

**ADRIANA GONÇALVES MOREIRA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE DOIS BEGOMOVÍRUS QUE INFECTAM  
SOJA (*Glycine max* L. Merrill) E CONSTRUÇÃO DE UM VETOR VIRAL PARA  
INDUÇÃO DE SILENCIAMENTO GÊNICO**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2005**

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

T

M838c  
2005  
Moreira, Adriana Gonçalves, 1979-  
Caracterização molecular de dois begomovírus que infectam soja (*Glycine max* L. Merrill) e construção de um vetor viral para indução de silenciamento gênico / Adriana Gonçalves Moreira. – Viçosa : UFV, 2005. ix, 67f. : il. ; 29cm.

Orientador: Francisco Murilo Zerbini Júnior.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Begomovírus. 2. Clonagem molecular. 3. Vetores de clonagem. 4. DNA recombinante. 5. Geminivírus. 6. Soja – Doenças e pragas. 7. Tomate – Doenças e pragas. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 571.9928

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Valdir Araújo Moreira e Elisabet Gonçalves Moreira, pelo apoio e incentivo permanente na busca de conhecimento, mesmo à distância, e sempre acreditando no meu trabalho e no meu potencial. Aos meus irmãos, Paulo Emílio e Juliana, por sempre “torcerem” pelo meu trabalho.

Ao professor F. Murilo Zerbini pela orientação, valiosos ensinamentos e confiança depositada.

Ao Departamento de Fitopatologia e à Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade da realização do curso de Mestrado. À CAPES (Ministério da Educação) pela concessão da bolsa.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia que colaboraram com meus estudos e trabalho.

Aos amigos do laboratório pela amizade e conhecimentos, principalmente às grandes “Atanas” por todos os ótimos momentos compartilhados. Ao Eduardo C. de Andrade pelas inúmeras sugestões. Ao estagiário Carlos De Ocesano Pereira, que se mostrou amigo, questionador e ótimo ajudante para a realização deste trabalho. Ao Alison T. M. de Lima pela grande assistência nos ensaios de biobalística. Aos amigos do mestrado pela força, coragem e perseverança.

Aos amigos por serem a extensão da minha família, sempre me apoiando e me acolhendo em todos os momentos, com risos e conselhos. Ao meu amor, sempre ao meu lado.

A todos que, de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

ADRIANA GONÇALVES MOREIRA, filha de Valdir Araújo Moreira e Elisabet Gonçalves Moreira, nasceu em 8 de março de 1979, em Petrolina, estado de Pernambuco.

Terminou o segundo grau na “Goshen High School”, nos Estados Unidos da América, no estado de Indiana em 1997. Ingressou na Universidade Federal de Viçosa em 1998, graduando-se como Engenheira Agrônoma em março de 2003. Neste mesmo ano ingressou no programa de mestrado em Fitopatologia, na mesma universidade, com área de concentração em Fitovirologia. Em fevereiro de 2005 submeteu-se à defesa de tese de Mestrado.

## CONTEÚDO

Resumo.....	vi
Abstract .....	viii
Introdução e Revisão de Literatura.....	1
Família <i>Geminiviridae</i> .....	1
O gênero <i>Begomovirus</i> .....	2
Geminivírus em soja no Brasil .....	6
Geminivírus em tomateiro .....	8
Silenciamento gênico induzido por vírus .....	10
Literatura Citada.....	14
Capítulo 1 - Caracterização molecular parcial de dois begomovírus que infectam soja ( <i>Glycine max</i> L. Merrill) e plantas daninhas associadas .....	21
Resumo.....	22
Abstract .....	23
Introdução.....	24
Material e Métodos.....	25
Coleta de amostras e detecção viral via PCR .....	25
Caracterização molecular.....	26
Análise filogenética .....	27
Resultados .....	27
Detecção viral via PCR.....	27
Clonagem molecular do genoma viral.....	27
Seqüenciamento dos componentes genômicos virais.....	28
Análise filogenética .....	29
Discussão.....	29
Literatura Citada.....	32
Capítulo 2 - Construção de um vetor viral baseado em um begomovírus para indução de silenciamento gênico em plantas de soja e tomateiro.....	50
Resumo.....	51
Abstract .....	52
Introdução.....	52
Material e Métodos.....	54
Isolado viral .....	54

Construção do vetor viral .....	54
Teste de infectividade .....	55
Resultados .....	55
Construção do vetor viral .....	55
Teste de infectividade .....	56
Discussão.....	56
Literatura Citada.....	57

## RESUMO

MOREIRA, Adriana Gonçalves, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2005.  
**Caracterização molecular de dois begomovírus que infectam soja (*Glycine max* L. Merrill) e construção de um vetor viral para indução de silenciamento gênico.**  
Orientador: Francisco Murilo Zerbini Junior. Conselheiros: Murilo Geraldo de Carvalho e Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

A família *Geminiviridae* é caracterizada pelo aspecto geminado da partícula viral e genoma composto por DNA circular de fita simples, com aproximadamente 2.600 nucleotídeos. É dividida em quatro gêneros, de acordo com o tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros, organização do genoma e relacionamento filogenético. Os begomovírus possuem dois componentes genômicos, são transmitidos por mosca-branca e infectam espécies dicotiledôneas. No Brasil há diversos relatos de begomovírus causando sérias perdas nas culturas do feijoeiro e tomateiro. Embora a importância econômica dos begomovírus em soja seja secundária, a ocorrência desses patógenos nesta cultura é preocupante. Duas possíveis novas espécies de begomovírus, denominadas “vírus A” e “vírus B” foram isoladas e clonadas a partir de plantas de soja. Obteve-se a sequência completa de nucleotídeos do DNA-B do “vírus A”, e uma sequência parcial do DNA-A do “vírus B”. A comparação de sequências e análise filogenética indica que o DNA-B do “vírus A” possui a máxima correspondência nucleotídica com o isolado B3 do *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV), e o DNA-A do “vírus B” com o isolado A2 do SimMV. Entretanto os níveis de identidade são baixos, indicando que ambos os vírus realmente devem constituir novas espécies de begomovírus. Vírus de plantas, incluindo os begomovírus, têm sido utilizados com sucesso na construção de

vetores para a indução de silenciamento gênico. Entretanto, existem poucos vetores eficientes para a inoculação em plantas de tomate e não há relatos para plantas de soja. Os dois componentes genômicos do *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) encontram-se completamente seqüenciados e, o DNA-A foi utilizado para a construção do vetor viral pToR-A1.4 CP. A estratégia utilizada foi a construção de um clone infeccioso sem o gene da proteína capsidial, substituído por um sítio múltiplo de clonagem para 9 enzimas de restrição derivado do vetor pKS+. Este vetor viral baseado no ToRMV será um complemento e uma alternativa em estudos de genômica funcional de tomateiro e de soja, na análise de genes envolvidos em vários processos biológicos.

## ABSTRACT

MOREIRA, Adriana Gonçalves, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February, 2005.  
**Molecular characterization of two begomoviruses that infect soybean (*Glycine max* L. Merrill) and the construction of a viral vector for induction of gene silencing.**  
Advisor: Francisco Murilo Zerbini Júnior. Committee Members: Murilo Geraldo de Carvalho and Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

The *Geminiviridae* is a family of plant viruses characterized by twinned icosahedral viral particles and a circular single-stranded DNA genome, with approximately 2.600 nucleotides. It is divided into four genera according to the type of insect vector, host range, genomic organization and phylogenetic relationships. Begomoviruses have two genomic components, are transmitted by whitefly and infect dicotyledoneous species. In Brazil, begomoviruses cause serious losses in tomato and bean crops. Although the economic importance of the begomoviruses in soybean is secondary, the presence of these pathogens in this crop is cause of concern. Two possible new begomovirus species, named “virus A” and “virus B”, were isolated and cloned from soybean plants. The complete nucleotide sequence of the DNA-B from “virus A” and a partial sequence of the DNA-A from “virus B” were obtained. Sequence comparisons and phylogenetic analysis indicated that the DNA-B from “virus A” has a maximum nucleotide identity with the isolate B3 from *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV), and that the DNA-A from “virus B” with the isolate A2 from SimMV. However, identity levels are low, indicating that both viruses could actually comprise novel begomovirus species. Plant viruses, including begomoviruses, have been used with success for the construction of vectors for the induction of gene silencing. However, there are few

effective vectors for inoculation into tomato plants and none for soybean plants. Both genomic components of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) have been completely sequenced and, the DNA-A was used for the construction of the viral vector pToR-A1.4 CP. The strategy used was the construction of an infectious clone without the capsid protein gene, replaced by a multiple cloning site for 9 restriction enzymes, derived from the pKS+ plasmid vector. This viral vector will be a complement and an alternative in functional genomics of tomato and soybean plants, in the analysis of genes involved in various biological processes.

## INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

### **Família *Geminiviridae***

*Geminiviridae* é uma família de vírus de plantas que infectam diversas culturas agrícolas economicamente importantes distribuídas principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Os geminivírus têm despertado grande interesse devido ao aumento da incidência e da severidade de doenças por eles causados nas últimas décadas (Polston & Anderson, 1997; Faria & Zerbini, 2000; Morales & Anderson, 2001).

A família *Geminiviridae* é caracterizada pelo aspecto geminado da partícula viral, contendo o genoma composto por DNA circular de fita simples (ssDNA), com 2.500 a 3.000 nucleotídeos (nt), encapsidado por uma única proteína estrutural que se arranja na forma de 22 capsômeros formando dois icosaedros incompletos com cerca de 18×30 nm (Lazarowitz, 1992; Rybicki, 1994; Zhang *et al.*, 2001). Com base no número de componentes, organização do genoma, inseto vetor, gama de hospedeiros e relacionamento filogenético, o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) divide a família *Geminiviridae* em quatro gêneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus* (Van Regenmortel *et al.*, 2000).

Os *Mastrevirus* incluem geminivírus com um componente genômico, que infectam plantas monocotiledôneas e são transmitidos por cigarrinhas (Homoptera:Cicadellidae). O *Maize streak virus* (MSV) é a espécie-tipo. Este gênero inclui alguns patógenos importantes de culturas como o milho e o trigo. Nenhuma espécie deste gênero foi relatada até o presente no Brasil. O gênero *Curtovirus* é constituído de espécies com um único componente genômico, transmitidas por cigarrinhas a plantas dicotiledôneas. O *Beet curly top virus* (BCTV) é a espécie-tipo. Em *Topocuvirus* há também um só componente genômico, os vírus

são transmitidos por cigarrinhas (Homoptera: Auchenorrhyncha) e infectam dicotiledôneas. Há apenas uma espécie, o *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV). O sequenciamento completo do genoma indicou que a espécie surgiu da recombinação entre um ancestral do BCTV e um vírus sem semelhança com qualquer outro geminivírus conhecido (Briddon *et al.*, 1996).

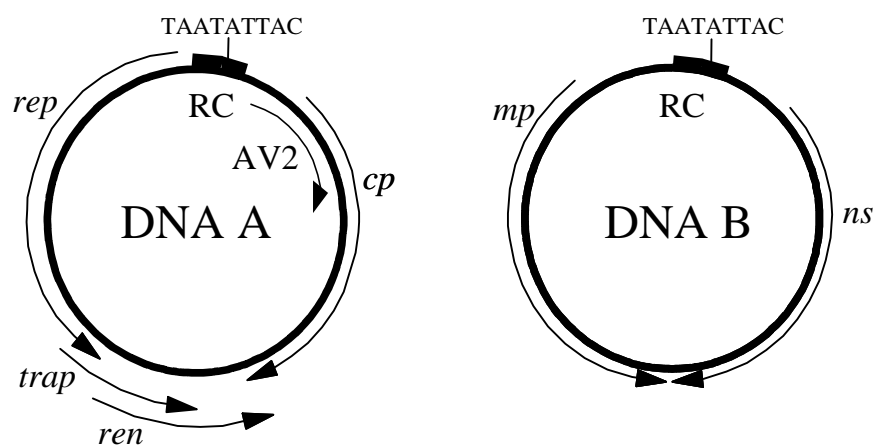
As espécies incluídas no gênero *Begomovirus* apresentam dois componentes genômicos, denominados DNA-A e DNA-B, com exceção de alguns isolados do *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) e do *Ageratum yellow vein virus* (AYVV), e são transmitidas por *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleurodidae) para espécies dicotiledôneas. Cada componente possui aproximadamente 2.600 nt e é encapsidado separadamente em partículas geminadas, sendo necessárias as duas partículas para que ocorra infecção sistêmica (Stanley, 1983). O *Bean golden mosaic virus* (BGMV) é a espécie-tipo deste gênero. O mosaico dourado do feijoeiro nas Américas (Morales & Anderson, 2001), o enrolamento amarelo das folhas do tomateiro no Mediterrâneo e no Oriente Médio (Monci *et al.*, 2002), o mosaico da mandioca na África (Were *et al.*, 2004) e o enrolamento das folhas do algodoeiro no Paquistão (Briddon, 2003) são exemplos de doenças causadas por begomovírus e que constituem fatores limitantes para a produtividade das respectivas culturas.

### **O gênero *Begomovirus***

As espécies virais classificadas em *Begomovirus* incluem alguns dos principais patógenos de plantas em regiões tropicais e subtropicais do globo (Polston & Anderson, 1997; Morales & Anderson, 2001; Morales & Jones, 2004), ocorrendo em diversas culturas incluindo feijoeiro, soja, tomateiro, pimentão, fumo, algodão e mandioca, bem como em plantas invasoras e ornamentais. Um fator que favoreceu o aumento de sua incidência nas últimas décadas foi o grande aumento populacional de seu inseto vetor, a “mosca-branca” *Bemisia tabaci* (Polston & Anderson, 1997).

O genoma dos begomovírus está disposto em duas unidades de transcrição divergentes, separadas por uma região intergênica que contém a origem de replicação e os promotores da transcrição dos genes virais. Os componentes genômicos de uma mesma espécie viral não possuem identidade de seqüência, exceto por uma região intergênica com aproximadamente 200 nucleotídeos denominada região comum (RC), que é altamente conservada (acima de 90% de identidade para o DNA-A e DNA-B de uma determinada espécie) (Lazarowitz, 1992; Fontes *et al.*, 1994b). A partir da região comum divergem os genes virais, nos sentidos viral e complementar (Figura 1).

