogenizer 4710 Séries” (COLE PARMER), nas condições de pulso 5, amplitude 60/80, por 15 segundos e,

novamente, centrifugadas a 10.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e aplicado em coluna de cromatografia contendo a resina SoftLink™ (PROMEGA).

Para empacotamento da coluna cromatográfica, a resina foi homogeneizada por inversão e, em seguida, empacotada por gravidade em uma coluna de polipropileno (10 x 0,5 cm). Após a drenagem do etanol 20%, a resina foi lavada com 20 mL (5 volumes) de tampão de lise [Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), NaCl 50 mM; glicerol 5% (v/v); PMSF 50 mM e Triton X-100 1% (v/v)]. O extrato bruto de proteínas foi aplicado à coluna de cromatografia, equilibrada com o tampão de lise, sendo que a proteína AC5 foi eluída com o tampão de lise contendo biotina 5 M em frações de 0,5 mL. As frações contendo a proteína AC5 foram identificadas por SDS-PAGE, utilizando-se gel de acrilamida 10% (p/v), conforme descrito por Laemmli (1970). Após a eletroforese, o gel foi corado com “comassie brilliant blue”. As frações enriquecidas com a proteína recombinante foram reunidas e mantidas a –20°C e, posteriormente, separadas por SDS-PAGE, transferidas para uma membrana de nitrocelulose, usando o sistema de transferência da BIORAD, de acordo com as instruções do fabricante.

Após a transferência, a membrana foi incubada com o reagente de bloqueio TBS-T [Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), NaCl 150 mM, acrescido de Tween-20 0,05% (v/v)], por 1 hora à temperatura ambiente. A membrana, então, foi incubada durante 30 minutos com o sistema conjugado estreptavidina fosfatase-alcalina, sendo, posteriormente, lavada com o mesmo reagente de bloqueio TBS-T por 3 vezes, com uma duração de 5 minutos para cada lavagem. A atividade da fosfatase alcalina foi detectada, usando-se o sistema de detecção NBT/BCIP (azul de nitrotetrazólio/5-bromo, 4-cloro indolilfosfato) (GIBCO/BRL).

4. RESULTADOS

4.1. Análise filogenética e eventos de recombinação entre begomovírus que infectam tomateiros recentemente identificados no Brasil

A sequência do componente A de ToCMV, isolado de MG, foi previamente determinada (Machado, 2000). Exceto pela presença de uma ORF AC5 adicional, sua organização genômica é similar ao componente A de begomovírus bissegmentados. A região intergênica contém a estrutura de grampo, conservada em todos os geminivírus, e o nonanucleotídeo TAATATTAC que contém o sítio de clivagem para iniciação da replicação da fita positiva do DNA (Laufs *et al*, 1995; Stanley, 1995, Figura 3). Análise comparativa de sequências revelou que o componente A de ToCMV, isolado de MG, possui 92% de identidade de sequência com o begomovírus ToCMV, isolado da Bahia, recentemente identificado (número de acesso AF490004) e designado ToCMV-[BA-Se1].

Entre as regras para classificação taxonômica de geminivírus, a homologia de sequência tem sido utilizada como um dos critérios para classificação de espécies e estirpes. De maneira geral, uma identidade de sequência superior a 90% entre os DNA-As de begomovírus tem sido considerado como critério taxonômico para identificação de estirpes do mesmo vírus.

```

TCrLYV-A      CCAATTGGGGTCTCGCTCAAACTCGCTAGTCAATTGGTGACT--GGTGTACAAATATATACTAGAAGCCTCTATAGAACTTT
TCrLYV-B      CCAATTGGGGTCTCGCTCAAACTCGCTAGTCAATTGGTGACT--GGTGTACAAATATATACTAGAAGCCTCTATAGAACTCT
ToCMV-[BA-Se1]-A CCGATTGGGGACTCTCTAAAACCT-CTAAAG-CAATTGGGGACT--GGGGTCTATATATACTAGAACCCTCTATAGAACTTT
ToCMV-[BA-Se1]-B CCGATTGGGGACTCTCTAAAACCT-CTAAAG-CAATTGGGGACT--GGGGTCTATATATACTAGAACCCTCTATAGAACTTT
ToCMV-[MG-Bt1]-A CCGATTGGGGACTCTCTAAAACCTGCTCTAG-CAATTGGGGACT--GGGGTCTATATATACTAGAACCCTCTATAGAACTTT
TGMV-A        CCAATTGAGGAGGGGCTC AAAAAGTTATAT-GAATTGGTAGTAA-GGTAGCTCTTATATATATAGAAGTTCCCT--AAGGGG--
TGMV-B        CCAATTTGGTTTGGGGCTACAAAAGTTATAT-GAATTGGTAGTAA-GGTAGCTCTTATATATATAGAAGTTCCCT--AAGGGG--
ToSRV-A       CCAATTGGT-AGCTGCTCTAAAACCTCATAT-GAATTGGTAGTAAATGGTAGCTCTTATATACTAGAAGTTCCCTTAAAGGAGAT
ToRMV-A       CCAATTGGT-AGCTGCTCTAAAACCTCATAT-GAATTGGTAGTTATGGTAGCTCTTATATACTAGAAGTTCCCTTAAAGGAGAT

```

```

TCrLYV-A      CCAATCTCGTTCGAACACGTGGGCGGCCATCCG-TAATAATTACCGGATGGCCGCGAAAAA-----
TCrLYV-B      C-AATCTCGTTCGAACACGTGG-CGGCCATCCG-TAATAATTACCGGATGGCCGCGGATAA-----
ToCMV-[BA-Se1]-A C-AATCTCGTTCACACACGTGG-CGGCCATCCGTTAATAATTACCGGATGGCCGCGGGGTTTTTTTT--
ToCMV-[BA-Se1]-B C-AATCTCGTTCACACACGTGG-CGGCCATCCGTTAATAATTACCGGATGGCCGCGGGGTTTTTTTT--
ToCMV-[MG-Bt1]-A C-AATCTCGTTTACACACGTGG-CGGCCATCCGATAATAATTACCGGATGGCCGCGGATTTTTTT--
TGMV-A        -----CACGTGG-CGGCCATCCGTT-ATAATTACCGGATGGCCGCGGATCCTCACC
TGMV-B        -----CACGTGG-CGGCCATCCGTTTATAATTACCGGATGGCCGCGGATCCTCACC
ToSRV-A       T-----GCTACACGTGG-CGGCCATCCGTTAATAATTACCGGATGGCCGCGGATTTTACC
ToRMV-A       T-----GCTACACGT-GGCCGCGCCATCCGATAATAATTACCGGATGGCCGCGGATTTTTAT--

```

Estrutura em forma de grampo

Figura 3 - Região comum do DNA-A e DNA-B de begomovírus que infectam tomateiros no Brasil. O alinhamento de seqüências da região comum dos begomovírus indicados foi obtido com o programa CLUSTAL – W. A seqüência de nucleotídeos foi alinhada com a introdução e gaps (mostrado como tracejado) para maximizar a identidade. O sítio provável de ligação da AC1 (repetições), a seqüência TATA à esquerda do promotor e o nonanucleotídeo conservado estão localizados nas caixas. A estrutura de grampo conservada está sublinhada.

Assim sendo, o DNA-A de ToCMV, isolado de MG, pode ser considerado uma estirpe de ToCMV-[BA-Se1], sendo designado ToCMV-[MG-Bt1], em referência a região de Betim onde foi inicialmente identificado. Além de exibirem um alto grau de conservação de seqüências, as regiões intergênicas desses vírus são altamente homólogas (94% de identidade de seqüência) e possuem seqüências idênticas (TGGGGACTGGGGT) de ligação da proteína AC1 (Figura 3). Baseado na conservação de seqüência de suas proteínas Rep (AC1) (93% de identidade de seqüência) e da origem de replicação, pode-se antecipar que a proteína Rep de uma estirpe seja capaz de trans-replicar o componente heterólogo da outra estirpe.

Análises filogenéticas baseadas na conservação de seqüência de nucleotídeos da família *Geminiviridae* têm demonstrado que o gênero *Begomovirus* forma agrupamentos de acordo com sua origem geográfica, com distintos ramos para os

vírus da América, Ásia e África (Padidam *et al.*, 1995; 1999). A inclusão de begomovírus brasileiros recentemente caracterizados em análises de comparação de sequências reforça este relacionamento baseado na origem geográfica, uma vez que foram agrupados como sub-ramos de vírus das Américas (Figura 4). O mesmo relacionamento geográfico é observado quando as sequências de aminoácidos deduzidas dos genes *AVI*, *AC1*, *AC2* e *AC3* serviram de base para comparação (dados não mostrados). Em contraste, baseado na filogenia de *AC4*, ToCMV-[MG-Bt1] segrega mais intimamente relacionado com ramos de begomovírus monossegmentados como TYLCV e ToLCV da África e Ásia (Figura 5). Esta observação pode ser relevante, uma vez que o gene *C4* de begomovírus monossegmentados e o gene *AC4* de begomovírus bissegmentados parecem não ser análogos funcionais. (Jupin *et al.*, 1994; Pooma & Petty, 1996; Ridgen *et al.*, 1994).

Foi também observada que a posição relativa dos begomovírus brasileiros que infectam tomateiros varia na árvore filogenética, se diferentes fragmentos do genoma viral são usados como base para as análises filogenéticas (dado não mostrado).