O DNA-A dos begomovírus é responsável pela replicação e encapsidamento do genoma viral, enquanto o DNA-B contém os genes requeridos para o movimento célula-a-célula e a longa distância, gama de hospedeiros e desenvolvimento de sintomas (revisado por Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999).



**Figura 1.** Representação esquemática do genoma de um begomovírus típico. Os círculos representam o genoma viral, constituído por dois componentes (DNA-A e DNA-B), cada um com aproximadamente 2.600 nucleotídeos. As setas indicam os genes virais e a direção em que ocorre a transcrição: rep, “replication-associated protein”; trap, “trans-activating protein”; ren, “replication-enhancer protein”; cp, proteína capsidial (“coat protein”); mp, “movement protein”; ns, “nuclear shuttle”. A região comum (RC) também está indicada. A seqüência TAATATTAC, conservada em todos os membros da família *Geminiviridae*, constitui a origem de replicação do genoma viral.

O DNA-A contém de quatro a seis genes. Na fita de sentido viral encontram-se o gene *cp* e a ORF AV2 (ou “precoat”, presente apenas nos begomovírus do hemisfério oriental). Na fita de sentido complementar encontram-se os genes *rep*, *trap* e *ren*. A função do gene *cp* é codificar a proteína do capsídeo viral. Além da montagem da partícula, a proteína capsidial é essencial à transmissão do vírus e determina a especificidade do inseto vetor (Bridson *et al.*,

1990; Hofer *et al.*, 1997). Entretanto, para a maioria dos begomovírus, essa proteína não é necessária para a infecção sistêmica da planta (Gardiner *et al.*, 1988). A ORF AV2 codifica a proteína “precoat”, que está associada à movimentação sistêmica do vírus. O gene *rep* (“replication-associated protein”) codifica a única proteína essencial ao processo de replicação destes vírus (Elmer *et al.*, 1988). A proteína Rep não é considerada uma replicase, mas está associada à replicação do DNA, com propriedade de ligação sítio-específica a DNA de fita simples e dupla (Fontes *et al.*, 1992), clivagem e ligação do DNA em seqüências específicas (Laufs *et al.*, 1995b) e hidrólise de ATP (Desbiez *et al.*, 1995). O gene *ren* (“replication-enhancer protein”) codifica uma proteína acessória à replicação viral. Embora esta proteína não seja essencial no processo de replicação, o DNA viral acumula em quantidade muito maior quando ela se encontra presente (Sunter *et al.*, 1990; Morris *et al.*, 1991; Pedersen & Hanley-Bowdoin, 1994). O produto do gene *trap* (“trans-activating protein”) é uma proteína ativadora da transcrição dos genes localizados no sentido viral em ambas as fitas (*cp* e *ns*) (Sunter *et al.*, 1990; Sunter & Bisaro, 1991; 1992). No DNA-B localizam-se os genes *ns*, no sentido viral, e *mp*, na sentido complementar (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). O gene *mp* codifica a proteína envolvida no movimento célula-a-célula do DNA viral por meio do aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas (Noueiry *et al.*, 1994). O gene *ns* codifica a proteína “nuclear shuttle”, necessária para o tráfego intracelular de DNA viral do núcleo para o citoplasma e vice-versa (Noueiry *et al.*, 1994; Sanderfoot & Lazarowitz, 1995; Sanderfoot *et al.*, 1996).

No processo de infecção e replicação, as partículas virais são inoculadas na planta por meio do inseto vetor, e o genoma viral se desassocia do capsídeo provavelmente de forma espontânea (Lazarowitz, 1992; Palmer & Rybicki, 1998). Em seguida o DNA viral é transportado para o núcleo da célula hospedeira, onde o DNA fita simples (ssDNA) é convertido em um intermediário de fita dupla, denominado forma replicativa ou RF. A maneira como esta conversão ocorre não é conhecida, porém evidências indiretas indicam que é realizada por fatores do hospedeiro, uma vez que os vírions não possuem proteínas com função de DNA polimerase. A RF serve como molde para síntese de novos ssDNA e para os mRNAs virais.

A região comum (RC) possui uma estrutura modular conservada, embora as seqüências de nucleotídeos sejam específicas para cada geminivírus. Nela estão localizados os domínios funcionais específicos para a replicação e as regiões promotoras da RNA polimerase II, responsáveis pela transcrição dos genes virais. A origem de replicação propriamente dita está localizada em uma seqüência em repetição invertida composta predominantemente por

guanina e citosina, que forma uma estrutura conservada (“structurally-conserved element”, SCE) em forma de grampo, com uma alça contendo a sequência conservada 5'-TAATATTAC-3', encontrada em todos os geminivírus (Fontes *et al.*, 1994a; Fontes *et al.*, 1994b; Orozco & Hanley-Bowdoin, 1996; Liu *et al.*, 1997). No início da replicação viral, esse nonanucleotídeo é clivado pela proteína Rep, que atua como uma endonuclease sítio-específica com requerimento de estrutura e de sequência (Fontes *et al.*, 1992; Laufs *et al.*, 1995a; Orozco & Hanley-Bowdoin, 1998). Uma vez realizada a clivagem, o genoma viral é replicado por meio do mecanismo de círculo rolante, semelhante ao utilizado pelos bacteriófagos  $\phi$ X174 e M13, utilizando a RF como molde (Stanley, 1995).

Após a replicação viral na primeira célula infectada, é necessário que o vírus mova para outras células e se espalhe por toda planta através do sistema vascular, para que haja sucesso no processo de infecção. Este movimento no interior do hospedeiro pode ser dividido em dois processos: movimento célula-a-célula via plasmodesmas, e movimento a longa distância, no qual o vírus atinge o sistema vascular, geralmente o floema, e é transportado para toda a planta hospedeira (revisado por Gilbertson & Lucas, 1996). Enquanto a maioria dos mastrevírus e curtovírus permanecem restritos ao floema, os begomovírus podem ser encontrados em diversos tipos de tecidos, incluindo o córtex, mesófilo e epiderme (Timmermans *et al.*, 1994).

A parede celular é a principal barreira à propagação de todos os vírus de plantas. De forma análoga aos demais vírus de plantas, os begomovírus codificam uma proteína não-estrutural, denominada “movement protein” (MP), que se associa à membrana celular e altera a arquitetura dos plasmodesmas, aumentando seu limite de exclusão e permitindo o transporte do DNA genômico viral (Noueiry *et al.*, 1994). Como os begomovírus se multiplicam no núcleo da célula infectada, é necessária uma etapa adicional de transporte, o transporte do núcleo para o citoplasma e vice-versa. Para isto os begomovírus codificam uma segunda proteína de movimento, denominada “nuclear shuttle” (NS). As proteínas MP e NS possuem propriedade de ligação a DNA de fita simples e dupla (Noueiry *et al.*, 1994; Pascal *et al.*, 1994) e atuam de maneira cooperativa, transportando o DNA viral do núcleo para o citoplasma, e em seguida célula-a-célula através dos plasmodesmas (Sanderfoot & Lazarowitz, 1995). As proteínas discriminam o DNA viral com base em sua forma e tamanho, transportando apenas moléculas cujo comprimento situa-se entre 2.000 e 3.000 nucleotídeos (Rojas *et al.*, 1998).

Estudos de mutagênese demonstraram que os mastrevírus e curtovírus requerem a proteína capsidial (CP) para que a infecção sistêmica ocorra (Lazarowitz *et al.*, 1989). Por

outro lado, begomovírus mutantes para o gene CP são capazes de causar infecção sistêmica, embora com sintomas atenuados, em seus hospedeiros originais e no hospedeiro artificial *Nicotiana benthamiana* (Gardiner *et al.*, 1988). Análise de mutantes no gene *cp* dos begomovírus *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) e *Bean golden mosaic virus* (BGMV) em diferentes hospedeiros indicaram que a requisição da CP para infecção sistêmica está relacionada com o grau de adaptação entre o vírus e o hospedeiro (Pooma *et al.*, 1996). O TGMV é bem adaptado a *N. benthamiana* e não requer a CP para a infecção sistêmica neste hospedeiro, ao passo que o BGMV não é bem adaptado em *N. benthamiana*, requerendo a CP para a infecção sistêmica. O oposto ocorre em feijoeiro. Os autores sugerem uma classificação para o movimento de begomovírus *in planta*: (i) movimento local, célula-a-célula, o qual não requer a CP; (ii) movimento sistêmico dependente da CP, que ocorreria em relações de pouca adaptação entre vírus e hospedeiro; (iii) movimento sistêmico independente da CP, que ocorreria em hospedeiros para qual o vírus é bem adaptado.

### **Geminivírus em soja no Brasil**

A cultura da soja (*Glycine max* L. Merrill) é de grande importância para a economia brasileira, consistindo há mais de dez anos no principal produto agrícola da pauta de exportações. Atualmente ocupa mais de 18 milhões de hectares com produção superior a 50 milhões de toneladas (IBGE, 2004). A produção média nacional vem crescendo gradualmente, devido a programas de melhoramento genético de cultivares e ao uso de técnicas mais avançadas de cultivo. Os principais estados produtores são Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná e Rio Grande do Sul, mas a cultura vem se expandindo por todo o país, inclusive nas regiões Norte e Nordeste (IBGE, 2004). Entretanto, a produtividade ainda é prejudicada devido ao grande número de doenças que incidem na cultura. Em anos recentes, o nematóide dos cistos (*Heterodera glycines*) e a ferrugem asiática causada por *Phakopsora pachyrhizi* (Balardin, 2004) são as doenças de maior impacto e que têm causado as maiores perdas na cultura.

Embora os begomovírus não sejam considerados de importância econômica para a cultura da soja no Brasil, existem diversos relatos de sua ocorrência nessa espécie e em plantas daninhas associadas (Mello, 2001; Mello *et al.*, 2002). Além disso, a soja é excelente hospedeira do inseto vetor (Menten & Roston, 1980), o que aumenta os riscos de ocorrência de doenças causadas por begomovírus para a cultura. Uma das espécies que infectam a soja é o *Bean golden mosaic virus* (BGMV), um vírus de grande importância econômica na cultura do feijoeiro em todas as regiões em que ocorre (Faria, 1994). No início da década de 70, o

Brasil era o maior produtor mundial de feijão, com 5 milhões de hectares plantados. Com a expansão da cultura da soja e conseqüente disseminação de *B. tabaci*, que coloniza com grande eficiência este hospedeiro, porém sem causar danos, o BGMV passou a causar perdas severas em cultivares suscetíveis de feijão, particularmente nos meses mais secos do ano, quando as populações do inseto atingem o nível máximo e migram da soja para o feijoeiro. Desta forma, a expansão da cultura da soja no Brasil é indiretamente responsável pelo agravamento da incidência de mosaico dourado em feijoeiro (Menten & Roston, 1980; De Fazio, 1985). A ocorrência do BGMV em soja foi relatada pela primeira vez por Costa *et al.* em 1978 (citado por Mello, 2001) em condições de campo.

Além do BGMV, Costa em 1955 e em 1977 (citados por Mello, 2001) relatou outros dois begomovírus ocorrendo em soja no Brasil, o *Euphorbia mosaic virus* (EuMV) e o *Sida golden mosaic virus* (SiGMV). Entretanto, esses relatos foram baseados na observação de sintomas macroscópicos e na transmissão pelo inseto vetor. Com base apenas em sintomatologia, não é possível a identificação e diferenciação de geminivírus, uma vez que os sintomas variam de acordo com a idade da planta hospedeira, condições ambientais e ocorrência de infecções mistas envolvendo duas ou mais espécies virais. Embora a transmissão por *B. tabaci* permita assegurar que os vírus pertenciam ao gênero *Begomovirus*, a ausência de dados moleculares impossibilita a confirmação da espécie viral em questão. Atualmente, a identificação de espécies de begomovírus é feita com base na comparação de seqüências de nucleotídeos do genoma viral, particularmente do DNA-A (Van Regenmortel *et al.*, 2000). Um isolado viral é classificado em uma determinada espécie quando apresente identidade superior a 89% para a seqüência completa de nucleotídeos do DNA-A (Fauquet *et al.*, 2003).

Recentemente, amostras de soja e de plantas daninhas associadas apresentando sintomas típicos de infecção viral foram coletadas em lavouras comerciais, e a infecção por begomovírus foi confirmada por PCR utilizando-se oligonucleotídeos universais para o gênero (Mello *et al.*, 2000; Mello *et al.*, 2002). Os produtos de PCR foram clonados e seqüenciados, identificando-se quatro espécies: *Leonurus mosaic virus* (LeMV), *Sida mottle virus* (SiMoV) e dois possíveis novos begomovírus, denominados “vírus A” e “vírus B”. O LeMV foi descrito originalmente infectando a planta daninha *Leonurus sibiricus* e o feijoeiro (Faria & Maxwell, 1999), porém ainda não havia sido relatado como capaz de infectar a soja. Da mesma forma, o SiMoV foi detectado em plantas de *Sida* sp. em Minas Gerais (Almeida *et al.*, 1997; Fernandes *et al.*, 1998), mas não havia relatos anteriores de infecção de soja por esse vírus. As duas possíveis novas espécies, “vírus A” e “vírus B”, não apresentaram

identidade nucleotídica significativa com quaisquer outros vírus cujas seqüências encontravam-se disponíveis. Entretanto, as seqüências obtidas eram parciais e a classificação definitiva depende da determinação das seqüências completas do genoma viral.

Desde o primeiro registro de infecção natural da soja pelo BGMV (Costa et al., 1978, citado por Mello, 2001), nenhum relato adicional de infecção por geminivírus havia sido feito nessa cultura no Brasil. A existência de outros begomovírus em soja e em plantas daninhas associadas torna evidente a necessidade de estudos mais detalhados a respeito da incidência desses vírus.

### **Geminivírus em tomateiro**

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é uma das hortaliças de maior importância econômica, cultivado em regiões tropicais e subtropicais durante todo o ano, tanto para consumo *in natura* como para a indústria de processamento. No Brasil cultivam-se anualmente 61 mil hectares de tomate, com uma produção média anual de aproximadamente 2,6 milhões de toneladas e um rendimento médio de 48,7 mil quilos/ha. O Sudeste é a principal região produtora de tomate para consumo *in natura*, sendo São Paulo o estado com maior produção, seguido de Minas Gerais (IBGE, 2004). Além do aspecto econômico, o cultivo do tomateiro é uma atividade de grande importância social como fonte geradora de empregos.