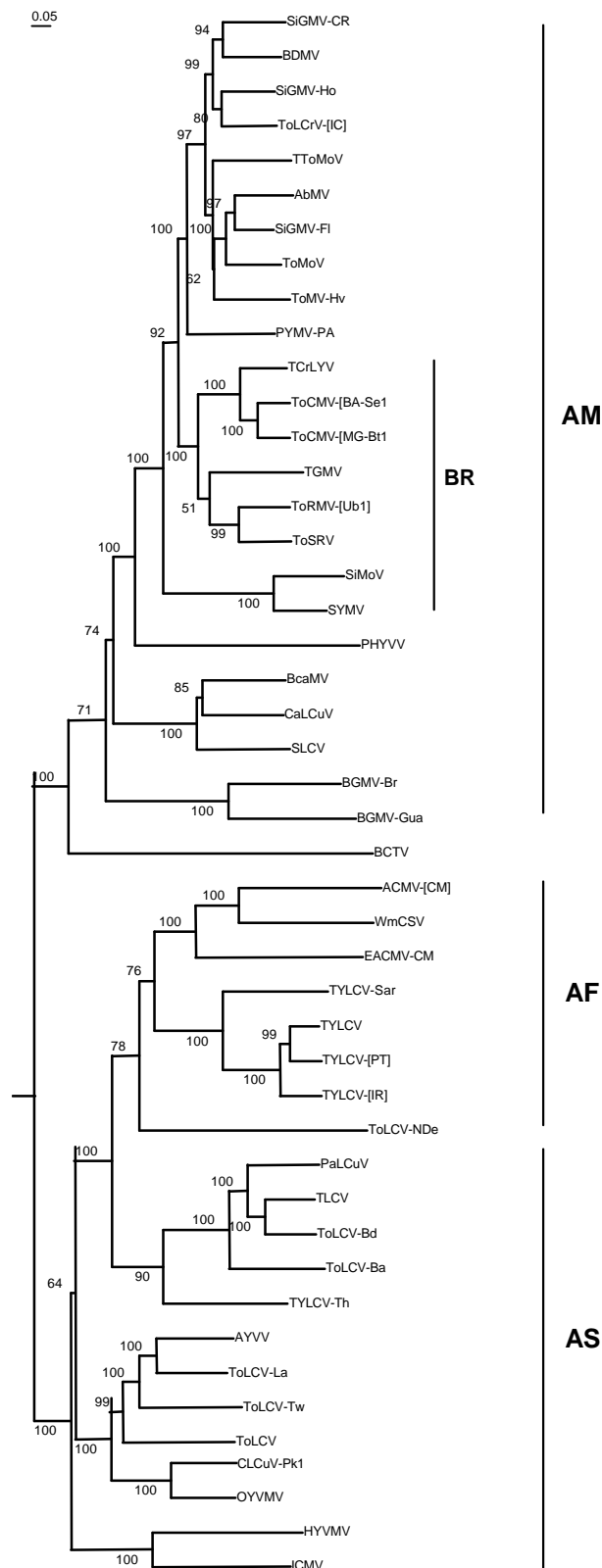


Figura 4 - Árvore filogenética baseada na sequência de DNA-A de begomovírus. Sequências de DNA-A de begomovírus monossegmentados e sequências de DNA-A de begomovírus bissegmentados foram alinhadas. Os principais ramos da árvore contêm os componentes genômicos de vírus das Américas (AM), África/Região Mediterrânea (AF) e Ásia/Austrália (AS). BR indica um grupo de begomovírus que infectam tomateiros e *Sida* no Brasil. As siglas dos vírus e o número de acesso do “GenBank” estão indicados na tabela 1.

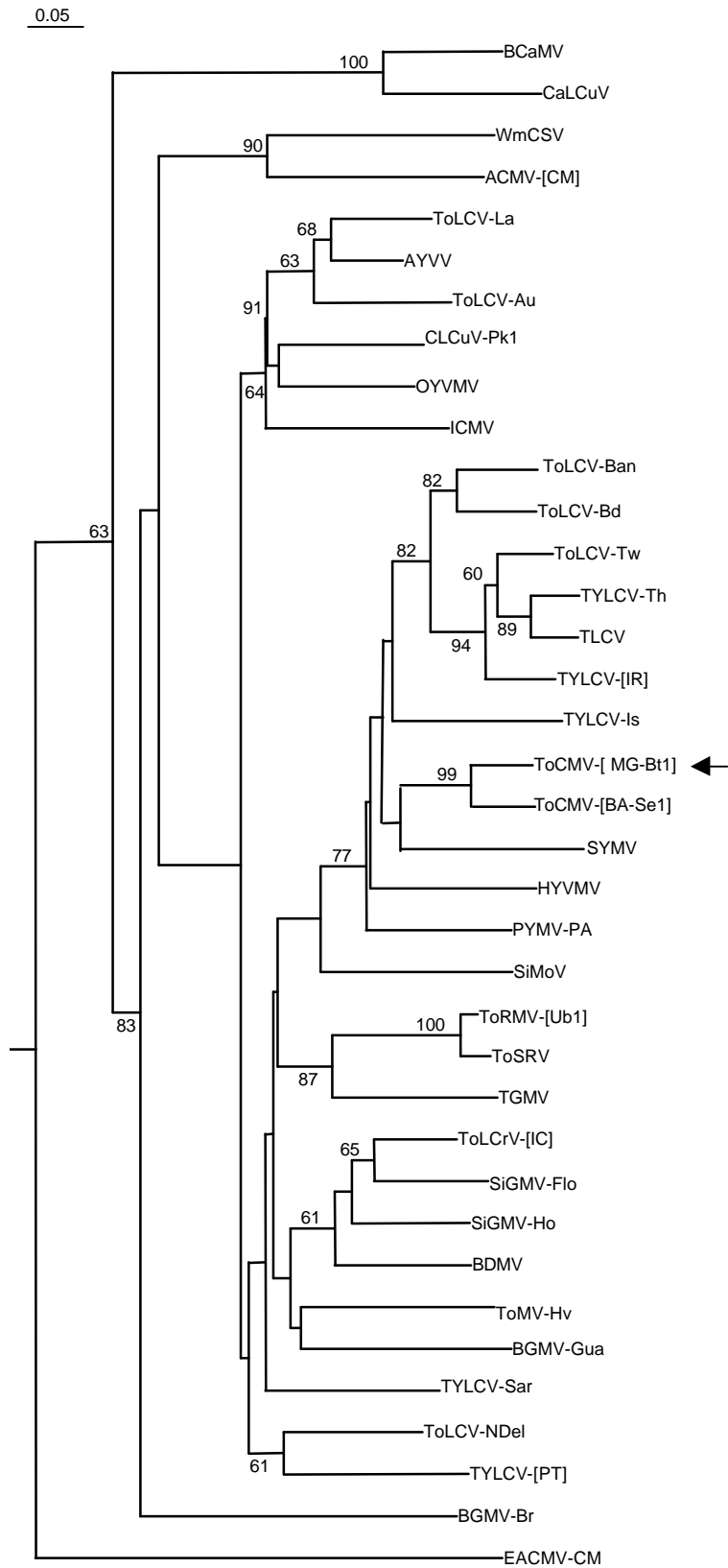


Figura 5 - Árvore filogenética obtida do alinhamento da seqüência de aminoácidos da proteína AC4. As seqüências de aminoácidos deduzidas do produto do gene *AC4* foram alinhadas. A árvore foi gerada usando o software DNAMAN 3.0. A posição do ToCMV-[MG-Bt1] é indicada pela seta.

Este agrupamento diferencial de partes de sequências do mesmo vírus tem sido considerado como um indicativo de recombinação intermolecular entre os genomas virais. Assim, um programa de detecção de recombinação, desenvolvido por Martin & Rybicki (2000), foi utilizado com o objetivo de identificar eventos de recombinação no DNA-A de begomovírus que infectam tomateiros, recentemente identificados no Brasil, utilizando os mesmos critérios adotados por Martin & Rybicki, (2001). O programa utilizado está disponível no site <http://www.uct.ac.za/depts/microbiology/microdescription.htm>, e o resultado da análise de recombinação é mostrado na Figura 6A.

Foram encontrados dois grupos de sequências recombinantes particularmente interessantes, porque eles podem ser relacionados com a pressão de seleção para melhor adaptação do vírus. O primeiro grupo refere-se a um evento de recombinação no qual parte da região codificadora de Rep (*AC1*) de *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV-[MG-UB1]) e de *Tomato rugose severe virus* (ToRSV) foi substituída com uma região equivalente do *Tomato golden mosaic virus* (TGMV). A região recombinante corresponde às sequências que codificam os aminoácidos nas posições 34-163 da proteína Rep de ToRMV-[MG-Ub1] e 46-174 da proteína Rep de ToRSV, que compreendem o domínio de ligação ao DNA da proteína Rep de TGMV (Gladfelter *et al.*, 1997).

Esses recombinantes podem ter sido selecionados devido a uma melhor interação entre o domínio de ligação ao DNA de Rep e os sítios de ligação na origem de replicação. A comparação da origem mínima de replicação de TGMV (Lazarowitz *et al.*, 1992; Fontes *et al.*, 1994a, 1994b) com a região correspondente de ToRMV-

[MG-Ub1] e ToRSV revelou que eles contém 95% e 97% de identidade de seqüência, respectivamente (Figura 3).