Mais de 40 espécies de geminivírus, a maioria pertencente ao gênero *Begomovirus*, são capazes de infectar o tomateiro. Desde a década de 1980, perdas substanciais têm sido relatadas em diversas regiões das Américas, incluindo-se os EUA (principalmente o estado da Flórida), México, Caribe, América Central e Venezuela, como resultado de infecção por begomovírus (Polston & Anderson, 1997). A incidência pode ser tão severa a ponto de impossibilitar o cultivo comercial em determinadas regiões, a exemplo do *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) na República Dominicana (Salati et al., 2002). No México, diversos geminivírus que infectam tomateiros foram descritos ao longo dos últimos quinze anos (Brown & Nelson, 1988; Brown & Poulos, 1990; Torres-Pacheco et al., 1993; Paplomatas et al., 1994).

O primeiro relato de begomovírus em tomateiro no Brasil foi feito por Costa et al. (1975). Matyis et al. (1975) identificaram o vírus em questão e o denominaram *Tomato golden mosaic virus* (TGMV). Curiosamente, após esse relato inicial, a incidência do TGMV em tomateiro não acompanhou o aumento populacional de *Bemisia tabaci* observado ao longo das décadas de 1970 e 1980. De fato, o TGMV não foi relatado em tomateiros no Brasil

durante mais de 20 anos, até ser encontrado na região de Campos, RJ (Alfenas *et al.*, 1998). Isso provavelmente ocorreu porque o biótipo A de *B. tabaci*, o único relatado no Brasil até 1992, coloniza o tomateiro com baixa eficiência (Bedford *et al.*, 1994).

A partir de 1992, no estado de São Paulo, constatou-se novo biótipo (biótipo B) de *B. tabaci*, provavelmente introduzido pela importação de plantas ornamentais da Europa ou dos EUA (Melo, 1992). Comparado ao biótipo A, o biótipo B de *B. tabaci* apresenta maior grau de adaptação e dispersão, além de gama de hospedeiros muito mais ampla, incluindo solanáceas como o tomateiro e diversas espécies de plantas silvestres e/ou daninhas. A presença do biótipo B no Distrito Federal foi confirmada em 1993, associada a sintomas de infecção por begomovírus em tomateiros para processamento industrial. Esses sintomas incluíam clorose, redução de crescimento, encrespamento das folhas, floração reduzida, frutos com áreas descoloridas e redução do grau brix (Ribeiro *et al.*, 1994; França *et al.*, 1996). A partir de plantas com sintomas típicos, fragmentos de DNA correspondendo aos dois componentes genômicos dos begomovírus foram amplificados via PCR. A seqüência de nucleotídeos nesses fragmentos indicou tratar-se de nova espécie de begomovírus, distinta do TGMV e denominada Tomato chlorotic vein virus (TCIVV) (Bezerra *et al.*, 1996; Ribeiro *et al.*, 2003).

Relatos adicionais de begomovírus em tomateiro foram feitos em São Paulo por Faria *et al.* (1997), que descreveram o *Tomato yellow vein streak virus* (TYVSV), no Rio de Janeiro (Galvão *et al.*, 1997) e na região Nordeste, em amostras de tomateiro provenientes da Bahia (Ribeiro *et al.*, 1996) e de Pernambuco (Bezerra *et al.*, 1997). Em 1997 a doença foi relatada no submédio São Francisco, na época a principal região produtora de tomate para industrialização no Brasil, acarretando perdas de até 100% em diversas áreas e o virtual abandono da tomaticultura intensiva na região (Bezerra *et al.*, 1997). O aparecimento do vírus ocorreu, em todos esses casos, logo após a introdução do biótipo B de *B. tabaci*. Dez anos após o primeiro relato de ocorrência do biótipo B de *B. tabaci* no Brasil, levantamento baseado no seqüenciamento parcial do genoma de begomovírus infectando tomateiros nas regiões Sudeste e Nordeste indicou a existência de pelo menos sete novas espécies associadas à cultura (Ribeiro *et al.*, 2003).

No Triângulo Mineiro, uma nova espécie de begomovírus foi identificada em tomateiros por Rezende *et al.* (1996) e Zerbini *et al.* (1996b). A comparação da seqüência nucleotídica completa dos componentes A e B com as de outros begomovírus comprovou tratar-se de uma nova espécie, denominada *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) (Fernandes *et al.*, 2000; Ribeiro *et al.*, 2003). Levantamento de campo realizado em junho de

2000 nos municípios de Araguari, Indianópolis e Uberlândia indicou a prevalência do ToRMV, detectado em 108 das 148 amostras coletadas e positivas para begomovírus (Fernandes, 2001).

Na Zona Metalúrgica de Minas Gerais, outro begomovírus foi isolado de amostras de tomateiro (Zerbini *et al.*, 1996a) e caracterizado biológica e molecularmente (Ambrozevicius *et al.*, 1999; Andrade *et al.*, 2002). A comparação da seqüência completa de nucleotídeos dos componentes A e B com outros begomovírus (incluindo o TCIVV, ToRMV e TYVSV) demonstrou tratar-se de nova espécie, designada *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMV) (Andrade *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2003). A identidade de seqüência entre o ToCMV e o ToRMV é de aproximadamente 85% para o DNA-A e 80% para o DNA-B, indicando tratar-se de vírus distintos, porém altamente relacionados. Outros isolados do ToCMV foram identificados no Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia e Pernambuco (Ribeiro *et al.*, 2003).

Além do ToRMV e ToCMV, um isolado distinto de begomovírus foi detectado em São Joaquim de Bicas, Minas Gerais, causando sintomas em tomateiros mais severos do que aqueles causados pelo ToCMV e ToRMV. Esse isolado, inicialmente denominado “C12” (Ambrozevicius *et al.*, 2002), foi posteriormente renomeado “MG-Bi2” (Ribeiro *et al.*, 2003) e recentemente foi classificado como pertencente à espécie *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV) (Calegario, 2004).

Após o rápido estabelecimento de novas espécies de begomovírus em tomateiro de 1996 a 2000, algumas dessas espécies vêm se tornando predominantes nas principais regiões produtoras. Em levantamentos realizados em 2002 e 2003, detectou-se a predominância do TYVSV em São Paulo, do ToRMV em Minas Gerais, e do ToRMV e TCIVV em Goiás (Inoue-Nagata *et al.*, 2004; F.M. Zerbini, *dados não publicados*). Entretanto, relatos de novas espécies continuam a ocorrer (Albuquerque *et al.*, 2004; Pires *et al.*, 2004). A detecção de novos begomovírus infectando o tomateiro indica que a emergência e disseminação de novas espécies, muito provavelmente a partir de vírus nativos que infectam ervas daninhas e hospedeiras selvagens, ainda encontra-se em andamento no Brasil.

### **Silenciamento gênico induzido por vírus**

Nos últimos anos vários grupos de pesquisa têm se empenhado no seqüenciamento do genoma de inúmeras espécies de plantas, animais e procariotos. Uma das maiores limitações no estudo funcional destes genomas é a dificuldade de atribuir funções gênicas a uma grande parte das seqüências geradas. O silenciamento gênico constitui uma forma simples e eficiente para estudar genes com funções desconhecidas em plantas e animais (Waterhouse &

Helliwell, 2003; Dorsett & Tuschl, 2004; Miki & Shimamoto, 2004; Paddison *et al.*, 2004). O silenciamento gênico é um mecanismo celular que tem como alvo seqüências específicas de ácidos nucléicos resultando em redução da expressão gênica. O silenciamento pode ocorrer no núcleo em nível transcricional (*transcriptional gene silencing*, TGS), onde está envolvido com alterações no DNA como a metilação (Vaucheret & Fagard, 2001; Matzke *et al.*, 2002), e também no citoplasma, em nível pós-transcricional (*posttranscriptional gene silencing*, PTGS).

O silenciamento gênico pós-transcricional, também denominado silenciamento de RNA, resulta na degradação de uma população de mRNAs de maneira altamente específica em termos de seqüência (Tang *et al.*, 2003; Yu & Kumar, 2003), reduzindo assim o acúmulo de mRNA no citoplasma sem afetar a taxa de transcrição. O silenciamento de RNA pode ser induzido por vírus, transgenes ou genes endógenos e, uma vez ativado, o mRNA correspondente (exógeno e/ou endógeno) é degradado de forma específica (Baulcombe, 2002).

O silenciamento gênico induzido por vírus (*virus-induced gene silencing*, VIGS) é uma alternativa atraente e rápida para o estudo da expressão e função de genes, pois não há necessidade de transformação genética da planta (Peele *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2003). Para obtenção de VIGS, um fragmento do gene de interesse é inserido em um vetor viral, em substituição a genes dispensáveis à infecção sistêmica ou como um gene extra. Após inoculação na planta, o fragmento de interesse é então replicado e disseminado pela planta como parte do vírus recombinante. Uma vez iniciado o processo de silenciamento, o mRNA endógeno correspondente ao fragmento contido no vetor viral é degradado via silenciamento de RNA (Baulcombe, 1999; Lu *et al.*, 2003).

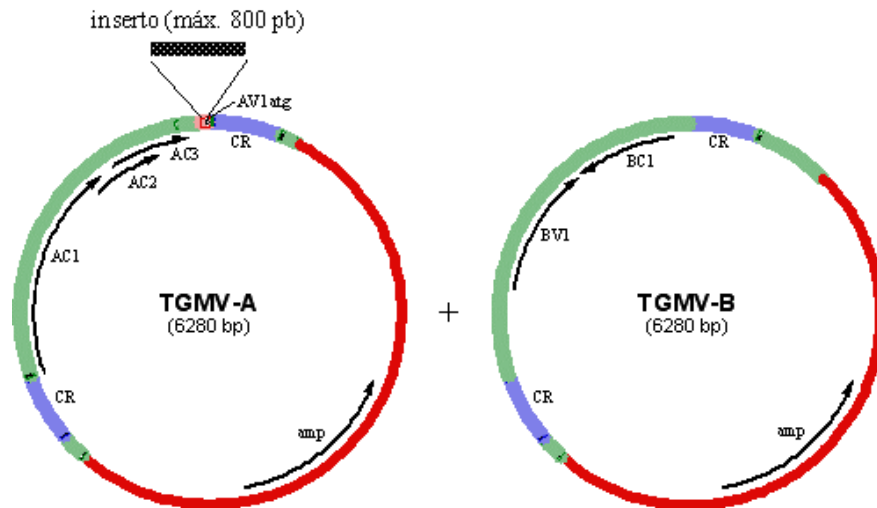
O uso de vetores virais para VIGS apresenta duas grandes vantagens. Em primeiro lugar, é um procedimento rápido: as construções podem ser montadas em alguns dias e o fenótipo de silenciamento pode ser observado entre duas a quatro semanas após a inoculação (Lu *et al.*, 2003). Em segundo lugar, podem ser montados por clonagem direta, não envolvendo a construção na forma de repetições invertidas, as quais podem ser instáveis durante a propagação em *E. coli*. Os vetores para VIGS têm sido freqüentemente empregados em estudos de genética reversa, sendo promissores para plantas difíceis de serem transformadas, caso estas sejam suscetíveis à infecção viral (Robertson, 2004). Além disso, VIGS permite analisar genes que possuem um fenótipo letal uma vez que esse sistema é aplicado em plantas adultas, não havendo morte do embrião como ocorre em sistemas de mutagênese insercional (Baulcombe, 1999).

Para construção de vetores virais podem-se utilizar vírus com genoma composto de RNA, como o potexvírus *Potato virus X* (PVX) (Chapman *et al.*, 1992) e os tobravírus *Tobacco rattle virus* (TRV) (Ratcliff *et al.*, 2001) e *Pea early browning virus* (PEBV) (Constatin *et al.*, 2004), ou de DNA, como os begomovírus *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) (Kjemtrup *et al.*, 1998) (Figura 2), *Cabbage leaf curl virus* (CbLCV) (Turnage *et al.*, 2002) e *African cassava mosaic virus* (ACMV) (Fofana *et al.*, 2004). Genes de plantas podem ser efetivamente silenciados utilizando vetores baseados no TGMV e CbLCV (Kjemtrup *et al.*, 1998; Peele *et al.*, 2001). O TGMV é eficiente para induzir silenciamento em plantas de *Nicotiana benthamiana*, enquanto o CbLCV pode ser utilizado em estudos envolvendo *Arabidopsis thaliana*.

Vetores virais baseados em begomovírus (Figura 2) constituem boas ferramentas para expressão transiente de genes em plantas, por possuírem uma estrutura genética altamente conservada (organização genômica similar entre espécies) e infectarem uma ampla gama de hospedeiros (Turnage *et al.*, 2002; Robertson, 2004). Além disso, possuem genoma pequeno (2.600 a 3.000 nucleotídeos) e movem-se sistemicamente sem necessidade do gene da proteína capsidial, podendo assim carregar um DNA exógeno de aproximadamente 800 a 1.000 nucleotídeos de forma estável, sem afetar significativamente sua replicação ou movimento (Saunders *et al.*, 1991).

*N. benthamiana* é o hospedeiro no qual VIGS tem sido mais utilizado, e a resposta é geralmente mais forte e mais persistente nessa espécie em comparação a outras (Lu *et al.*, 2003). Este fato constitui uma grande limitação, uma vez que o gene em estudo deve ser bem caracterizado e o caminho biossintético em questão deve ser funcional em *N. benthamiana*. Como consequência desta limitação, estudos têm sido feitos em busca de vetores virais eficientes para indução de VIGS em outros hospedeiros.

Até o presente existem apenas dois vetores VIGS que se mostraram promissores em tomateiro, o *Tobacco rattle virus* (TRV) (Liu *et al.*, 2002) e o DNA satélite (DNA  $\beta$ ) associado ao *Tomato yellow leaf curl China virus* isolado Y10 (TYLCCV-Y10) (Tao & Zhou, 2004). Em estudos utilizando o sistema Y10-DNA $\beta$ , VIGS só foi eficiente quando a razão entre o satélite carregando o gene de interesse e o DNA do vírus auxiliar foi a mesma. Porém, para isso foi preciso realizar a construção de dímeros para o gene em estudo. Para plantas de soja, não existem relatos de vetores VIGS. Dessa forma, criação de um sistema VIGS eficiente para a indução de silenciamento gênico em plantas de tomateiro e soja seria de grande utilidade.



**Figura 2.** Representação esquemática do vetor viral pTG1.3AMCS, baseado no begomovírus *Tomato golden mosaic virus* (TGMV). O genoma viral, clonado na forma de 1,5 cópias contendo duas origens de replicação, está representado em verde e azul. O gene da proteína capsidial foi removido do DNA-A. A região em vermelho corresponde ao plasmídeo-base utilizado na construção do vetor. O fragmento do gene em estudo é inserido no DNA-A- $\Delta$ CP, e essa construção é co-inoculada com o DNA-B intacto. Adaptado de Robertson (2004).

## LITERATURA CITADA

- Albuquerque, L.C., Carrijo, F.R.F., Giordano, L.B., Boiteux, L.S., Ávila, A.C., Fonseca, M.E.N., Nagata, T. & Inoue-Nagata, A.K. A new begomovirus species in tomato crop in Central Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 29, p. S218-S219, 2004.
- Alfenas, P.C., Galvão, R.M., Andrade, E.C., Mandelli, M.S., Fernandes, A.V., Zerbini, F.M. & Fontes, E.P.B. Detecção e caracterização molecular de novos geminivírus que infectam tomateiros. *Fitopatologia Brasileira*, v. 23, p. 311, 1998.
- Almeida, J.A., Galvão, R.M., Zerbini, F.M. & Fontes, E.P.B. A new geminivirus identified in the *Sida rhombifolia*-infecting geminivirus complex is probably monopartite. *Brazilian Journal of Genetics*, v. 20, p. G38, 1997.
- Ambrozevicius, L.P., Andrade, E.C., Zambolim, E.M., Fontes, E.P.B. & Zerbini, F.M. Incidence and host range of TGV-Ig, a bipartite *Begomovirus* from the "Zona Metalúrgica" of Minas Gerais, Brazil. *Virus Reviews and Research*, v. 4, p. 155, 1999.
- Ambrozevicius, L.P., Calegario, R.F., Fontes, E.P.B., Carvalho, M.G. & Zerbini, F.M. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 27, p. 372-377, 2002.
- Andrade, E.C., Ambrozevicius, L.P., Calegario, R.F., Fontes, E.P.B. & Zerbini, F.M. Molecular cloning and characterization of *Tomato chlorotic mottle virus* (TCMV), a new tomato-infecting begomovirus. *Virus Reviews and Research*, v. 7, p. 153, 2002.
- Balardin, R.S. Ferrugem asiática da soja. *Fitopatologia Brasileira*, v. 29, p. 18, 2004.
- Baulcombe, D. RNA silencing. *Current Biology*, v. 12, p. 82-84, 2002.
- Baulcombe, D. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 2, p. 109-113, 1999.
- Bedford, I.D., Briddon, R.W., Brown, J.K., Rosell, R.C. & Markham, P.G. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographical regions. *Annals of Applied Biology*, v. 125, p. 311-325, 1994.

- Bezerra, I.C., Lima, M.F., Ribeiro, S.G., Giordano, L.B., Zerbini, F.M. & Ávila, A.C. Occurrence of geminivirus in tomato-producing areas in Submédio São Francisco. *Fitopatologia Brasileira*, v. 22, p. 331, 1997.
- Bezerra, I.C., Ribeiro, S.G., Ávila, A.C. & Giordano, L.B. Survey of geminivirus infection in tomato producing areas in Federal District. VIII Encontro Nacional de Virologia. São Lourenço, MG, p. 289, 1996.
- Bridson, R.W. Cotton leaf curl disease, a multicomponent begomovirus complex. *Molecular Plant Pathology*, v. 4, p. 427-434, 2003.
- Bridson, R.W., Bedford, I.D., Tsai, J.H. & Markham, P.G. Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, tomato pseudo-curly top virus, suggests a recombinant origin. *Virology*, v. 219, p. 387-394, 1996.
- Bridson, R.W., Pinner, M.S., Stanley, J. & Markham, P.G. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology*, v. 177, p. 85-94, 1990.
- Brown, J.K. & Nelson, M.R. Transmission, host range, and virus-vector relationships of chilo del tomate virus, a whitefly-transmitted geminivirus from Sinaloa, Mexico. *Plant Disease*, v. 72, p. 866-869, 1988.
- Brown, J.K. & Poulos, B.T. Serrano golden mosaic virus: A newly identified whitefly-transmitted geminivirus of pepper and tomato in the United States and Mexico. *Plant Disease*, v. 74, p. 720, 1990.
- Calegario, R.F. Caracterização do isolado de begomovírus MG-Bi2, um possível membro da espécie *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV). Tese M.S., Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 48 p., 2004.
- Chapman, S., Kavanagh, T. & Baulcombe, D. Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *Plant Journal*, v. 2, p. 549-557, 1992.
- Constatin, G.D., Krath, B.N., Macfarlane, S.A., Nicolaisen, M., Johansen, E. & Lund, O.S. Virus-induced gene silencing as a tool for functional genomics in a legume species. *Plant Journal*, v. 40, p. 622-631, 2004.
- Costa, A.S., Oliveira, A.R. & Silva, D.M. Transmissão mecânica do mosaico dourado do tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 6, p. 147, 1975.
- De Fazio, G. O mosaico dourado do feijoeiro no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 10, p. 41-48, 1985.
- Desbiez, C., David, C., Mettouchi, A., Laufs, J. & Gronenborn, B. Rep protein of tomato yellow leaf curl geminivirus has an ATPase activity required for viral DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 92, p. 5640-5644, 1995.
- Dorsett, Y. & Tuschl, T. siRNAs: Applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 3, p. 318-329, 2004.
- Elmer, J.S., Brand, L., Sunter, G., Gardiner, W., Bisaro, D.M. & Rogers, S.G. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus. II. The conserved AL1 ORF product is essential for replication. *Nucleic Acids Research*, v. 16, p. 7043-7049, 1988.
- Faria, J.C. Mosaico Dourado. In: Sartorato, A. & Rava, C.A. (Eds.). Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle. Brasília: EMBRAPA, p. 263-284, 1994.
- Faria, J.C. & Maxwell, D.P. Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. *Phytopathology*, v. 89, p. 262-268, 1999.

- Faria, J.C., Souza-Dias, J.A.C., Slack, S. & Maxwell, D.P. A new geminivirus associated with tomato in the State of São Paulo, Brazil. *Plant Disease*, v. 81, p. 423, 1997.
- Faria, J.C. & Zerbini, F.M. Família Geminiviridae - taxonomia, replicação e movimento. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v. 8, p. 25-65, 2000.
- Fauquet, C.M., Bisaro, D.M., Briddon, R.W., Brown, J.K., Harrison, B.D., Rybicki, E.P., Stenger, D.C. & Stanley, J. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family *Geminiviridae*, and an updated list of begomovirus species. *Archives of Virology*, v. 148, p. 405-421, 2003.
- Fernandes, A.V., Andrade, E.C., Alfenas, P.F., Galvão, R.M., Zerbini, F.M. & Fontes, E.P.B. Clonagem e caracterização de novos geminivírus que infectam *Sida rhombifolia*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 23, p. 317, 1998.
- Fernandes, J.J. Caracterização e diversidade genética de geminivírus associados ao tomateiro na região do Triângulo Mineiro. Tese D.S., Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 192 p., 2001.
- Fernandes, J.J., Fontes, E.P.B., Brommonschenkel, S.H., Carvalho, M.G. & Zerbini, F.M. Molecular cloning and sequencing of *Tomato rugose mosaic virus*, a geminivirus isolated from tomatoes at "Triângulo Mineiro", Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 25, p. 440, 2000.
- Fofana, I.B.F., Sangare, A., Collier, R., Taylor, C. & Fauquet, C.M. A geminivirus-induced gene silencing system for gene function validation in cassava. *Plant Molecular Biology*, v. 56, p. 613-624, 2004.
- Fontes, E.P.B., Eagle, P.A., Sipe, P.S., Luckow, V.A. & Hanley-Bowdoin, L. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, p. 8459-8465, 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.
- França, F.H., Villas-Boas, G.L. & Castelo-Branco, M. Ocorrência de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera:Aleyrodidae) no Distrito Federal. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v. 25, p. 369-372, 1996.
- Galvão, R.M., Almeida, J.A., Camini, N., Zerbini, F.M. & Fontes, E.P.B. Molecular detection and biobalistic propagation of novel Malvaceae- and tomato-infecting geminiviruses. *Fitopatologia Brasileira*, v. 22, p. 335, 1997.
- Gardiner, W., Sunter, G., Brand, L., Elmer, J.S., Rogers, S.G. & Bisaro, D.M. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: The coat protein is not required for systemic spread or symptom development. *EMBO Journal*, v. 7, p. 899-904, 1988.
- Gilbertson, R.L. & Lucas, W.J. How do viruses traffic on the "vascular highway"? *Trends in Plant Science*, v. 1, p. 260-268, 1996.
- Hanley-Bowdoin, L., Settlage, S.B., Orozco, B.M., Nagar, S. & Robertson, D. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 18, p. 71-106, 1999.

- Hofer, P., Bedford, I.D., Markham, P.G., Jeske, H. & Frischmuth, T. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. *Virology*, v. 236, p. 288-295, 1997.
- IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp?z=t&o=11>, 2004
- Inoue-Nagata, A.K., Giordano, L.B., Fonseca, M.E.N., Ribeiro, S.G., Ávila, A.C., Albuquerque, L.C. & Boiteux, L.S. Occurrence of begomovirus in tomato and other plants in Central Brazil. 4th International Geminivirus Symposium. Cape Town, South Africa, p. W3-3, 2004.
- Kjemtrup, S., Sampson, K.S., Peele, C., Nguyen, L., Conkling, M., Thompson, W. & Roberson, D. Gene silencing from DNA carried by a geminivirus. *Plant Journal*, v. 14, p. 91-100, 1998.
- Laufs, J., Schumacher, S., Geisler, N., Jupin, I. & Gronenborn, B. Identification of the nicking tyrosine of geminivirus Rep protein. *FEBS Letters*, v. 377, p. 258-262, 1995a.
- Laufs, J., Traut, W., Heyraud, F., Matzeit, G., Rogers, S.G., Schell, J. & Gronenborn, B. *In vitro* cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 92, p. 3879-3883, 1995b.
- Lazarowitz, S.G. Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 11, p. 327-349, 1992.
- Lazarowitz, S.G., Pinder, A.J., Damsteegt, V.D. & Rogers, S.G. Maize streak virus genes essential for systemic spread and symptom development. *EMBO Journal*, v. 8, p. 1023-1032, 1989.
- Liu, H.T., Boulton, M.I. & Davies, J.W. Maize streak virus coat protein binds single- and double-stranded DNA *in vitro*. *Journal of General Virology*, v. 78, p. 1265-1270, 1997.
- Liu, Y., Schiff, M. & Dinesh-Kumar, S.P. Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant Journal*, v. 31, p. 777-786, 2002.
- Lu, R., Martin-Hernandez, A.M., Peart, J.R., Malcuit, I. & Baulcombe, D.C. Virus-induced gene silencing in plants. *Methods*, v. 30, p. 296-303, 2003.
- Matyis, J.C., Silva, D.M., Oliveira, A.R. & Costa, A.S. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. *Summa Phytopathologica*, v. 1, p. 267-275, 1975.
- Matzke, M.A., Aufsatz, W., Kanno, T., Mette, M.F. & Matzke, A.J. Homology-dependent gene silencing and host defense in plants. *Advances in Genetics*, v. 46, p. 235-275, 2002.
- Mello, R.N. Begomovírus em soja no Brasil e ferramentas moleculares para sua identificação. Tese D.S., Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 59 p., 2001.
- Mello, R.N., Almeida, A.M.R. & Zerbini, F.M. Detection and identification of geminiviruses infecting soybean and associated weeds in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 25, p. 444, 2000.
- Mello, R.N., Cotrim, M.A.A., Lopes, E.F., Moreira, A.G., Contin, F.S., Fontes, E.P.B., Almeida, A.M.R. & Zerbini, F.M. Survey of begomoviruses associated with soybean and identification of *Sida mottle virus* (SiMoV) infecting this crop in Brazil. *Virus Reviews and Research*, v. 7(Supplement), p. 157, 2002.

- Melo, P.C.T. Mosca branca ameaça produção de hortaliças. Campinas, SP, Brazil: Asgrow do Brasil Sementes Ltda., Technical Bulletin 1992.
- Menten, J.O. & Roston, A.J. Mosaico dourado e a necessidade da regionalização da cultura do feijoeiro no Estado de São Paulo. *Revista da Agricultura*, v. 55, p. 287-300, 1980.
- Miki, D. & Shimamoto, K. Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. *Plant and Cell Physiology*, v. 45, p. 490-495, 2004.
- Monci, F., Sanchez-Campos, S., Navas-Castillo, J. & Moriones, E. A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Virology*, v. 303, p. 317-326, 2002.
- Morales, F.J. & Anderson, P.K. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology*, v. 146, p. 415-441, 2001.
- Morales, F.J. & Jones, P.G. The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. *Virus Research*, v. 100, p. 57-65, 2004.
- Morris, B., Richardson, K., Eddy, P., Zhan, X., Haley, A. & Gardner, R. Mutagenesis of the AC3 open reading frame of African cassava mosaic virus DNA-A reduces DNA-B replication and ameliorates disease symptoms. *Journal of General Virology*, v. 72, p. 1205-1213, 1991.
- Noueiry, A.O., Lucas, W.J. & Gilbertson, R.L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell*, v. 76, p. 925-932, 1994.
- Orozco, B.M. & Hanley-Bowdoin, L. A DNA structure is required for geminivirus replication origin function. *Journal of Virology*, v. 70, p. 148-158, 1996.
- Orozco, B.M. & Hanley-Bowdoin, L. Conserved sequence and structural motifs contribute to the DNA binding and cleavage activities of a geminivirus replication protein. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, p. 24448-24456, 1998.
- Paddison, P.J., Silva, J.M., Conklin, D.S., Schlabach, M., Li, M.M., Aruleba, S., Balijs, V., O'shaughnessy, A., Gnoj, L., Scobie, K., Chang, K., Westbrook, T., Cleary, M., Sachidanandam, R., McCombie, W.R., Elledge, S.J. & Hannon, G.J. A resource for large-scale RNA-interference-based screens in mammals. *Nature*, v. 428, p. 427-431, 2004.
- Palmer, K.E. & Rybicki, E.P. The molecular biology of mastreviruses. *Advances in Virus Research*, v. 50, p. 183-234, 1998.
- Paplomatas, E.J., Patel, V.P., Hou, Y.M., Noueiry, A.O. & Gilbertson, R.L. Molecular characterization of a new sap-transmissible bipartite genome geminivirus infecting tomatoes in Mexico. *Phytopathology*, v. 84, p. 1215-1224, 1994.
- Pascal, E., Sanderfoot, A.A., Ward, B.M., Medville, R., Turgeon, R. & Lazarowitz, S.G. The geminivirus BR1 movement protein binds single-stranded DNA and localizes to the cell nucleus. *Plant Cell*, v. 6, p. 995-1006, 1994.
- Pedersen, T.J. & Hanley-Bowdoin, L. Molecular characterization of the AL3 protein encoded by a bipartite geminivirus. *Virology*, v. 202, p. 1070-1075, 1994.
- Peele, C., Jordan, C.V., Muangsan, N., Turnage, M., Egelkrot, E., Eagle, P., Hanley-Bowdoin, L. & Robertson, D. Silencing of a meristematic gene using geminivirus-derived vectors. *Plant Journal*, v. 27, p. 357-366, 2001.