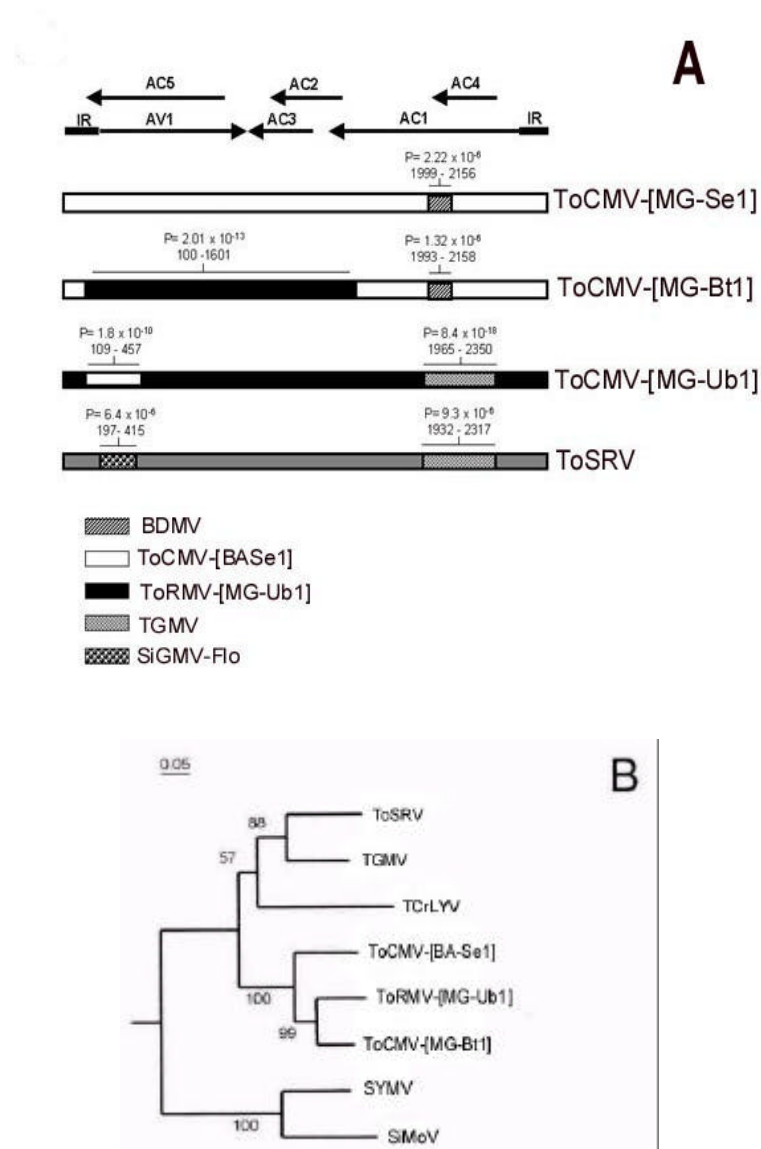


Figura 6 - **A.** Representação esquemática das regiões recombinantes de begomovírus brasileiros que infectam tomates. Os potenciais pontos de quebra de recombinação e a probabilidade (P) de que as regiões indicadas não tem origem recombinante (Martin & Rybicki, 2000) são apresentadas no mapa do DNA-A. Os padrões indicam a origem viral da região recombinante. As setas definem a posição, orientação e extensão das fases de leitura aberta, como indicado. IR indica a região intergênica. ToCMV-[BA-Se1], *Tomato chlorotic mottle virus*, isolado BA-Se1; ToCMV-[MG-Bt1], *Tomato chlorotic mottle virus*, isolado MG-Bt1; ToRMV-[MG-Ub1], *Tomato rugose mosaic virus*, isolado Ub1; ToSRV, *Tomato severe rugose virus*; BDMV, *Bean dwarf mosaic virus*; TGMV, *Tomato golden mosaic virus*; SiGMV-Flo, *Sida golden mosaic virus-Florida*. **B.** Árvore filogenética baseada na seqüência dos segmentos genômicos recombinantes de ToRMV-[MG-Bt1] (posições 100 a 1601 do genoma ToCMV-[MG-Bt1]), confirmando a aparente natureza recombinante desse vírus.

Notavelmente, ambos ToRMV-[MG-Ub1] e ToRSV contém um sítio duplicado GGATGTAATGGATG, que difere do sítio de ligação ao DNA, da proteína Rep, de TGMV, GGATGTAAGGATG (Fontes *et al.*, 1994a), pela inserção de um único nucleotídeo. Embora o TGMV e os vírus ToRMV-[MG-Ub1] e ToRSV são muito divergentes na seqüência total e induzem diferentes sintomas em seus hospedeiros (Zerbini, F.M. não publicado), a natureza recombinante desses vírus pode tornar o seu componente A competente para trans-replicação do componente B heterólogo. Se esta suposição for verdadeira, as propriedades de trans-replicação de recombinantes que ocorrem naturalmente podem complicar ainda mais os critérios atuais de taxonomia para distinção de espécies e estirpes da família *Geminiviridae*.

O segundo evento de recombinação particularmente interessante parece ter ocorrido entre ToRMV-[MG-Ub1] e ToCMV-[BA-Se1], resultando em ToCMV-[MG-Bt1], que contém seqüências de ToCMV-[BA-Se1] correspondentes à região que codifica *ACI* e à região intergênica. Este evento de recombinação, estatisticamente significativo, pode ter habilitado o recombinante ToCMV-[MG-Bt1] DNA-A, a recrutar o DNA-B de ToCMV-[BA-Se1] e, como consequência ToCMV-[MG-Bt1] DNA-A pode ser considerado um variante do DNA-A de espécies bissegmentadas de ToCMV. A natureza recombinante de ToCMV-[MG-Bt1] foi confirmada usando os segmentos genômicos recombinantes, tais como as seqüências de ToRMV-[MG-Ub1] (posições de 100 a 1601 no genoma de ToCMV-[MG-Bt1]), como base para análises filogenéticas, conforme Figura 6B. Isso causou uma variação na posição relativa de ToCMV-[MG-Bt1], uma vez que passou a segregar intimamente com ToRMV-[MG-Ub1], diferentemente da Figura 4, onde ambos aparecem em ramos distintos.

4.2 Caracterização biológica de ToCMV-[MG-Bt1]-A

4.2.1 O componente A de ToCMV-[MG-Bt1] é capaz de infectar seu hospedeiro natural *Lycopersicon esculentum*

O DNA-A de ToCMV-[MG-Bt1] não requer o DNA-B cognato para infectar sistematicamente *Nicotiana benthamiana* (Galvão *et al.*, 2003). Com a finalidade de avaliar se o componente A de ToCMV-[MG-Bt1] é capaz de infectar seu hospedeiro natural *Lycopersicon esculentum*, sem a necessidade do componente B cognato, cultivares de tomateiro da variedade “Santa Clara” foram inoculados com o ToCMV-[MG-Bt1] pelo método biobalístico. O DNA-A de ToCMV-[MG-Bt1] induziu clorose e mosqueamento, tanto nas folhas inoculadas quanto nas folhas apicais (Figura 7) em 100% das plantas inoculadas (Tabela 5). Também foi observado encarquilhamento foliar nas folhas superiores 3 a 4 semanas após a inoculação. Estes sintomas são similares àqueles observados nas amostras originais de tomateiros infectados, embora em menor intensidade (E.P.B. Fontes, comunicação pessoal). O acúmulo do DNA-A viral foi detectado por PCR nas folhas inoculadas e apicais (Figura 8, linhas 8 e 10). Nos ensaios de PCR, os oligonucleotídeos específicos para o componente B de begomovírus não amplificaram nenhum fragmento de DNA a partir de DNA de plantas infectadas (Figura 8, linhas 9 e 11), confirmando a ausência de um componente B compatível nos ensaios de infectividade.

Tabela 5 - Ensaio de infectividade, utilizando os inócuos ToCMV-[MG-Bt1] DNA-A sozinho ou associado ao TCrLYV DNA-B numa gama de hospedeiros.

Hospedeiro	Inócuo	Plantas sintomáticas/inoculadas		Detecção do DNA viral – Via PCR							
		Experimento		Folhas inoculadas				Folhas sistêmicas			
		1	2	Primers A		Primers B		Primers A		Primers B	
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
<i>Lycopersicon esculentum</i>	ToCMV-[MG-Bt1] -A	4/4	4/4	+	-	-	-	+	+	-	-
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	ToCMV-[MG-Bt1] -A	2/4	3/4	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>Chenopodium quinoa</i>	ToCMV-[MG-Bt1] -A	2/4	3/4	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Datura stramonium</i>	ToCMV-[MG-Bt1] -A	0/4	0/4	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Nicotiana benthamiana</i>	ToCMV-[MG-Bt1] -A	3/4	3/4	+	-	-	-	+	+	-	-
<i>Nicotiana clevelandii</i>	ToCMV-[MG-Bt1] -A	0/4	0/4	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nicotiana glutinosa</i>	ToCMV-[MG-Bt1] -A	2/4	3/4	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Euphorbia eterofila</i>	ToCMV-[MG-Bt1] -A	0/4	0/4	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lycopersicon esculentum</i>	ToCMV-[MG-Bt1]-A + TCrLYV-B	4/4	4/4	+	-	+	-	-	+	-	+
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	ToCMV-[MG-Bt1]-A + TCrLYV-B	3/4	2/4	+	-	+	+	+	+	+	-
<i>Chenopodium quinoa</i>	ToCMV-[MG-Bt1]-A + TCrLYV-B	2/4	2/4	+	+	+	+	-	+	-	+
<i>Datura stramonium</i>	ToCMV-[MG-Bt1]-A + TCrLYV-B	0/4	0/4	+	-	+	-	+	-	+	+
<i>Nicotiana benthamiana</i>	ToCMV-[MG-Bt1]-A + TCrLYV-B	2/4	2/4	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>Nicotiana clevelandii</i>	ToCMV-[MG-Bt1]-A + TCrLYV-B	0/4	0/4	+	-	+	-	+	-	+	+
<i>Nicotiana glutinosa</i>	ToCMV-[MG-Bt1]-A + TCrLYV-B	0/4	0/4	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Euphorbia eterofila</i>	ToCMV-[MG-Bt1]-A + TCrLYV-B	0/4	0/4	-	-	-	-	-	-	-	-