- Pires, S.R., Andrade, E.C. & Zerbini, F.M. Detection of a possible new begomovirus species infecting tomato in Minas Gerais state. *Virus Reviews and Research*, v. 9, p. 122, 2004.
- Polston, J.E. & Anderson, P.K. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Disease*, v. 81, p. 1358-1369, 1997.
- Pooma, W., Gillette, W.K., Jeffrey, J.L. & Petty, I.T.D. Host and viral factors determine the dispensability of coat protein for bipartite geminivirus movement. *Virology*, v. 218, p. 264-268, 1996.
- Ratcliff, F., Hernandez Martin, A. & Baulcombe, D. *Tobacco rattle virus* as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant Journal*, v. 25, p. 237-245, 2001.
- Rezende, E.A., Filgueira, F.A.R., Zerbini, F.M., Maciel-Zambolim, E., Fernandes, J.J. & Gilbertson, R.L. Tomato infected with geminivirus in greenhouse conditions at Uberlândia-MG, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 21, p. 424, 1996.
- Ribeiro, S.G., Ambrozevicus, L.P., Ávila, A.C., Bezerra, I.C., Calegario, R.F., Fernandes, J.J., Lima, M.F., Mello, R.N., Rocha, H. & Zerbini, F.M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology*, v. 148, p. 281-295, 2003.
- Ribeiro, S.G., Bezerra, I.C., Lima, M.F., Ávila, A.C. & Giordano, L.B. Occurrence of geminivirus in tomato plants in Bahia. VIII Encontro Nacional de Virologia (Resumos). São Lourenço, MG: SBV, p. 290, 1996.
- Ribeiro, S.G., Mello, L.V., Boiteux, L.S., Kitajima, E.W. & Faria, J.C. Tomato infection by a geminivirus in the Federal District, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 19, p. 330, 1994.
- Robertson, D. VIGS vectors for gene silencing: Many targets, many tools. *Annual Review of Plant Biology*, v. 55, p. 495-519, 2004.
- Rojas, M.R., Noueir, A.O., Lucas, W.J. & Gilbertson, R.L. Bean dwarf mosaic geminivirus movement proteins recognize DNA in a form- and size-specific manner. *Cell*, v. 95, p. 105-113, 1998.
- Rybicki, E.P. A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of Geminiviridae. *Archives of Virology*, v. 139, p. 49-77, 1994.
- Salati, R., Nahkla, M.K., Rojas, M.R., Guzman, P., Jaquez, J., Maxwell, D.P. & Gilbertson, R.L. *Tomato yellow leaf curl virus* in the Dominican Republic: Characterization of an infectious clone, virus monitoring in whiteflies, and identification of reservoir hosts. *Phytopathology*, v. 92, p. 487-496, 2002.
- Sanderfoot, A.A., Ingham, D.J. & Lazarowitz, S.G. A viral movement protein as a nuclear shuttle. The geminivirus BR1 movement protein contains domains essential for interaction with BL1 and nuclear localization. *Plant Physiology*, v. 110, p. 23-33, 1996.
- Sanderfoot, A.A. & Lazarowitz, S.G. Cooperation in viral movement: The geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery. *Plant Cell*, v. 7, p. 1185-1194, 1995.
- Saunders, K., Lucy, A. & Stanley, J. DNA forms of the geminivirus African cassava mosaic virus are consistent with a rolling circle mechanism of replication. *Nucleic Acids Research*, v. 19, p. 2325-2330, 1991.
- Stanley, J. Infectivity of the cloned geminivirus genome requires sequences from both DNAs. *Nature*, v. 305, p. 643-645, 1983.

- Stanley, J. Analysis of African cassava mosaic virus recombinants suggest strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. *Virology*, v. 206, p. 707-712, 1995.
- Sunter, G. & Bisaro, D.M. Transactivation in a geminivirus: AL2 gene product is needed for coat protein expression. *Virology*, v. 180, p. 416-422, 1991.
- Sunter, G. & Bisaro, D.M. Transactivation of geminivirus AR1 and BR2 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. *Plant Cell*, v. 4, p. 1321-1331, 1992.
- Sunter, G., Hartitz, M.D., Hormuzdi, S.G., Brough, C.L. & Bisaro, D.M. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required for coat protein accumulation while ORF AL3 is necessary for efficient DNA replication. *Virology*, v. 179, p. 69-77, 1990.
- Tang, G., Reinhart, B.J., Bartel, D.P. & Zamore, P.D. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes & Development*, v. 17, p. 49-63, 2003.
- Tao, X. & Zhou, X. A modified viral satellite DNA that suppresses gene expression in plants. *Plant Journal*, v. 38, p. 850-860, 2004.
- Timmermans, M.C., Premdas, O.E. & Messing, J. Geminiviruses and their uses as extrachromosomal replicons. *Annual Review of Biochemistry and Molecular Biology*, v. 45, p. 79-112, 1994.
- Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, J.A., Herrera-Estrela, L. & Rivera-Bustamante, R.F. Complete nucleotide sequence of pepper huasteco virus: Analysis and comparison with bipartite geminiviruses. *Journal of General Virology*, v. 74, p. 2225-2231, 1993.
- Turnage, M.A., Muangsan, N., Peele, C.G. & Robertson, D. Geminivirus-based vectors for gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, v. 30, p. 107-114, 2002.
- Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R. & Wickner, R.B., (Eds.) *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Academic Press, 1162 p., 2000.
- Vaucheret, H. & Fagard, M. Transcriptional gene silencing in plants: Targets, inducers and regulators. *Trends in Genetics*, v. 17, p. 29-35, 2001.
- Waterhouse, P.M. & Helliwell, C.A. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nature Reviews Genetics*, v. 4, p. 29-38, 2003.
- Were, H.K., Winter, S. & Maiss, E. Viruses infecting cassava in Kenya. *Plant Disease*, v. 88, p. 17-22, 2004.
- Yu, H. & Kumar, P.P. Post-transcriptional gene silencing in plants by RNA. *Plant Cell Reports*, v. 22, p. 167-174, 2003.
- Zerbini, F.M., Zambolim, E.M., Carrijo, I.V. & Gilbertson, R.L. A new bipartite geminivirus infecting tomatoes in Minas Gerais, Brazil. *Phytopathology*, v. 86, p. S1, 1996a.
- Zerbini, F.M., Zambolim, E.M., Fernandes, J.J., Gilbertson, R.L. & Carrijo, I.V. Um novo geminivírus isolado de tomateiro (*L. esculentum*) em Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira*, v. 21, p. 430, 1996b.
- Zhang, W., Olson, N.H., Baker, T.S., Faulkner, L., Agbandje-Mckenna, M., Boulton, M.I., Davies, J.W. & Mckenna, R. Structure of the *Maize streak virus* geminate particle. *Virology*, v. 279, p. 471-477, 2001.

## CAPÍTULO 1

### **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR PARCIAL DE DOIS BEGOMOVÍRUS QUE INFECTAM SOJA (*Glycine max* L. Merrill) E PLANTAS DANINHAS ASSOCIADAS**

Moreira, A.G.; Pereira, C. de O.; Zerbini, F.M. Caracterização molecular parcial de dois begomovírus que infectam soja (*Glycine max* L. Merrill) e plantas daninhas associadas.

# CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR PARCIAL DE DOIS BEGOMOVÍRUS QUE INFECTAM SOJA (*Glycine max* L. Merrill) E PLANTAS DANINHAS ASSOCIADAS

Adriana G. Moreira, Carlos De Ocesano Pereira e F. Murilo Zerbini

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa MG, 36570-000.

E-mail: [zerbini@ufv.br](mailto:zerbini@ufv.br)

(Aceito para publicação em / / )

Autor para correspondência: F. Murilo Zerbini

---

Moreira, A.G.; Pereira, C. de O.; Zerbini, F.M. Caracterização molecular parcial de dois begomovírus que infectam soja (*Glycine max* L. Merrill) e plantas daninhas associadas.

## RESUMO

*Geminiviridae* é uma família de vírus de plantas caracterizada pelo aspecto geminado da partícula viral e genoma composto por DNA circular de fita simples, com 2.500 a 3.000 nucleotídeos. É dividida em quatro gêneros, de acordo com o tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros, organização do genoma e relacionamento filogenético. Os begomovírus possuem dois componentes genômicos (com algumas exceções), são transmitidos por mosca-branca e infectam espécies dicotiledôneas. No Brasil há diversos relatos de begomovírus causando sérias perdas nas culturas do feijoeiro e tomateiro. Embora a importância econômica dos begomovírus em soja seja secundária, a ocorrência desses patógenos na cultura é preocupante. Recentemente, amostras de soja e de plantas daninhas associadas apresentando sintomas de infecção viral foram coletadas no estado do Paraná. A infecção por begomovírus foi confirmada via PCR, identificando-se duas possíveis novas espécies denominadas “vírus A” e “vírus B”. O objetivo do presente trabalho foi a caracterização molecular destas possíveis novas espécies. O genoma viral foi amplificado utilizando-se a DNA polimerase do fago  $\phi$ 29, clonado e sequenciado. Obteve-se a seqüência completa de nucleotídeos do DNA-B do “vírus

A”, e uma seqüência parcial do DNA-A do “vírus B”. A comparação de seqüências e análise filogenética indica que o DNA-B do “vírus A” possui máxima identidade nucleotídica com o isolado B3 do *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV), e o DNA-A do “vírus B” com o isolado A2 do SimMV. Entretanto os níveis de identidade são baixos, indicando que ambos os vírus devem constituir novas espécies de begomovírus.

**Palavras-chave:** *Begomovirus*, clonagem molecular, soja, *Sida micrantha mosaic virus*.

### ABSTRACT

Partial molecular characterization of two begomoviruses infecting soybean (*Glycine max* L. Merrill) and associated weeds.

*Geminiviridae* is a family of plant viruses characterized by twinned icosahedral particles and a circular single-stranded DNA genome, with 2.500 to 3.000 nucleotides. It is divided into four genera according to the type of insect vector, host range, genomic organization and phylogenetic relationships. Begomoviruses have two genomic components (with a few exceptions), are transmitted by whiteflies and infect dicotyledoneous species. In Brazil, begomoviruses cause serious losses in tomato and bean crops. Although the economic importance of begomoviruses in soybean is secondary, the presence of these pathogens in the culture is cause of concern. Recently, soybean and associated weeds showing symptoms of viral infection were collected in the state of Paraná. Begomovirus infection was confirmed by PCR, identifying two possible new species named “virus A” and “virus B”. The objective of this work was the molecular characterization of these possible new species. The viral genome was amplified using the DNA polymerase from phage  $\phi 29$ , cloned and sequenced. The complete nucleotide sequence of the DNA-B from “virus A” and a partial sequence of the DNA-A from “virus B” were determined. Sequence comparisons and phylogenetic analyses indicated that the DNA-B from “virus A” has a maximum nucleotide identity with the isolate B3 of *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV), and the DNA-A from “virus B” with the isolate A2 from SimMV. However, identity levels are low, indicating that both viruses could actually comprise novel begomovirus species.

Keywords: *Begomovirus*, molecular cloning, soybean, *Sida micrantha mosaic virus*

## INTRODUÇÃO

A família *Geminiviridae* engloba vírus de plantas cujo genoma é composto por DNA circular de fita simples, encapsidado em partículas icosaédricas geminadas (Lazarowitz, 1992). A família é organizada em quatro gêneros (*Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus*), de acordo com o tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros, organização genômica e relacionamento filogenético (Van Regenmortel *et al.*, 2000).

Os begomovírus são transmitidos naturalmente pela “mosca-branca” *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). A maioria das espécies de begomovírus possui dois componentes genômicos, denominados DNA-A e DNA-B. Cada componente possui aproximadamente 2.600 nucleotídeos (nt) e é encapsidado separadamente. Embora os begomovírus não sejam considerados de importância econômica para a cultura da soja no Brasil, existem diversos relatos de sua ocorrência nessa espécie e em plantas daninhas associadas (Mello, 2001; Mello *et al.*, 2002). Além disso, a soja é excelente hospedeira do inseto vetor (Menten & Roston, 1980), o que aumenta os riscos de ocorrência de doenças causadas por begomovírus nesta cultura.

A ocorrência do begomovírus *Bean golden mosaic virus* (BGMV) em soja foi relatada pela primeira vez por Costa *et al.* em 1978 (citado por Mello, 2001) em condições de campo. Além do BGMV, Costa em 1955 e em 1977 (citados por Mello, 2001) relatou dois outros begomovírus em soja no Brasil, o *Euphorbia mosaic virus* (EuMV) e o *Sida golden mosaic virus* (SiGMV). Esses três relatos foram baseados em observação de sintomas macroscópicos, gama de hospedeiros e transmissão pelo inseto vetor. Embora a transmissão por *B. tabaci* seja suficiente para classificar os vírus no gênero *Begomovirus*, a ausência de dados moleculares impossibilita a confirmação da espécie viral em questão.

Recentemente, amostras de soja e de plantas daninhas associadas apresentando sintomas típicos de infecção viral foram coletadas em lavouras comerciais no estado do Paraná. A infecção por begomovírus foi confirmada via PCR utilizando-se oligonucleotídeos universais para o gênero (Mello *et al.*, 2000; Mello *et al.*, 2002). Os produtos de PCR foram clonados e seqüenciados, identificando-se quatro espécies: *Leonurus mosaic virus* (LeMV), *Sida mottle virus* (SiMoV) e dois possíveis novos begomovírus, denominados “vírus A” e “vírus B”. O LeMV foi descrito originalmente infectando a planta daninha *Leonurus sibiricus* e o feijoeiro (Faria & Maxwell, 1999). Entretanto, ainda não havia sido relatado como capaz de infectar a soja. Da mesma forma, o SiMoV foi detectado originalmente em plantas de *Sida* sp. em Minas Gerais (Almeida *et al.*, 1997; Fernandes *et al.*, 1998), mas não havia relatos

anteriores de infecção de soja por esse vírus. As duas possíveis novas espécies, “vírus A” e “vírus B”, não apresentaram identidade significativa com quaisquer outros vírus cujas seqüências se encontravam disponíveis.

A clonagem do genoma viral é uma etapa importante da caracterização de espécies de begomovírus. A identificação de espécies é feita com base na comparação de seqüências de nucleotídeos do genoma viral, particularmente do DNA-A (Van Regenmortel *et al.*, 2000). Um isolado viral é classificado em uma determinada espécie caso apresente identidade superior a 89% para a seqüência completa de nucleotídeos do DNA-A (Fauquet *et al.*, 2003).

Este estudo teve como objetivo a caracterização molecular dos isolados de begomovírus obtidos de plantas de soja e de plantas daninhas associadas, provisoriamente denominados “vírus A” e “vírus B”.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta de amostras e detecção viral via PCR

Amostras foliares de plantas de soja e de plantas daninhas associadas (*Leonurus sibiricus*, *Euphorbia* sp. e *Sida* sp.) com sintomas típicos de infecção por geminivírus foram coletadas no estado do Paraná, em 2002, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C. Para identificar amostras infectadas pelo “vírus A” e pelo “vírus B”, o DNA viral foi extraído (Dellaporta *et al.*, 1983) e utilizado em reações de PCR com oligonucleotídeos específicos previamente descritos (Mello, 2001). As reações de PCR foram executadas em um volume de 25 µl, contendo Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, mistura de dNTPs a 0,2 mM, 20 pmoles de cada oligonucleotídeo e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase, completando-se o volume com água Milli-Q. Foram realizados 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. Os produtos da amplificação por PCR foram analisados em gel de agarose (0,9%). Após eletroforese o gel foi corado com brometo de etídeo a fim de verificar a presença de bandas com aproximadamente 500 nt, correspondentes aos fragmentos amplificados pelos pares de oligonucleotídeos específicos para o “vírus A” e para o “vírus B”.

## Caracterização molecular

O DNA extraído das amostras infectadas pelos “vírus A” e “B” foi utilizado na amplificação do genoma viral completo. A amplificação foi realizada utilizando-se o kit “TempliPhi Amplification” (Amersham Biosciences), de acordo com as especificações do fabricante. O volume final da reação foi de 10  $\mu$ l, utilizando-se 1  $\mu$ l de DNA molde e incubação de 18 horas a 30°C. Os produtos da amplificação dos genomas virais foram submetidos a clivagens enzimáticas a fim de identificar uma enzima capaz de clivar ambos os componentes do genoma. Para o “vírus A” foram testadas as enzimas *EcoR* I, *Pst* I, *BamH* I, *Cla* I, *Sac* I, *Not* I, *Apa* I, *Sal* I, *Spe* I e *Hind* III. Estudos anteriores para o “vírus B” (Contim *et al.*, 2003) demonstraram que as enzimas *EcoR* I, *Pst* I e *Hind* III clivam o DNA viral em um só ponto. Portanto, para o “vírus B”, o produto da amplificação foi clivado com essas três enzimas. O volume final para essas reações foi de 10  $\mu$ l, utilizando-se 1  $\mu$ l do DNA amplificado, 20 unidades de enzima, 1  $\mu$ l do tampão da enzima (10 $\times$ ), completando-se o volume com água. Os resultados foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose (0,9%). Uma vez identificada a enzima que linearizou ambos os componentes genômicos virais, uma nova reação de digestão enzimática foi realizada em um volume total de 30  $\mu$ l, contendo 20  $\mu$ l de DNA viral. O plasmídeo vetor pBLUESCRIPT II KS+ (pKS+, Stratagene) foi clivado com as mesmas enzimas de restrição que linearizaram o genoma viral e desfosforilado com a fosfatase alcalina. O plasmídeo desfosforilado foi purificado utilizando-se o kit “Sephaglass BandPrep” (Amersham Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante.

Para a reação de ligação utilizaram-se proporções de 1:5 e 1:10 de vetor:inserto. A reação foi incubada a 4°C por 12 horas. Células competentes de *E. coli* DH5 foram transformadas utilizando-se o método do choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989) e plaqueadas em meio LB contendo ampicilina, IPTG e X-Gal. A clonagem foi confirmada por meio de digestão enzimática dos plasmídeos recombinantes, a fim de verificar se o inserto realmente possuía o tamanho correspondente ao componente genômico completo (aprox. 2.600 nt). Os clones correspondentes ao genoma viral completo foram mantidos em *E. coli*, na forma de culturas armazenadas na presença de glicerol a -80°C.

As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando-se o kit “BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (Perkin Elmer), de acordo com as instruções do fabricante, e analisadas em um seqüenciador automático ABI 310 (Applied Biosystems). Com base nas seqüências geradas com os oligonucleotídeos que anelam no plasmídeo vetor,

sintetizaram-se oligonucleotídeos específicos a fim de permitir o seqüenciamento completo dos genomas virais obtidos.

### **Análise filogenética**

As seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidas foram comparadas às seqüências de outros begomovírus (Quadro 1). As seqüências foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal W ([www.ebi.ac.uk/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/clustalw)). Árvores filogenéticas foram preparadas com o programa MEGA ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)), utilizando-se o método UPGMA para seqüências de nucleotídeos e *neighbor-joining* para seqüências de aminoácidos, em ambos os casos com correção de Poisson. Os ramos das árvores filogenéticas foram submetidos a análise de *bootstrap* com 2.000 repetições.

## **RESULTADOS**

### **Detecção viral via PCR**

Os produtos da amplificação viral via PCR a partir de amostras foliares de plantas de soja, *Euphorbia* sp., *Leonurus sibiricus* e *Sida* sp. foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose, confirmando-se a infecção por begomovírus com a visualização de bandas com cerca de 500 nt, correspondentes aos fragmentos amplificados com base nos oligonucleotídeos específicos para os “vírus A” e “vírus B” (Mello, 2001). Para o “vírus A” foram positivas amostras de *Leonurus sibiricus*. Para o “vírus B”, amostras de soja e *Sida* sp. foram positivas (dados não mostrados).

### **Clonagem molecular do genoma viral**

Os genomas completos dos “vírus A” e “vírus B” foram amplificados utilizando-se a DNA polimerase do bacteriófago  $\phi$ 29. Após amplificação, os padrões de restrição para o DNA-A e DNA-B foram determinados por meio de digestão enzimática.

Os resultados para o “vírus A” (Figura 1) demonstraram que as enzimas *EcoR* I, *Cla* I, *Not* I, *Apa* I e *Spe* I não clivaram nenhum dos dois componentes do genoma viral. A enzima *Sac* I linearizou apenas um dos componentes e não clivou o outro. As enzimas *Pst* I, *Bam*H I e *Sal* I linearizaram um componente de DNA e clivaram o outro em dois sítios. A enzima *Hind* III linearizou ambos componentes do genoma viral, sendo portanto utilizada para a clonagem.

Para o “vírus B”, os resultados indicaram que apenas *EcoR* I foi capaz de linearizar ambos os componentes do genoma viral (Figura 2), sendo portanto utilizada para a clonagem. As enzimas *Pst* I e *Hind* III não clivaram nenhum dos dois componentes.

Após linearização do inserto e do vetor, procedeu-se à reação de ligação e transformação de *E. coli*. para ambos os vírus. Foram obtidas várias colônias recombinantes, cujos plasmídeos apresentaram o comprimento esperado de aproximadamente 5.600 nt (3.000 nt para o vetor e 2.600 nt para o inserto). Estes plasmídeos foram submetidos à clivagem com a enzima *Hind* III para o “vírus A” (Figura 3) e *EcoR* I para o “vírus B” (Figura 4), liberando em ambos os casos um fragmento de 2.600 nt correspondente aos clones dos respectivos vírus.

### **Seqüenciamento dos componentes genômicos virais**

Um seqüenciamento inicial utilizando oligonucleotídeos que anelam no vetor (M13 forward e M13 reverse) foi conduzido a fim de confirmar a identidade de cada um dos componentes genômicos clonados. A análise dessas seqüências indicou que os clones para o “vírus A” correspondiam ao DNA-B, e os clones para o “vírus B” correspondiam ao DNA-A. Para se obter a seqüência completa de nucleotídeos, os clones foram submetidos a novas reações de seqüenciamento com oligonucleotídeos específicos para cada componente clonado.

O DNA-B do “vírus A” possui 2.621 nt (Figura 5). Foram identificadas as ORFs NS (253 aminoácidos deduzidos) e MP (293 aminoácidos deduzidos). A seqüência de nucleotídeos apresenta identidade máxima de 83% com o isolado B3 do *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV) (Quadro 2). Outros begomovírus relacionados incluem o isolado B2 do SimMV (67% de identidade), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) (65%) e *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV) (64%) (Quadro 2). Ao comparar as seqüências deduzidas de aminoácidos das proteínas NS (Quadro 3) e MP (Quadro 4), os resultados indicaram maior identidade com os isolados B3 e B1 do SimMV.

A seqüência parcial obtida para o DNA-A do “vírus B” possui 1.108 nt (Figura 6), e corresponde a parte dos genes *rep*, *trap* e *ren*. A seqüência de nucleotídeos apresenta identidade máxima de 89% com o isolado A2 do SimMV (Quadro 5). Outros begomovírus relacionados incluem o isolado A1 do SimMV (79% de identidade) e o *Sida mottle virus* (SiMoV) (79%) (Quadro 5).

## **Análise filogenética**

As seqüências de nucleotídeos do DNA-B e de aminoácidos deduzidos das proteínas NS e MP do “vírus A” foram utilizadas na construção de árvores filogenéticas, incluindo-se espécies de begomovírus do hemisfério ocidental e oriental. Para o “vírus B”, a seqüência parcial de nucleotídeos do DNA-A foi utilizada para a construção de árvore filogenética.

A árvore filogenética referente à seqüência completa de nucleotídeos do DNA-B do “vírus A” (Figura 7) agrupou os isolados/espécies em três ramos distintos de acordo com a origem geográfica: Américas, Índia e África. O “vírus A” foi agrupado em um ramo juntamente com o isolado B3 do SimMV. As árvores baseadas nas seqüências de aminoácidos (Figuras 8 e 9) apresentaram resultado similar em comparação com a árvore baseada nas seqüências de nucleotídeos. O “vírus A” foi agrupado em um ramo juntamente com o isolado B3 do SimMV para as proteínas NS e MP.

A árvore filogenética referente à seqüência parcial de nucleotídeos do DNA-A do “vírus B” (Figura 10) também agrupou os isolados/espécies em três ramos distintos de acordo com a origem geográfica (Américas, Ásia e África). O “vírus B” foi agrupado no mesmo ramo do isolado A2 do SimMV e próximo do ramo dos vírus que infectam *Sida* de ocorrência no Brasil: o isolado A1 do SimMV e o SiMoV.

## **DISCUSSÃO**

Desde a década de 70 há relatos no Brasil de que a soja pode ser infectada naturalmente por begomovírus. Entretanto, esses relatos basearam-se apenas em observações macroscópicas de sintomas, gama de hospedeiros e transmissão pelo vetor, impossibilitando a identificação das espécies virais em questão. Estudos mais recentes empregando técnicas moleculares identificaram quatro espécies de begomovírus infectando soja no Brasil: LeMV, SiMoV e dois possíveis novos begomovírus, denominados “vírus A” e “vírus B” (Mello *et al.*, 2000; Mello *et al.*, 2002). O “vírus A”, naquela ocasião, foi encontrado em plantas de soja e na planta daninha *Sida* sp. nos estados de Goiás e Paraná. O “vírus B” foi encontrado apenas em plantas de *Sida* sp. associadas ao cultivo da soja no estado do Paraná. Neste trabalho, a partir de novas amostras, o “vírus A” foi detectado em plantas de *Leonurus sibiricus* e o “vírus B” foi detectado em amostras de soja e *Sida* sp., todas provenientes do estado do Paraná. Assim, este trabalho constitui o primeiro relato do “vírus B” infectando a soja. Novamente, ressalte-se que a detecção de begomovírus em soja e plantas daninhas associadas indica que estes patógenos podem estar disseminados na cultura em várias regiões do país.

A clonagem do genoma viral é uma etapa importante da caracterização de espécies de begomovírus, e no esclarecimento dos aspectos envolvidos na prevalência de certas espécies de begomovírus em um determinado hospedeiro e região geográfica, em detrimento de outras.

Neste trabalho, a clonagem molecular foi realizada para apenas um componente de cada vírus. Para o “vírus A” foi clonado apenas o DNA-B. Entretanto, a presença de um DNA-A em amostras infectadas por este vírus foi demonstrada anteriormente (Mello *et al.*, 2000; Mello *et al.*, 2002) e neste trabalho, ao ser realizada a amplificação via PCR com oligonucleotídeos universais para o DNA-A de begomovírus (dados não mostrados). Para o “vírus B” foi realizada apenas a clonagem do DNA-A. Novamente, a presença de um DNA-B em plantas infectadas por este vírus foi demonstrada neste trabalho e em trabalhos anteriores (Mello *et al.*, 2000; Mello *et al.*, 2002) por meio de amplificação utilizando-se oligonucleotídeos universais.

Sabe-se que o DNA-B de begomovírus não é capaz de replicar-se na ausência de seu DNA-A cognato. No entanto, constatar a presença de um DNA-A e DNA-B na mesma planta não é garantia de que estes dois componentes sejam cognatos, visto que um DNA-A pode replicar um DNA-B heterólogo caso exista compatibilidade entre as origens de replicação. Uma vez que Mello *et al.* (2000) e Mello *et al.* (2002) não realizaram o sequenciamento da região comum (que contém a origem de replicação) dos fragmentos amplificados, não é possível afirmar se os DNAs A e B presentes nas amostras são de fato cognatos. A detecção de um DNA-A na ausência de um DNA-B é mais aceitável, pois a proteína capsidial pode contribuir com a função de movimento em hospedeiros aos quais o vírus é bem adaptado (Pooma *et al.*, 1996; Gillette *et al.*, 1998).