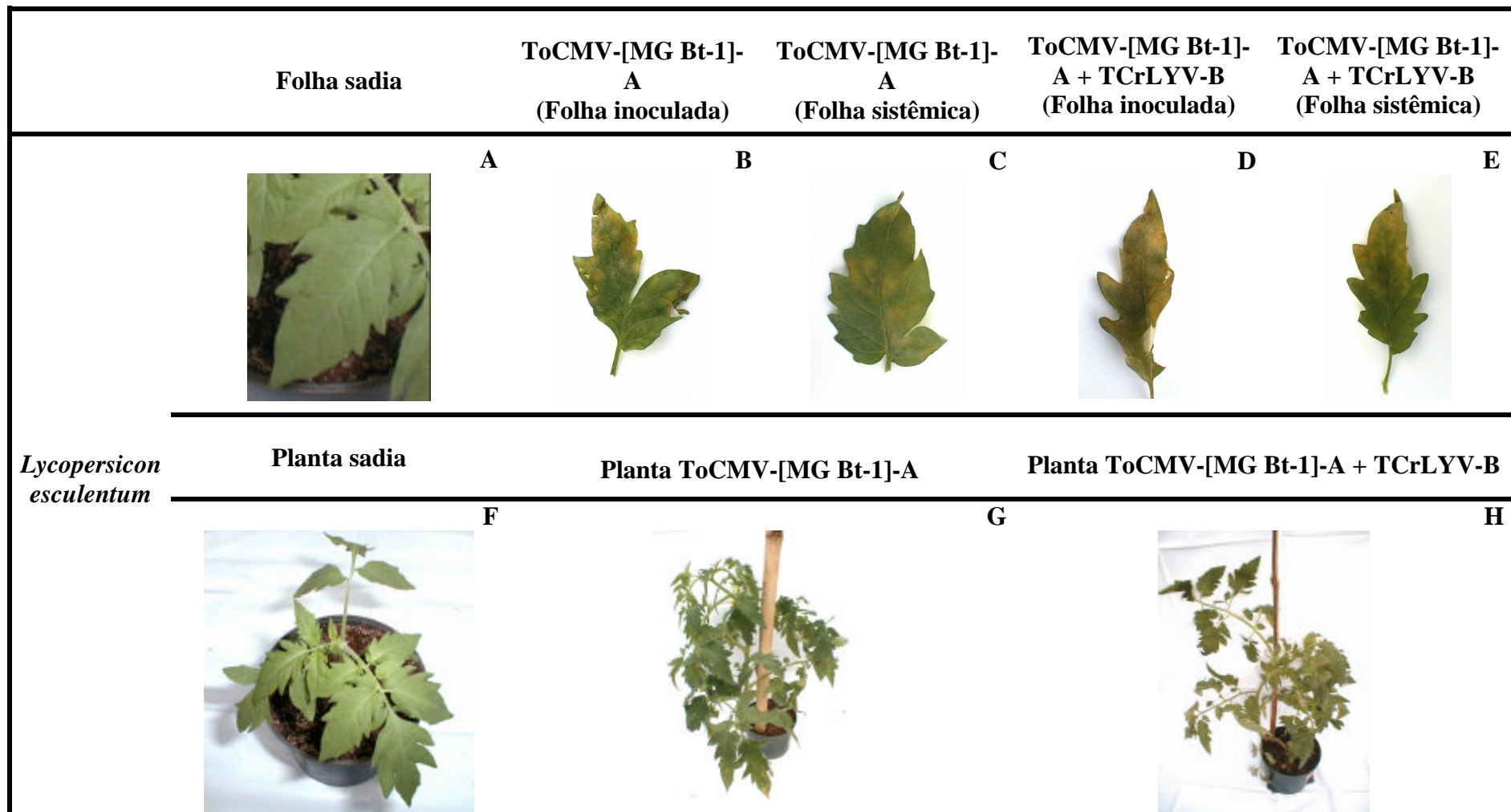


Figura 7- Sintomas da infecção de *Lycopersicon esculentum* associados a ToCMV-[MG-Bt1]-A sozinho ou com TCrLYV-B, conforme indicado acima da figura.

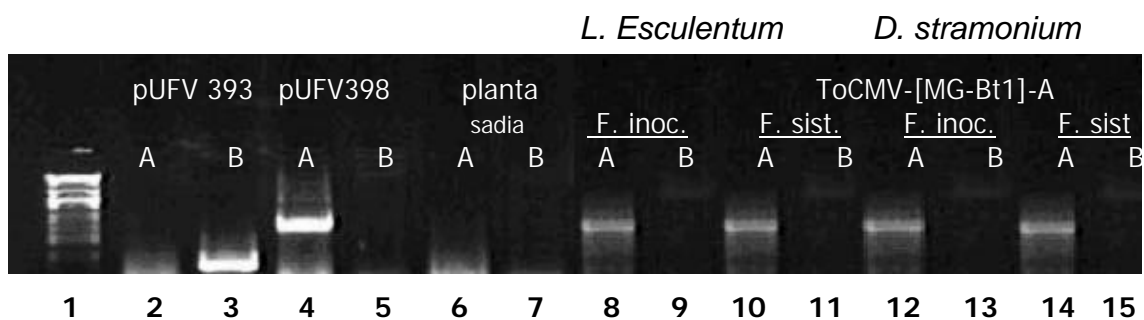


Figura 8 - Diagnóstico de infecção pelo geminivírus ToCMV-[MG-Bt1]-A por PCR. DNA total extraído de *Lycopersicon esculentum* (Canaletas 8, 9, 10 e 11) e *Datura stramonium* (Canaletas 12, 13, 14 e 15) foi amplificado com oligonucleotídeos específicos para o DNA-A (A) e DNA-B (B) e separados por eletroforese. A canaleta 1 corresponde ao marcador lambda digerido, 2 a 7 são os controles da reação.

Apesar do DNA-A de ToCMV-[MG-Bt1] ser capaz de infectar sistematicamente *L. esculentum* na ausência de um componente B, os sintomas desenvolvidos foram mais atenuados do que aqueles observados em tomateiros infectados naturalmente no campo. Além disso, o DNA-A parece ter acumulado em baixos níveis nas plantas infectadas, conforme julgado pela baixa concentração de fragmento amplificado nos ensaios de diagnose por PCR. Entretanto, a inclusão de um DNA-B compatível (TCrLYV-B, Galvão *et al.*, 2003) nos ensaios de infectividade (Figura 7) não alterou a sintomatologia e a intensidade da doença causada pelo componente A de ToCMV-[MG-Bt1]. Coletivamente, estes resultados indicam que o componente A de ToCMV-[MG-Bt1] exibe propriedades patogênicas agronomicamente relevantes, mas não excluem a possibilidade de que o componente B cognato da espécie ToCMV venha contribuir para um aumento da patogenicidade do vírus.

4.2.2 Gama de hospedeiro de ToCMV-[MG-Bt1]-A

Diversas plantas indicadoras foram testadas quanto à sua capacidade de atuarem como hospedeiros do vírus, observando sintomas e a presença de infecção latente. O método biolístico foi usado para inocular *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana clevelandii*, *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium amaranticolor*, *Datura stramonium* e *Euphorbia eterofila* com ToCMV-[MG-Bt1]-A associado ao TCrLYV-B ou ToCMV-[MG-Bt1]-A sozinho. Plantas controle foram incluídas em cada experimento. Os sintomas foram observados 14 a 21 dias após a inoculação e as folhas inoculadas e apicais foram coletadas, sendo o acúmulo do DNA viral detectado por PCR ou “Southern blot”.

A inoculação de ToCMV-[MG-Bt1] DNA-A sozinho induziu infecção sistêmica com aparecimento de sintomas em *N. benthamiana*, *Chenopodium amaranticolor* e *Chenopodium quinoa*, com eficiência similar (Tabela 5, Figuras 9 e 10). Em contraste, ToCMV-[MG-Bt1] DNA-A sozinho não induziu infecção local e nem sistêmica em *N. glutinosa*, *N. clevelandii* e *Euphorbia eterofila*, não sendo possível detectar o acúmulo do DNA viral (Tabela 5). O DNA-A clonado de ToCMV-[MG-Bt1] causou infecção assintomática em *Datura stramonium*, uma vez que não houve desenvolvimento de sintomas (Figura 9), mas o acúmulo de DNA viral foi detectado tanto em folhas inoculadas quanto em folhas apicais (Figura 8, linhas 12 e 14). Em todos os hospedeiros permissíveis, a inclusão de um DNA-B compatível (TCrLYV-B) nos ensaios de infectividade não alterou a sintomatologia e a intensidade da doença causada pelo DNA-A de ToCMV-[MG-Bt1] (Figuras 7 e 9).

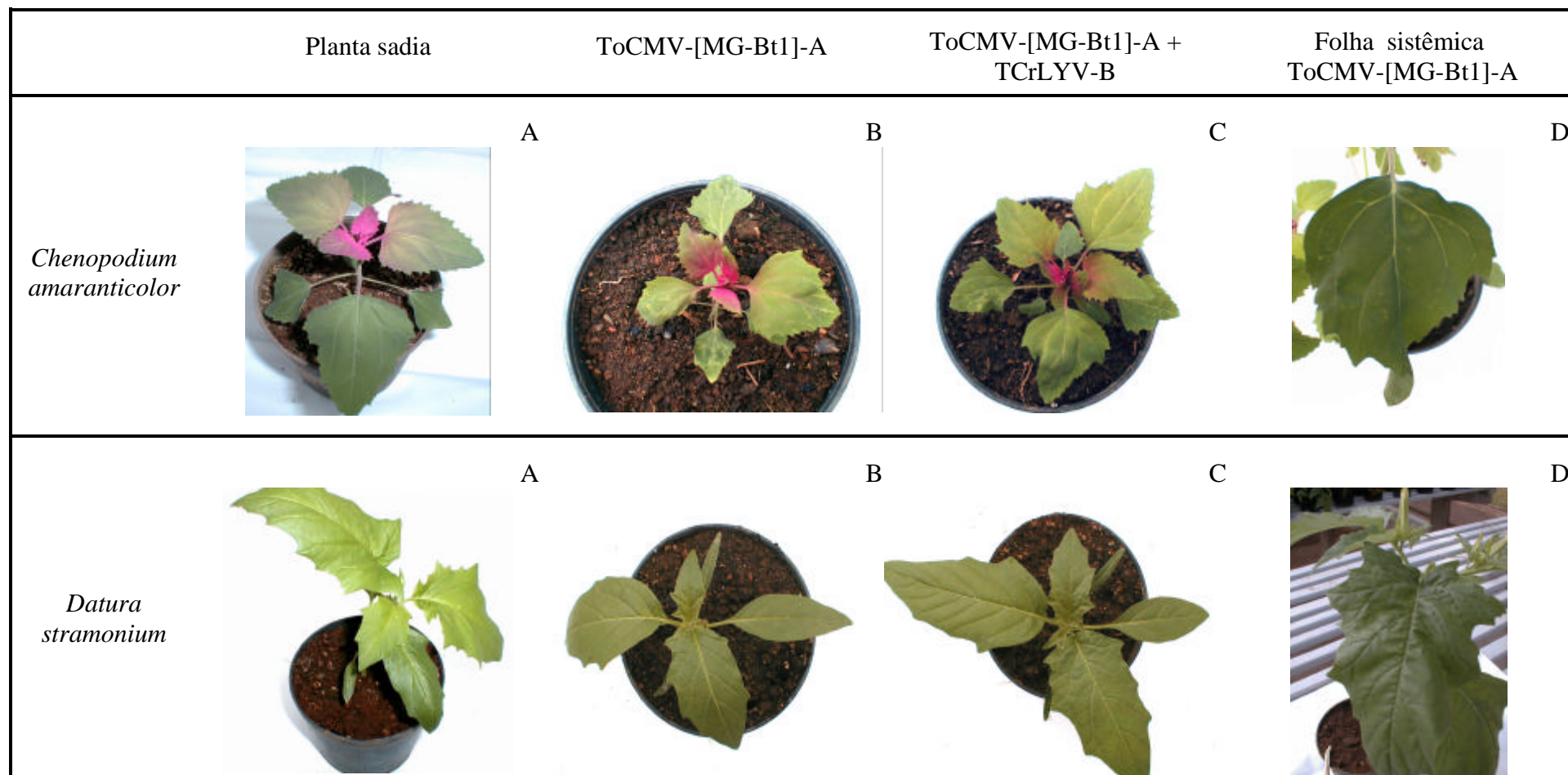


Figura 9 - Sintomas em *Chenopodium amaranticolor* e *Datura stramonium*, bombardeadas com os clones genômicos. A representa as plantas saudáveis, B, as plantas inoculadas com ToCMV-[MG-Bt1]-A, C, as plantas inoculadas com ToCMV-[MG-Bt1]-A + TCrLYV-B e, em D, é mostrado em destaque uma folha sistêmica inoculada com o DNA-A de ToCMV-[MG-Bt1].

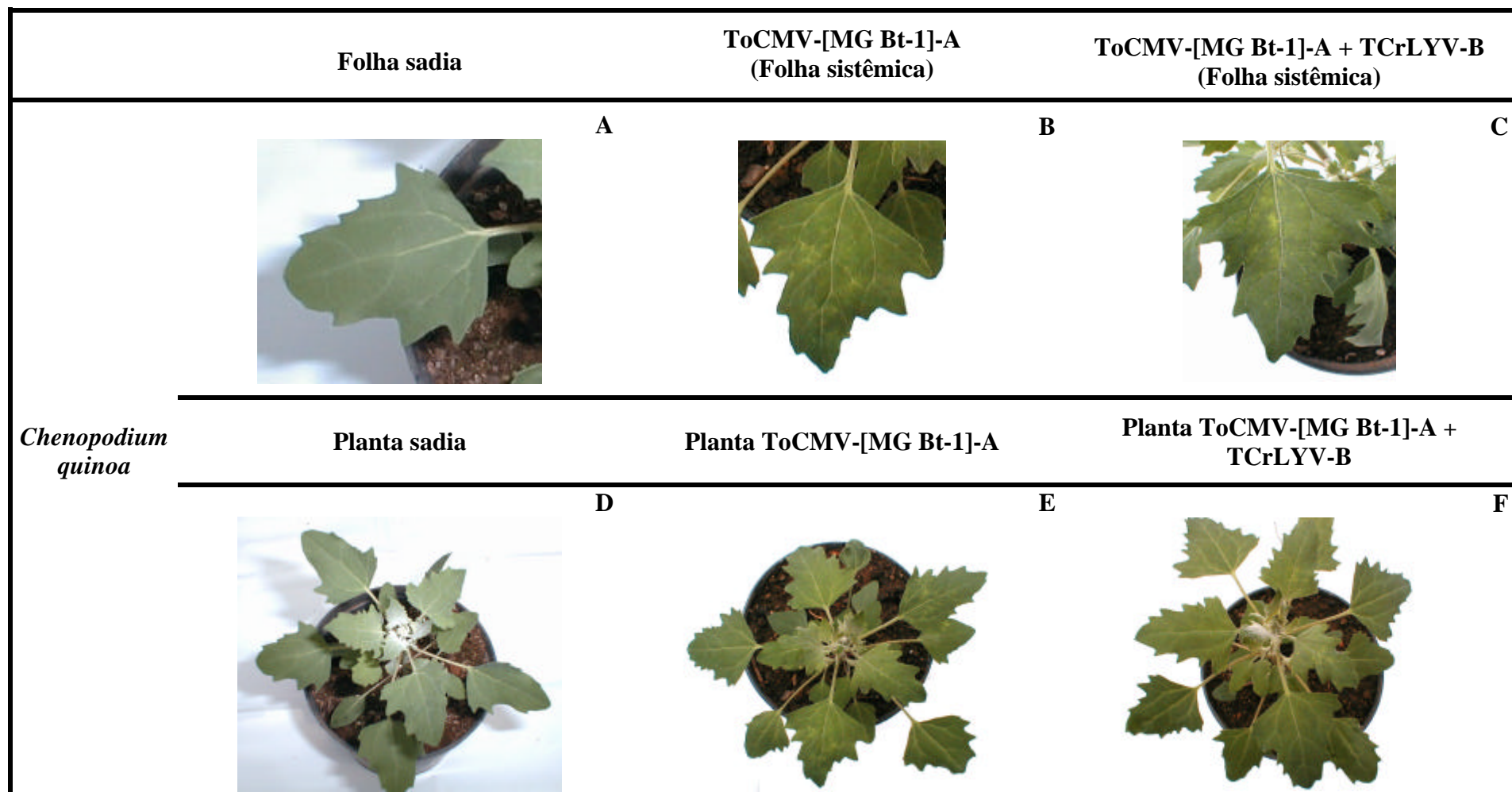


Figura 10 - Sintomas em *Chenopodium quinoa*. A e D representam folha e planta sadia, B e E são a folha e planta inoculadas com ToCMV-[MG- Bt1] sozinho e, C e F indicam a folha e planta inoculadas com ToCMV-[MG-Bt1]-A em associação com TCrLYV-B.

A ausência de um possível DNA-B contaminante foi confirmada pela falha em detectar o DNA-B viral nos tecidos infectados por meio de PCR (Figura 8) e de “Southern blot” (Figura 11B, linha 4). Coletivamente, estes resultados indicam que ToCMV-[MG-Bt1] DNA-A é capaz de infectar sistematicamente alguns hospedeiros como *N. benthamiana*, *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium quinoa*, *Datura stramonium*, além de seu hospedeiro natural *Lycopersicon esculentum* na ausência de um DNA-B cognato. A inclusão de um DNA-B compatível nos ensaios de inoculação (Figura 11, linha 5) causou um aumento desprezível no acúmulo do dsDNA-A do ToCMV (Figura 11A, linhas 4 e 5) e não alterou a sintomatologia das infecções causadas pelo ToCMV DNA-A. Em contraste, ToCMV-[MG-Bt1] DNA-A não foi infeccioso em *N. glutinosa*, *N. clevelandii* e *Euphorbia heterophylla*, conforme identificado pela ausência de desenvolvimento de sintomas e à inexistência do DNA viral nas folhas sistêmicas (Tabela 5).