A análise das seqüências obtidas neste estudo demonstrou que o DNA-B do “vírus A” possui uma identidade máxima de aproximadamente 83% com o isolado B3 do SimMV para a seqüência completa de nucleotídeos, e de aproximadamente 89% e 95% para as seqüências de aminoácidos das proteínas NS e MP. Para o vírus B, a seqüência parcial do DNA-A (1.108 nt) apresentou uma identidade máxima de aproximadamente 89% com o SimMV isolado A2. Porém, essas comparações não permitem a classificação definitiva das espécies virais, uma vez que para o “vírus A” trata-se do DNA-B, e para o “vírus B” foi obtida apenas uma seqüência parcial do DNA-A que não inclui o gene da proteína capsidial. De acordo com o sétimo relatório do ICTV (Van Regenmortel *et al.*, 2000), para que dois isolados virais sejam considerados como pertencentes à mesma espécie deve haver um valor mínimo de 90% de identidade para a seqüência de aminoácidos da CP, ou 89% de identidade para a seqüência de nucleotídeos completa do DNA-A. Segundo Padidam *et al.* (1995) e Brown *et al.* (2001), a

seqüência da região 5' do gene *cp*, com aproximadamente 200 nucleotídeos, pode ser utilizada para a identificação preliminar de espécies de begomovírus, por ser representativa da variabilidade existente entre as espécies do gênero. Entretanto, de acordo com a última revisão dos critérios taxonômicos da família *Geminiviridae* (Fauquet *et al.*, 2003), embora a seqüência de aminoácidos da CP seja um indicativo razoavelmente preciso do posicionamento taxonômico, a seqüência completa de nucleotídeos do DNA-A é necessária para a classificação definitiva. Além disso, o posicionamento taxonômico deve levar em conta as propriedades biológicas do isolado, principalmente quando o nível de identidade está próximo de 89%.

A proteína MP é extremamente conservada entre os begomovírus, particularmente para as espécies do continente americano (Fauquet *et al.*, 2003). Mesmo com valores de identidade de 89% e 95% para as seqüências de aminoácidos das proteínas NS e MP, respectivamente, o “vírus A” não pode ser considerado um isolado do SimMV-B3, pois a seqüência de nucleotídeos do DNA-B completo apresentou identidade de apenas 83%.

Com base nas análises filogenéticas, constatou-se neste trabalho que o relacionamento filogenético mais próximo é verificado entre espécies de begomovírus de uma mesma região geográfica, independente do hospedeiro. Os vírus “A” e “B” são mais relacionados com begomovírus descritos em tomateiro e feijoeiro no continente americano do que com begomovírus infectando soja no hemisfério oriental (particularmente no subcontinente indiano). Este resultado está de acordo com a análise filogenética englobando todas as espécies da família *Geminiviridae* (Fauquet *et al.*, 2003).

As árvores filogenéticas para o “vírus A” indicaram que este isolado foi agrupado em um ramo juntamente com o isolado B3 do SimMV. Entretanto, novamente não se pode assumir que o “vírus A” é um isolado do SimMV. Além de se tratar de uma análise baseada no DNA-B, verifica-se que a distância genética entre o “vírus A” e o SimMV-B3 é maior do que aquela observada entre espécies como o *Sida golden mosaic Honduras virus* (SGMHoV) e o *Sida yellow vein virus* (SiYVV) ou o *Soybean yellow mosaic virus* (SoYMV) e o *Mungbean yellow mosaic virus* (MYMV).

Para o “vírus B”, a árvore filogenética o agrupou em um mesmo ramo com o isolado A2 do SimMV. Novamente não se pode ainda afirmar que o “vírus B” é um isolado do SimMV, pois além da seqüência utilizada para a análise ser parcial, a distância genética entre o “vírus B” e o SimMV-A2 é maior do que entre o SimMV-A1 e o SiMoV, ou entre o SGMHoV e o SiYVV.

O aumento crescente do conhecimento a respeito das características moleculares dos vírus promove uma maior discussão sobre o conceito de espécie. No caso específico do gênero *Begomovirus*, esta discussão deve levar em consideração a existência de mecanismos alternativos de variabilidade genética como pseudo-recombinação, recombinação ou aquisição de moléculas adicionais de DNA (Padidam *et al.*, 1999; Pita *et al.*, 2001; Briddon, 2003; Preiss & Jeske, 2003). O seqüenciamento completo dos componentes de DNA, embora desejável, pode não ser útil quando se trata de vírus gerados por meio desses mecanismos. Embora os resultados indiquem que o “vírus A” e o “vírus B” são de espécies ainda não descritas, a busca dos outros possíveis componentes e ensaios de pseudo-recombinação devem ser realizados a fim de confirmar estes resultados.

Mesmo que atualmente os begomovírus não sejam considerados de grande importância para a cultura da soja, há diversos relatos de infecção natural por estes vírus na cultura. É importante lembrar que os begomovírus não eram considerados importantes para a cultura do tomateiro até o início da década de 1990. A partir da introdução e disseminação do biótipo B da *B. tabaci* no Brasil, epidemias severas causadas por begomovírus em tomateiro têm sido relatadas em todas as regiões do país (Ribeiro *et al.*, 2003). Estudos genéticos indicam que estas epidemias estão associadas a novas variantes de begomovírus surgidas por recombinação e/ou pseudo-recombinação a partir de vírus nativos que infectavam plantas silvestres e daninhas, e que foram transferidos para o tomateiro pelo novo biótipo do inseto vetor (Ambrozevicius *et al.*, 2002; Galvão *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2003). A constatação da existência no campo de múltiplas espécies de begomovírus capazes de infectar naturalmente plantas de soja e plantas daninhas associadas ao seu cultivo é preocupante, principalmente levando-se em consideração que a soja é uma excelente hospedeira do inseto vetor. Infecções mistas favorecem a recombinação e pseudo-recombinação, e conseqüentemente o surgimento de novas espécies virais. Associada a eventuais mudanças na ecologia do inseto vetor, o surgimento de novas espécies mais adaptadas a cultura pode levar a epidemias severas nessa cultura de grande importância econômica para o país.

#### LITERATURA CITADA

Almeida, J.A., Galvão, R.M., Zerbini, F.M. & Fontes, E.P.B. A new geminivirus identified in the *Sida rhombifolia*-infecting geminivirus complex is probably monopartite. Brazilian Journal of Genetics, v. 20, p. G38, 1997.

- Ambrozevicius, L.P., Calegario, R.F., Fontes, E.P.B., Carvalho, M.G. & Zerbini, F.M. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 27, p. 372-377, 2002.
- Briddon, R.W. Cotton leaf curl disease, a multicomponent begomovirus complex. *Molecular Plant Pathology*, v. 4, p. 427-434, 2003.
- 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.
- Brown, J.K., Idris, A.M., Torres-Jerez, I., Banks, G.K. & Wyatt, S.D. The core region of the coat protein gene is highly useful for establishing the provisional identification and classification of begomoviruses. *Archives of Virology*, v. 146, p. 1581-1598, 2001.
- Contim, F.S., Alfenas, P.F., Mello, R.N., Almeida, A.M.R. & Zerbini, F.M. Identification of a begomovirus complex infecting soybean-associated *Sida* sp. at Paraná state, Brazil. *Virus Reviews and Research*, v. 8, p. 194, 2003.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. & Hicks, J.B. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 1, p. 19-21, 1983.
- Faria, J.C. & Maxwell, D.P. Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. *Phytopathology*, v. 89, p. 262-268, 1999.
- Fauquet, C.M., Bisaro, D.M., Briddon, R.W., Brown, J.K., Harrison, B.D., Rybicki, E.P., Stenger, D.C. & Stanley, J. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family *Geminiviridae*, and an updated list of begomovirus species. *Archives of Virology*, v. 148, p. 405-421, 2003.
- Fernandes, A.V., Andrade, E.C., Alfenas, P.F., Galvão, R.M., Zerbini, F.M. & Fontes, E.P.B. Clonagem e caracterização de novos geminivírus que infectam *Sida rhombifolia*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 23, p. 317, 1998.
- Galvão, R.M., Mariano, A.C., Luz, D.F., Alfenas, P.F., Andrade, E.C., Zerbini, F.M., Almeida, M.R. & Fontes, E.P.B. A naturally occurring recombinant DNA-A of a typical bipartite begomovirus does not require the cognate DNA-B to infect *Nicotiana benthamiana* systemically. *Journal of General Virology*, v. 84, p. 715-726, 2003.
- Gillette, W.K., Meade, T.J., Jeffrey, J.L. & Petty, I.T. Genetic determinants of host-specificity in bipartite geminivirus DNA A components. *Virology*, v. 251, p. 361-369, 1998.
- Lazarowitz, S.G. Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 11, p. 327-349, 1992.
- Mello, R.N. Begomovírus em soja no Brasil e ferramentas moleculares para sua identificação. Tese M.S., Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 59 p., 2001.
- Mello, R.N., Almeida, A.M.R. & Zerbini, F.M. Detection and identification of geminiviruses infecting soybean and associated weeds in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 25, p. 444, 2000.
- Mello, R.N., Cotrim, M.A.A., Lopes, E.F., Moreira, A.G., Contin, F.S., Fontes, E.P.B., Almeida, A.M.R. & Zerbini, F.M. Survey of begomoviruses associated with soybean and identification of *Sida mottle virus* (SiMoV) infecting this crop in Brazil. *Virus Reviews and Research*, v. 7(Supplement), p. 157, 2002.
- Menten, J.O. & Roston, A.J. Mosaico dourado e a necessidade da regionalização da cultura do feijoeiro no Estado de São Paulo. *Revista da Agricultura*, v. 55, p. 287-300, 1980.

- Morales, F.J. & Anderson, P.K. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology*, v. 146, p. 415-441, 2001.
- 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 geminiviruses by frequent recombination. *Virology*, v. 265, p. 218-224, 1999.
- Pita, J.S., Fondong, V.N., Sangare, A., Otim-Nape, G.W., Ogwal, S. & Fauquet, C.M. Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. *Journal of General Virology*, v. 82, p. 655-665, 2001.
- Polston, J.E. & Anderson, P.K. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Disease*, v. 81, p. 1358-1369, 1997.
- Pooma, W., Gillette, W.K., Jeffrey, J.L. & Petty, I.T.D. Host and viral factors determine the dispensability of coat protein for bipartite geminivirus movement. *Virology*, v. 218, p. 264-268, 1996.
- Preiss, W. & Jeske, H. Multitasking in replication is common among geminiviruses. *Journal of Virology*, v. 77, p. 2972-2980, 2003.
- Ribeiro, S.G., Ambrozevicus, L.P., Ávila, A.C., Bezerra, I.C., Calegario, R.F., Fernandes, J.J., Lima, M.F., Mello, R.N., Rocha, H. & Zerbini, F.M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology*, v. 148, p. 281-295, 2003.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R. & Wickner, R.B., (Eds.) *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Academic Press, v., 1162 p., 2000.

**Quadro 1.** Isolados/espécies de begomovírus utilizadas nas comparações de seqüências e análise filogenética.

<b>Espécie</b>	<b>Sigla</b>	<b>Número de acesso no GeneBank</b>
<i>Abutilon mosaic virus</i>	AbMV	NC_001928 (A), <a href="#">NC_001929</a> (B)
<i>African cassava mosaic virus</i>	ACMV	NC_001467, NC_001468
<i>Bean dwarf mosaic virus</i>	BDMV	NC_001931, NC_001930
<i>Bean golden mosaic virus</i>	BGMV	NC_004042, NC_004043
<i>Bean golden yellow mosaic virus</i>	BGYMV	NC_001439, NC_001438
<i>Chino del tomate virus</i>	CdTV	NC_003830, NC_003831
<i>Mungbean yellow mosaic virus</i>	MYMV	NC_001983, NC_001984
<i>Mungbean yellow mosaic India virus</i>	MYMIV	NC_004608, NC_004609
<i>Mungbean yellow mosaic India virus</i> -[Soybean]	MYMIV-[So]	AY049772, AY049771
<i>Mungbean yellow mosaic India virus</i> -[SoybeanTN]	MYMIV-[SoTN]	AJ416349, AJ420331
<i>Pepper golden mosaic virus</i>	PGMV	NC_004101, <a href="#">NC_004096</a>
<i>Potato yellow mosaic virus</i>	PYMV	NC_001934, NC_001935
<i>Sida golden mosaic virus</i>	SGMV	NC_002046, NC_002047
<i>Sida golden mosaic Honduras virus</i>	SGMHoV	NC_004659, NC_004660
<i>Sida micrantha mosaic virus</i>	SimMV	AJ557450 (A1), AJ557451 (A2), <a href="#">AJ557452</a> (B1), <a href="#">AJ557453</a> (B2), AJ557454 (B3)
<i>Sida yellow vein virus</i>	SiYVV	NC_004661, NC_004662
<i>Sida mottle virus</i>	SiMoV	NC_004637 (A)
<i>Soybean crinkle leaf virus</i>	SoCLV	NC_003357 (A)
<i>Soybean yellow mosaic virus</i>	SoYMV	AJ315668, AJ582267
<i>Squash leaf curl virus</i>	SqLCV	NC_001936, NC_001937
<i>Tomato golden mosaic virus</i>	TGMV	NC_001507, NC_001508
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i>	ToCMoV	NC_003664, NC_003665
<i>Tomato leaf curl New Delhi virus</i>	TLCNDV	NC_004611, NC_004612
<i>Tomato rugose mosaic virus</i>	ToRMV	NC_002555, NC_002556

**Quadro 2.** Porcentagem de identidade entre a seqüência completa de nucleotídeos do DNA-B do “vírus A” e outros begomovírus.

<b>Espécie/ Isolado</b>	<b>Identidade (%)</b>
SimMV (B3)	83
SimMV (B2)	67
ToRMV	65
BDMV	64

**Quadro 3.** Porcentagem de identidade entre a seqüência de aminoácidos da proteína NS do “vírus A” e outros begomovírus.