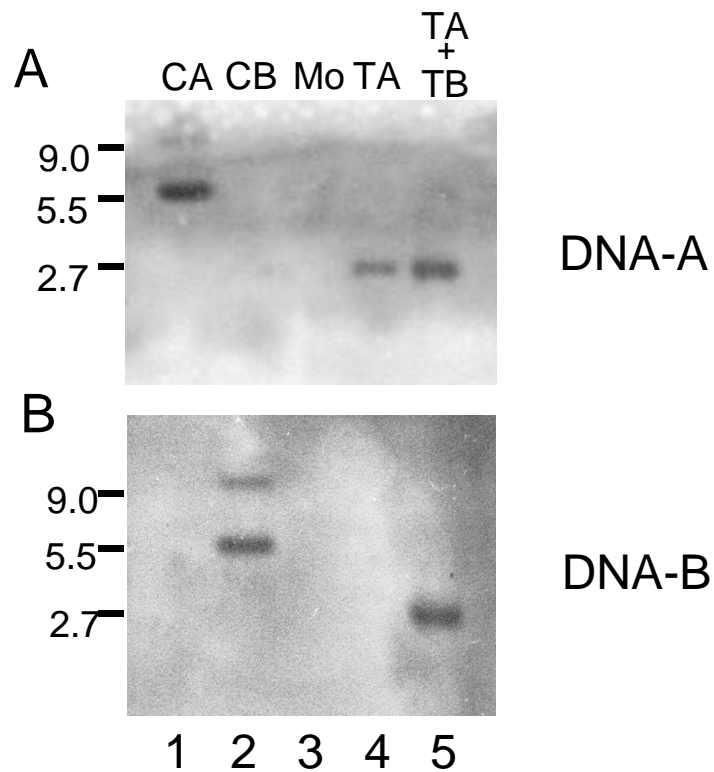


Figura 11 - Acúmulo do DNA viral em plantas de *N. benthamiana* infectadas com ToCMV-[MG-Bt1]-A. O DNA total foi isolado de plantas inoculadas com seqüências repetidas do DNA viral (ToCMV[MG-BT1]-A = TA ou ToCMV-[MG-Bt1]A + ToCMV-[MG-Ig1]-B = TA + TB), digerido com *SacI* (TA, linha 4) ou *SacI/BamHI* (TA+TB, linha 5), separado por eletroforese, transferido para membrana de nylon e hibridizado com sondas específicas para o DNA viral A ou DNA-B como indicado à direita. As canaletas 1 (CA) e 2 (CB) correspondem aos DNAs controles pToCMVA-1,45 e pToCMVB-1,4. A conaleta 3 (Mo) corresponde ao DNA de plantas controle inoculadas. As posições de migração das moléculas de peso molecular padrão são indicadas à esquerda em Kb.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A grande diversidade atual dos begomovírus tem sido explicada pela alta frequência de eventos de recombinação que resultaram na recente emergência de genótipos altamente patogênicos causando sérias perdas agrícolas (Zhou *et al.*, 1997., Padidam *et al.*, 1999). Os resultados dessa investigação forneceram evidências adicionais da importância dos eventos de recombinação inter-espécies na evolução dos begomovírus e na sua emergência como patógenos relevantes na agricultura. De fato, utilizando um programa computacional para detecção de recombinação, desenvolvido por Martin & Rybicki (2000), eventos de recombinação estatisticamente significantes foram detectados entre as sequências completas do DNA-A de begomovírus que infectam tomateiros, recentemente identificados no Brasil. As progênies recombinantes mostraram diferentes propriedades biológicas e patológicas quando comparadas com os seus prováveis predecessores. A variante ToCMV-[MG-Bt1]-A originada de recombinação foi capaz de produzir sintomas sistêmicos em *Nicotiana benthamiana*, *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium amaranticolor* e *Lycopersicon esculentum* na ausência do seu DNA-B cognato.

O modular rearranjo de recombinação que resultou em ToCMV-[MG-Bt1]-A pode ter fornecido a esse vírus algumas vantagens evolucionárias quando comparado

com seus predecessores. Ensaio de infectividade conduzidos com begomovírus tipicamente bissegmentados, tais como ACMV (Klinkenberg & Stanley., 1990) e PYMD (Buragohaim *et al.*, 1994), têm demonstrado que a agroinoculação de *N. benthamiana* com o DNA-A sozinho é suficiente para a replicação e movimento do vírus, mas não para a indução de sintomas. No caso do ToCMV-[MG-Bt1]-A, ele foi capaz de mediar infecção sistêmica e sintomática em *Nicotiana benthamiana*, *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium amaranticolor* e *Lycopersicon esculentum*.

A recente caracterização de um novo begomovírus bissegmentado do hemisfério oriental, denominado *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV), demonstrou que o seu DNA-A sozinho exibe características de geminivírus monossegmentados (Saunders *et al.*, 2002). Estas incluem a capacidade do DNA-A sozinho em induzir infecção sistêmica agressiva em *N. benthamiana* e de interagir com o DNA satélite (DNA_{sat}) associado com doenças mediadas por begomovírus monossegmentados.

Em contraste ao DNA-A de SLCMV e ACMV que codifica um análogo do gene V2, envolvido no movimento viral, a capacidade codificadora do DNA-A de ToCMV-[MG-Bt1] não inclui a presença de um gene homólogo de V2. Entretanto, ele possui uma ORF AC5 complementar ao vírion, com o potencial para codificar uma proteína de 250 resíduos de aminoácidos, atípico de outros begomovírus. Contudo, a possibilidade de que AC5 seja um gene funcional o qual poderia mediar uma infecção sistêmica é improvável por várias razões. Primeiro, embora diversas tentativas utilizando diferentes sistemas para expressão de genes heterólogos em bactéria, com a finalidade de produzir a proteína AC5 em *Escherichia coli* tenham sido feitas, nenhum sucesso foi obtido. Este resultado sugere, que o polipeptídeo resultante não preenche os requerimentos químicos inerentes para manter a estrutura natural da proteína. Segundo, a sequência de aminoácidos deduzida a partir do gene

AC5 não tem homologia com as proteínas de movimento viral ou com nenhuma outra proteína notificada no “Genebank”. Terceiro, não foi possível detectar o transcrito correspondente ao gene AC5 por meio de RT-PCR a partir de RNA total de plantas infectadas (dados não mostrados). Além disso, devido à posição e direção do gene AC5 no genoma de ToCMV-[MG-Bt1]-A, a expressão do seu gene seria absolutamente dependente de uma regulação temporal estreita de forma a evitar a repressão anti-senso da expressão do gene da proteína do capsídeo. Finalmente, tem sido demonstrado que mutação no gene AC5 correspondente de WmCSV (*Watermelon chlorotic stunt virus*) não causa nenhum efeito no processo de infecção viral (Kheyr-Pour *et al.*, 2000). Entretanto, é possível que o gene AC5 de ToCMV-[MG-Bt1]-A e o gene AC5 de WmCSV sejam geneticamente distintos, desde que os genes AC5 homólogos não apresentam uma significativa conservação de sequência (32% no nível de identidade dos aminoácidos). Assim, análises genéticas do gene AC5 do DNA-A de ToCMV[MG-Bt1] por meio mutações poderão confirmar essas possibilidades.

Uma explicação alternativa para a capacidade do ToCMV-[MG-Bt1]-A de se mover sozinho e desenvolver sintomas sistêmicos em *Nicotiana benthamiana*, *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium amaranticolor* e *Lycopersicon esculentum* pode estar relacionada à proteína AC4, a qual parece ser similar à proteína C4 de begomovírus monossegmentados do hemisfério oriental (Figura 3). Enquanto a função do gene AC4 de begomovírus bissegmentados ainda não está totalmente esclarecida (Pooma & Petty, 1996), o produto do gene C4 de begomovírus monossegmentados (TLCV e TYLCV) parece ser um determinante importante na severidade dos sintomas e no movimento sistêmico do vírus (Jupin *et al.*, 1994, Rigden *et al.*, 1994). A similaridade de sequências entre o gene AC4 de ToCMV-

[MG-Bt1]-A e o gene *C4* de begomovírus monossegmentados sugere funções similares. Entretanto, uma vez que o gene *AC4* de ToCMV-[MG-Bt1]-A e ToCMV-[BA-Se1] são altamente conservados, a função diferenciada entre suas proteínas codificadas pode ser explicada por pequenas diferenças na sequência de aminoácidos. Alternativamente, a proteína *AC4* ToCMV-[MG-Bt1]-A executa funções distintas por meio de interações com diferentes módulos recombinantes no seu genoma cognato.

O ToCMV-[MG-Bt1] possui um genoma híbrido, no qual o módulo compatível de replicação (sequência no gene *AC1* e da Ori) parece ter sido doado pelo ToCMV-[BA-Se1] e as sequências remanescentes parecem ter originado de ToRMV-[Ub1] (Figura 4A). A organização modular de ToCMV-[MG-Bt1]-A acomoda o argumento de que as regiões recombinantes podem agir como módulos de interação, conferindo propriedades biológicas distintas na progênie viral. Neste caso, a proteína do capsídeo seria uma candidata para participar, juntamente com a proteína *AC4*, na arquitetura do complexo funcional envolvido na substituição das funções de movimento codificadas pelo DNA-B. De fato, tem sido demonstrado que a proteína do capsídeo de begomovírus monossegmentados participa ativamente no movimento sistêmico do vírus (Riden *et al.*, 1993; Warting *et al.*, 1997). Similarmente, em hospedeiros não adaptados, a proteína do capsídeo de begomovírus bissegmentados é requerida para o desenvolvimento de uma infecção sistêmica (Pooma *et al.*, 1996). Embora nenhum experimento tenha sido conduzido ainda para determinar se as interações entre os módulos recombinantes contribuem efetivamente para as propriedades patológicas de ToCMV-[MG-Bt1]-A, esta hipótese permanece como uma possibilidade interessante que pode explicar o mecanismo único de doenças mediadas pelo ToCMV-[MG-Bt1]-A nos hospedeiros permissíveis. Análises

genéticas do DNA-A de ToCMV-[MG-Bt1] estão atualmente em progresso para investigar se a proteína AC4 exerce funções similares à proteína C4 de begomovírus monossegmentados e para determinar a contribuição da proteína do capsídeo e/ou do gene *AC5* para a patogenicidade do vírus.

Epidemias associadas aos geminivírus estão atualmente ameaçando a produção de tomates no Brasil com a proliferação de novas espécies. Essas espécies apresentam regiões recombinantes no seu genoma que são, provavelmente, responsáveis pela natureza mais agressiva devido à aptidão aumentada das progênes recombinantes (Galvão *et al*, 2003). Os resultados dessa investigação forneceram evidências conclusivas de que uma forma variante do DNA-A de ToCMV, possivelmente de origem recombinante, apresenta propriedades biológicas singulares, apesar de possuir organização genômica similar ao DNA-A de geminivírus bissegmentados do hemisfério ocidental. Os resultados do presente trabalho reforçam o papel significativo de eventos de recombinação na evolução dos geminivírus, na sua diversidade e emergência como patógenos economicamente importantes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAGÃO, F.J.L.; VIANNA, G.R.; ALBINO, M.M.C.; DIAS, B.B.A. FARIA, J.C. Transgênico resistente a geminivirus. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, p.22-26, 2000.
- AZZAM, O., FRAZER; J., De La ROSA, D., BEAVER, J.S., AHLQUIST, P.; MAXWELL, D. P. Whitefly transmission and efficient ssDNA accumulation of bean golden mosaic geminivirus require functional coat protein. **Journal of General Virology**, v.204, p.289-296, 1994.
- BASS, H.W.; NAGAR, S.; HANLEY-BOWDOIN, L.; ROBERTSON, D. Chromosome condensation induced by geminivirus infection of mature plant cells. **Journal Cell. Sci.** V.113, p.1149-1160, 2000.
- BISARO, D.M.; HAMILTON, W.D.O.; COUTTS, R.H.A.; BUCK, K.W. Molecular cloning and characterization of the two DNA components of tomato golden mosaic virus. **Nucleic Acids Research**, v.10, p.4913-4922, 1982.
- BROWN, J. K.; BIRD, J. Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean basin. **Plant Disease**, v.76, p.220-225, 1992.
- BURAGOHAIM, A.K.; SUNG, Y.K.; COFFIN, R.S. & COUTTS, R.H.A. The infectivity of dimeric potato yellow masais geminivirus clones in different host. **Journal of General Virology**, v.75, p.2857-2861, 1994.
- CHATCHAWANKANPHANICH, O.; MAXUELL, P.D. *Tomato leaf curl Karnataka virus* from Bangarole, India, Appears to be Recombinant Begomovirus. **Journal of General Virology**, v.92, n.6, p.637-645, 2002.
- COELHO, P.; RODRIGUES, R.; GARCIA, E.; VAZQUEZ-RAMOS, J.M. A DNA polymerase from maize axes : its purification and possible role. **Plant Molecular Biology**, v.20, p.1159-1168, 1992.
- DAVIES, J.W.; STANLEY, J. Geminivirus genes and vectors. **Trends Genet**, v.5, p.77-81, 1989.
- DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B..A plant DNA minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.1, p.19-21, 1983.

- DENG, D.; OTIM-NAPE, W.G.; SANGARE, A.; OGWAL, S.; BEACHY, R.N.; FAUQUET, C.M. Presence of a new virus closely related to east African cassava mosaic geminivirus, associated with cassava mosaic outbreak in Uganda. **African Journal of Root Tuber Crops**, v.2, p.23-28, 1997.
- DESBIEZ, C.; DAVID, C.; METTOUCHI, A.; LAUFS, J.; GRONENBORN, B. Rep protein of tomato yellow leaf curl geminivirus has the ATPase activity required for viral DNA replication. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.92, p.5640-5644, 1995.
- DONSON, J.; MORRIS-KRSINICH, B.A.M.; MULLINEAUX, P.M.; BOULTON, M.I.; DAVIES, J.M. A putative primer for second-strand DNA synthesis of maize streak virus is virion associated. **The EMBO Journal**, v.3, p.3069-3073, 1984.
- DRY, I.B.; RIGDEN, J.E.; KRALE, L.R.; MULLINEAUX, P.M.; REZAIAN, M.A. Nucleotide sequence and genome organization of tomato leaf curl geminivirus. **Journal of General Virology**, v.74, p.147-151, 1993.
- EGELKROUT, E.M.; ROBERTSON, D.; HANLEY-BOWDOIN, L. Proliferating cell nuclear antigen transcription is repressed through a E2F consensus element and activated by geminivirus infection in mature leaves. **Plant Cell**, v.13, p.1437-1452, 2001.
- ELMER, J.S.; BRAND, L.; SUNTER, G.; GARDINER, W.; BISARO, D.M.; ROGERS, S.G. Genetic analysis of the tomato golden mosaic virus. II. The product of the AL1 coding sequence is required for replication. **Nucleic Acids Research**, v.16, p.7043-7060, 1988.
- FARIA, J.C.; GILBERTSON, R.L.; HANSON, S.F.; MORALES, F.J.; AHLQUIST, P.; LONIELLO, A.O., AND MAXWELL, D.P. Bean golden mosaic geminivirus type II isolates from the Dominican Republic and Guatemala: Nucleotide sequences, infectious pseudorecombinants, and phylogenetic relationships. **Phytopathology**, v.84, p.321-329, 1994.
- FARIA, J.C.; ZERBINI, F.M. Família Geminiviridae-taxonomia, replicação e movimento. **RAPP**, v.8, p.27-57, 2000.
- FONDONG, V.N.; PITA, J.S.; REY, M.E.C.; De KOCHKO, A.; BEACHY, R.N.; FAUQUET, C.M. Evidence of synergism between African cassava mosaic virus and a new double-recombinant geminivirus infecting cassava in Cameroon. **Journal of General Virology**, v.81, p.287-297, 2000.
- 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. **The Journal of Biological Chemistry**, v.26, p.8459-8465, 1994a.
- FONTES, E.P.B.; GLADFELTER, H.J.; SCHAFFER, R.L.; PETTY, I.T.D.; HANLEY-BOWDOIN, L. Geminivirus replication origins have a modular organization. **Plant Cell**, v.6, p.405-416, 1994b.
- 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.

- FRISCHMUTH, T., STANLEY, J. Recombination between viral DNA and the transgenic coat protein gene of African cassava mosaic geminivirus. **Journal of General Virology**, v.79, p.1265-1271, 1998.
- GALVÃO, R.M.; MARIANO, A.C.; LUZ, D.F.; ALFENAS, P.F.; ANDRADE, E.C.; ZERBINI, M.F.; 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**, no prelo, 2003.
- GLADFELTER, H.J.; EAGLE, P.A.; FONTES, E.P.B. & HANLEY-BOWDOIN, L. Two domains of the AL1 protein mediate geminivirus origin recognition. **Journal of General Virology**, v.239, p.186-197, 1997.
- GRÖNING, B.R.; HAYE, R.J.; BUCK, K.W. Simultaneous regulation of tomato golden mosaic virus coat protein and AL1 gene expression: Expression of the AL4 gene may contribute to suppression of the AL1 gene. **Journal of General Virology**, v.75, n.4, p.721-726, 1994.
- HAMILTON, W.D.O.; BISARO, D.M.; COUTTS, R.H.A.; BUCK, K.W. Demonstration of the bipartited nature of the genome of a single-stranded DNA plant virus by infection with the cloned DNA components. **Nucleic Acids Research**, v.11, p.7387-7396, 1983.
- HANLEY-BOWDIN, L.; SETTLAGA, 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.1, p.71-106, 1999.
- HANLEY-BOWDOIN, L.; ELMER, J.S.; ROGERS, S.G. Expression of functional replication protein from tomato golden mosaic virus in transgenic tobacco plants. **Proceedings of the National Academy of Science the USA**, v. 87, p.1446-1450, 1990.
- 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.
- JUPIN, I.; DE KOUCHKOVSKY, F.; JOUANNEAU, F.; GRONENBORN, B. Movement of tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV): Involvement of the protein encoded by ORF C4. **Journal of General Virology**, v.204, p.82-90, 1994.
- KALLENDER, H.; PETTY, I.T.D.; STEIN, V.E.; PANICO, M.; BLENCH, I.P.; ETIENNE, A.T.; MORRIS, H.R.; COUTTS, R.H.A.; BUCK, K.W. Identification of the coat protein gene of tomato golden mosaic virus. **Journal of General Virology**, v.69, p.1351-1357, 1988.
- KHEYR-POUR, A.; BANANEJ, K.; DAFALLA, A.G.; CACIAGLI, P.; NORIS, E.; AHOONMANESH, A.; LECOQ, H.; GRONENBORN, B. *Watermelon chlorotic stunt virus* from the Sudan and Iran: sequence comparisons and identification of a whitefly-transmission determinant. **Journal of General Virology**, v. 90, p.629-635, 2000.

- KHEYR-POUR, A.; BENDAHMANE, M.; MATZEIT, V.; ACCOTO, G.P.; CREPSI, S.; GRONENBORN, B. Tomato yellow leaf curl virus from Sardinia is a whitefly-transmitted monopartite geminivirus. **Nucleic Acids Research**, v.19, p.6763-6769, 1991.
- KIM, K.S.; SHOCK, T.L.; GOODMAN, R.M. Infection of *Phaseolus vulgaris* by bean golden mosaic virus: ultrastructural aspects. **Journal of General Virology**, v. 89, p.22-33, 1978.
- KLINKENBERG, F.A. & STANLEY, J. Encapsidation and spread of African cassava mosaic virus DNA A in the absence of DNA B when agroinoculated to *N. benthamiana*. **Journal of General Virology**, v.71, p.1409-1412, 1990.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LAUFS, J.; TRAUT, W.; HEYRAUD, F.; MATZEIT, V.; ROGERS, S.G.; CHELL, J.; GRONENBORN, B. *In vitro* cleavage and joining at the viral origin of replication by the replicator initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. **Proceeding of the National Academic of Science of the USA**, v.92, p.3879-83, 1995.
- LAZAROWITZ, S.G. Geminiviruses: genome structure and gene function. **Critical Reviews in Plant Science**, v.11, p.327-349, 1992.
- LAZAROWITZ, S.G.; WU, L.C.; ROGERS, S.G.; ELMER, J.S. Sequence-specific interaction with the viral AL1 protein identifies a geminivirus DNA replication origin. **Plant Cell**, v.4, p.799-809, 1992.
- LUCAS, W.L.; GILBERTSON, R.L. Plasmodesmata in relation to viral movement within leaf tissues. **Annual Review Phytopathology**, v.3, p.387-411, 1994.
- LUCY, A.P.; BOULTON, M.J.; DAVIES, J.W.; MAULE, A.J. Tissue specificity of *Zea mays* infection by *Maize streak virus*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.9, p.22-31, 1996.
- MACHADO, J.J. **Caracterização Molecular de uma Nova Espécie de Geminivírus e Análise de Infectividade dos Genomas Virais Clonados**. Dissertação de mestrado em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 69p., 2000.
- MARTIN, D.P. & RYBICKI, E.P. RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. **Bioinformatics**, v.16, p.562-563, 2000.
- MARTIN, D.P. WILLMENT, J.A.; BILHARZ, R.; VELDERS, R.; ODHIAMBO, B.; NJUGUNA, J.; JAMES, D. & RYBICKI, E.P. Sequence diversity and virulence in *Zea mays* of Maize streak virus isolates. **Journal of General Virology**, v.288, p.247-255, 2001.
- MAYO, M.A. PRINGLE, C.R. Virus taxonomy-1997. **Journal of General Virology**, v.79, n.649-657, 1998.
- 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.

- MULLINEAUX, P. M.; RIGDEN, J.E.; DRY, I.B., KRALE, L.R., REZAIN, M.A. Mapping of the polycistronic RNAs of tomato leaf curl geminivirus. **Journal of General Virology**, v.193, p.414-423, 1993.
- 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.
- NAVOT, N.; PICHERSKY, E.; ZEIDAN M.; ZAMIR, D.; CZOSNEK, H. Tomato yellow leaf curl virus: a whitefly-transmitted geminivirus with a single genomic component. **Journal of General Virology**, v.185, p.151-161, 1991.
- NOUEIRY, A.O.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmatal transport. **Plant Cell**, v.76, p.925-932, 1994.
- OROZCO, B.M.; GLADFELTER, H.J.; SETTLAGE, S.B.; EAGLE, P.A.; GENTRY, R.; HANLEY-BOWDOIN, L. Multiple cis elements contribute to geminivirus origin function. **Journal of General Virology**, v.242, p.346-356, 1998.
- OROZCO, B.M.; HANLEY-BOWDOIN, L. A DNA structure is required for geminivirus replication origin function. **Journal of General Virology**, v.70, n.01, p.148-158, 1996.
- PADIDAM, M.; BEACHY, R.N.; FAUQUET, C.M. Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. **Journal of General Virology**, v.76, p.249-263, 1995.
- PADIDAM, M.; SAWYER, S.; FAUQUET, C.M. Possible emergence of new geminivirus by frequent recombination. **Journal of General Virology**, v.265, p.218-225, 1999.
- PALMER, k. E; RYBICKI, E. P. The molecular biology of mastrevirus. **Advancing Virus Research**, v.50, p.183-234, 1998.
- 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. & PETY, I.T.D. Tomato mosaic virus open reading frame AL4 is genetically distinct from its C4 analogue in monopartite geminivirus. **Journal of General Virology**, v.77, p.1947-1951, 1996.
- RIBEIRO, S.G.; ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; FERNANDES, J.; FARIA, J.C.; LIMA, M.F.; GILBERTSON, R.L.; ZAMBOLIM, E.M.; ZERBINI, F.M. Widespread occurrence of tomato geminiviruses in Brazil, associated with the new biotype of the whitefly vector. **Plant Disease**, v.82, p.830, 1998.
- RIGDEN, J.E., KRALE, L.R., REZAIAN, M.A. & DRY, I.B. ORF C4 of tomato curl geminivirus is a determinant of symptom severity. **Journal of General Virology**, v. 204, p.847-850, 1994.
- RIGDEN, J.E.; DRY, I.B.; MULLINEAUX, P.M. & REZAIN, M.A Mutagenesis of the virion-sense open reading frames of tomato leaf curl geminivirus. **Journal of General Virology**, v.193, p.1001-1005, 1993.

- ROJAS, M.; GILBERTSON, R.L.; RUSSEL, D.R.; MAXWELL, D.P. Used of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease**, v.77, p.340-347, 1993.
- RUSHING, A.E.; SUNTER, G.; GARDINER, W.E., DUTE, R.R.; BISARO, D.M. Ultrastructural aspect of tomato golden mosaic virus infection in tobacco. **Phytopathology**, v.77, p.1231-1236, 1987.
- RYBICKI, E.P. A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of geminiviridae. **Archives of Virology**, v.139, n.1-2, p.49-77, 1994.
- RYBICKI, E.P.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; FAUQUET, C.M.; MAXWELL, D.P.; STANLEY, J.; HARRISON, B.D.; MARKHAM, P.G.; BISARO, D.M.; ROBINSON, D. Family Geminiviridae. **In Virus Taxonomy Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Editado por Van Regenmortel, M.H.V.; et al., New York: Academic Press, p.285-297, 2000.
- SAMBROOK, J.; FRISTSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning - A laboratory manual**. 2nd Edition, New York: Cold Spring harbor Laboratory press, 1989, 202p.
- SANDERFOOT, A.A.; LAZAROWITZ, S.G. Getting it together in plant virus movement cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. **Trends in Cell Biology**, v.6, p.353-358, 1996.
- SAUNDERS, K.; SALIM, N.; MALI, V.R.; MALATHI, V.G.; BRIDDON, R.; MARKHAM, P.G. & STANLEY, J. Characterisation of Sri Lankan Cassava Mosaic Virus and Indian Cassava Mosaic virus: Evidence for acquisition of a DNA b component by a monopartite begomovirus. **Journal of General Virology**, v.293, p.63-74, 2002.
- SETTLAGE, S.B.; MILLER, A.B.; HANLEY-BOWDOIN, L. Dual interaction of a geminivirus replication accessory factor with a viral replication protein and a plant cell cycle regulator. **Journal of General Virology**, v.279, p.570-576, 2000.
- SIMONE, G.W.; BROWN, J.K.; HIEBERT; CULLEN, R.E. New geminivirus epidemics in Florida tomatoes and peppers. **Phytopathology**, v.80, p.1063, 1990.
- STANLEY, J.; GAY, M. R. Nucleotide sequence of cassava latent virus DNA. **Nature**, v.301, p.261-269, 1983.
- STANLEY, J. Analisis of African cassava masaic virus recombinants suggests strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. **Journal of General Virology**, v.206, p.707-712, 1995.
- SUNTER, G.; BISARO, D.M. Transactivation in a geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. **Plant Cell**, v.4, p.1321-1331, 1992.
- SUNTER, G.; BISARO, D.M. Transactivation in a geminivirus: AL2 gene product in needed for coat protein expression. **Journal of General Virology**, v.180, p.416-419, 1991.

- SUNTER, G.; HARTITZ, M.D.; HORMUDZI, 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. **Journal of General Virology**, v.179, p.69-77, 1990.
- TIMMERMANS, M. C. P.; DAS, O. P.; MESSING, J. Geminiviruses and their uses extrachromosomal replication. **Annual Review of Biochemistry and Molecular Biology**, v.45, p.79-112, 1994.
- TOWNSEND, R.; STANLEY, J.; CURSON, S.J. ; SHORT, M.N. Major polyadenylated transcripts of cassava latent virus and location of the gene encoding coat protein. **The EMBO Journal**, v.4, p.33, 1985.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M; BISHOP, D.H.L.; CASTENS, E.; ESTES, M.K.; LEMON, S.; MANILOFF, J.; MAYO, J.A.; MCGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R; WICKNER, R. **Virus taxonomy: Seventh report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses**. Academic Press - New York, 1121p., 2000.
- WARTING, L.; KHEYR-POUR,A.; NORIS, E.; KOUCHKOVSKY, F.; JOUANNEAU, F.; GRONENBORN, B. & JUPIN, I. Genetic analysis of the Tomato yellow leaf curl geminivirus: roles of V1, V2 and C2 ORFS in viral pathogenesis. **Journal of General Virology**, v.288, p.132-140, 1997.
- ZHOU, X.; LIU, Y.; CALVERT, L.; MUNOZ, C.; OTIM-NAPE, G.W.; ROBINSON, D.J.; HARRISON, B.D. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. **Journal of General Virology**, v.78, p.2101-2111, 1997.