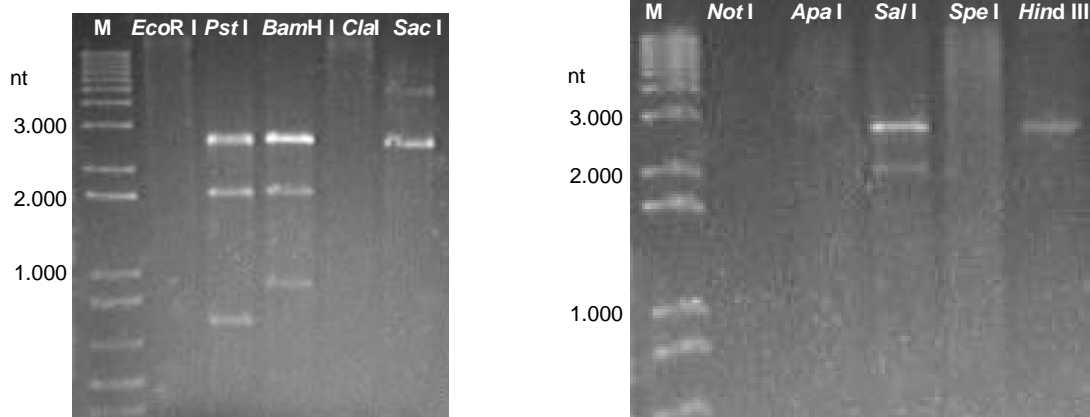
<b>Espécie/ Isolado</b>	<b>Identidade (%)</b>
SimMV (B3)	89
SimMV (B1)	82
SiYVV	80
SiGMV	76

**Quadro 4.** Porcentagem de identidade entre a seqüência de aminoácidos da proteína MP do “vírus A” e outros begomovírus.

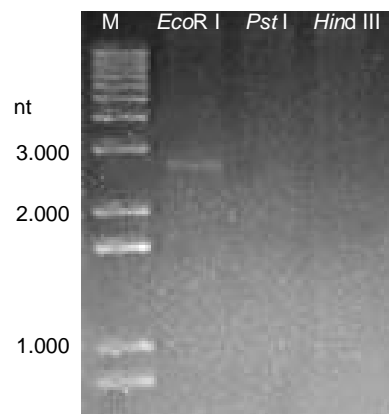
<b>Espécie/ Isolado</b>	<b>Identidade (%)</b>
SimMV (B3)	95
SimMV (B1)	82
BDMV	80
ToRMV	79

**Quadro 5.** Porcentagem de identidade entre a seqüência parcial de nucleotídeos do DNA-A do “vírus B” e outros begomovírus.

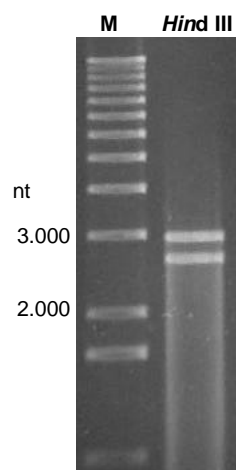
<b>Espécie/ Isolado</b>	<b>Identidade (%)</b>
SimMV (A2)	89
SiMoV	79
SimMV (A1)	79



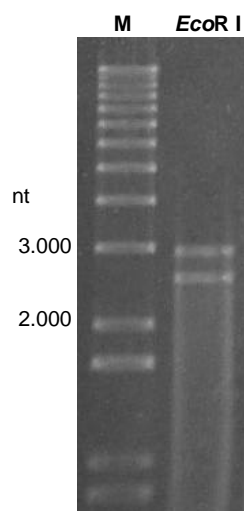
**Figura 1.** Padrão eletroforético em gel de agarose (0,9%) da clivagem dos componentes genômicos do “vírus A” mediada por enzimas de restrição. As bandas com comprimento aproximado de 2.600 nt correspondem a componentes clivados em apenas um ponto (linearizados). As bandas com comprimento inferior a 2.600 nt correspondem aos fragmentos de componentes clivados em mais de um ponto. **M**, marcador de comprimento (“1 kb plus DNA ladder”); **EcoR I**, **Cla I**, **Not I**, **Apa I**, **Spe I**, nenhum dos dois components clivados; **Sal I**, um componente linearizado e o outro clivado em apenas um ponto; **Pst I**, **BamH I**, um componente linearizado e o outro clivado em dois sítios; **Sac I**, um componente linearizado e o outro não clivado; **Hind III**, ambos os componentes linearizados.



**Figura 2.** Padrão eletroforético em gel de agarose (0,9%) da clivagem dos componentes genômicos do “vírus B” mediada por enzimas de restrição. **M**, marcador de comprimento (“1 kb plus DNA ladder”) **EcoR I**, ambos os componentes linearizados; **Pst I**, **Hind III**, nenhum dos dois components clivados.



**Figura 3.** Padrão eletroforético em gel de agarose (0,9%) do plasmídeo recombinante correspondente ao “vírus A”, purificado e clivado com *Hind* III. **M**, marcador de comprimento (“1 kb DNA ladder plus”); **Hind III**, plasmídeo recombinante clivado com *Hind* III.



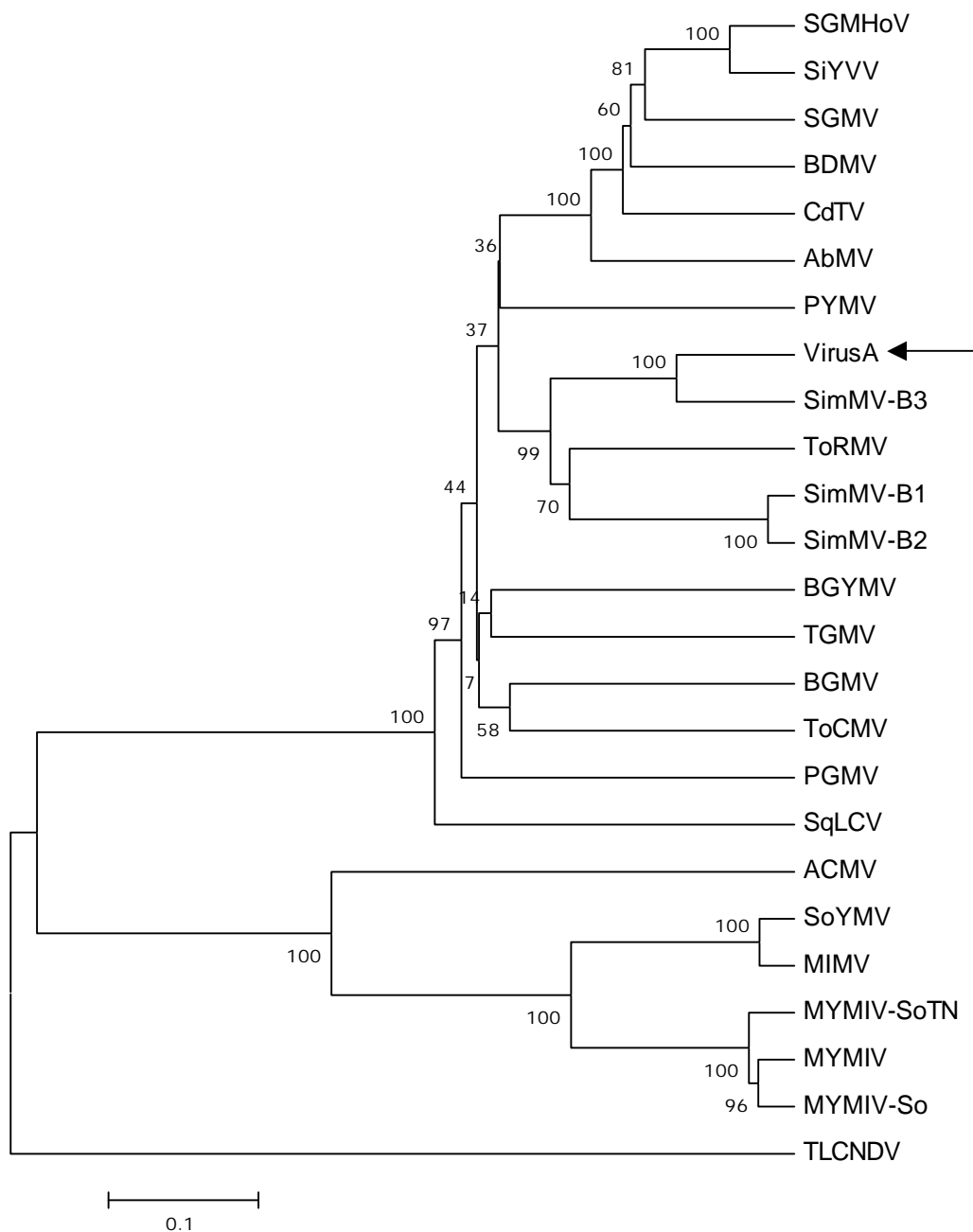
**Figura 4.** Padrão eletroforético em gel de agarose (0,9%) do plasmídeo recombinante correspondente ao “vírus B”, purificado e clivado com *EcoR* I. **M**, marcador de comprimento (“1 kb DNA ladder plus”); ***EcoR* I**, plasmídeo recombinante clivado com *EcoR* I.

**ACCGGATGGCCGCCGATTTTTGCCCCCTCCCCACGTGGCGCTCTGGTGGCCGCCGATCCCCTCCCCGCTCGCGTGGTGT  
CTCCTATACCTCCGCGCGTTCCCTCACGCTCGAATTTAGTTTCAGCGCTTTTTTTGAAGTCCGCGAAATGAGTTAAGCGCATT  
TTTTGAGATCCGTAGACTGGTCAACTATTCATGACGCTTTAATTCAAATTAAGCGGTTTTATTCTCGTGGTCCAATCATTT  
CGCTCGCTGGGATGTATCTTATCTATTTTCGCCAGACTGATTCTGGACCACTTAGTAATACGGTGACGTTGGTACGAGTTGTGT  
TTTTTGTGATGCGAAATGGTGTATGACCCACAGTACGATTATTCTGACGTGTASCAATTGTGTTATTCCGTGATGGCAAGTTA  
AGTTAGTAAATGTATATTTAAATCCCTATCGTATTGTGGTTGGATAACACGTCCTTTTCGCGTGTATTAATATGTATCAGGCTA  
GGTATAGACGTGGGTTATCTACTAATTATCGTCGTAATTACACGCGAAATGCCGCTTCAAGCGTTCCTTATGGCGTAAAGCGT  
AGCTATGGGAGACGACGATCCAGTAATCATGAAAAGGCCCATGAAGAAGTTAGGATGGCAGCCAGCGTATACATGAGAACCA  
GTTTGGCCCTGAGTTTGTATGGGCCATAATTCAGCCATTTCAACGTTTATCACCTATCCTAGCCTCGGTAAGACCGAGCCCA  
ACCGATCTAGGTCCTATATCAAGCTAAAACGACTCCGATTTAAGGGTACTGTGAAGATTGATCGTGTTCACAATGACGTCACC  
ATGGATGGTTCAGCCCCAAGATTGAAGGAGTCTTTCCCTAGTGGTCGTGGTGGATCGTAAACCCCACTTGGGATCATCTGG  
GTCCCTGCATACGTTTGACGAGTTATTCGGTGCCAGGATCCACAGCCATGGCAATCTAGCCATAGCACCGTCCCTGAAAGACC  
GCTTTTATATTCGACACGTTTCAACGTTGATTATCCGTGGAGAAGGATACGTTGATGGTTGATCTTGAAGGGACTACATCT  
CTCTTAACAGGCGTTTAAATTGTTGGTCGACGTTTAAAGGATATAGACCGTGATTCATGTAATGGTGTTTATGCAAACATAAG  
CAAGAACGCCCTGTTAGTTTATTACTGCTGGATGTCGGACTCGTCGTCGAAGGCATCGACATTTGTATCGTTCCGATCTTGATT  
ATATTGGTTAAACAGAAATTAATATGTGTACGCTATTAATTAACCTATTAATAACTGTTTTATTACATAACACTCCCTTAAC  
TCAACGATTTGGGCTCGGTGGAATACAATTTGTTTTATACACTCTTGGACCGCATTCCTCACTAGGTCGTTTAGTTGGGCC  
TCTGACATGGTTATATGCGATTGGGCCCTTCTCGCAGCAACTATTGAGGCCGAGTCACCTGGGTCTAACATGGTGGTTCCCAA  
TCTGTGTAGTCCTCGATATGGGTGTGCTGCGTTCTCCACATCTGATTCCGTACTCGATTGACCGATCCCCAGCGAACTGCGCG  
AAGCCATGTCTCTCTGGATCAATTGTTATTGGGCTTGGTAGCCATACTTGACCGTTGAAGCGTTTTCGGATCAATTTCTTT  
TCCCATTTTCCGTAGCCACGTTGGCTGAAATCTACATCTCTATCCGTGAACTGTTTAGATAAGATCTTGACCGTCCGTGCTCG  
GAAAGCAATATCCACCGAATGTTTCGCCGTCGACAGCTTCAACTTTCCCTTGAACCTCGCAAAGTGGATGCTCTGGTGAACAT  
TTGTGTGCTCACCTGTAGTACAGTTTCCACGGTATTTGGGTCTTTGAGGGAGAAGAATGAACAGGAGAATAAGTGGAGATCT  
ATGTTGCATCTGATCGGGAATGTCCATGACGCCTGTAACGATTCAATGTCCGTCATTCCTTGTGCTGAATCTCCACGATAAC  
GGAACCTGCGGCGTTTATGGGTACCTGTTGCCTGTATCTATGACGCAGTGGTCTATTTTCATACAGCTACGGTTTAGCCTGG  
CGCTTATCTGAGCCGCTGCAGAAGGAAATTGCAGAACGATCTCAGTTAGGTCATGAGAAAAGCCGATATTCATCACGCTGAGAT  
TCTATATAATTAAGCATTTGGTGGATTAACCTAAGTGAATCCATTTCAACTATTAATATAATAAAATTAGGCCGCGCAGC  
GGAATGCTCAAGTGAATTGAATAAGGTGAAGTGAATAAGACGAAAGCTTAAAAGAATATGGCGTCCGTTTGAAGAAGGTTAAG  
TGAATAAGGCGAAAGCTGTAAGAATATGGCGTCGGTTAAACGTAGAAGATAACTGTGTTAGGGTTTTCAGTCGTAGACTGGAC  
GCACTTAGAAGAAGGATGAATAGTAGATATGAGGTGACTGAAGCTGTGCTAACCCTAATGGTAAGGCGTTATTTATAGGGTT  
ATTGGCTGGATGGCATATTTGTAATAAAGGGGTGACTCCTGATGAGAGCTCGCTCATAAGTCTCTATGAATTGGAGTATGG  
AGTACAATATATAGTAATAGGAGTTCCCTAAGGCCATCCGTATAATATT**

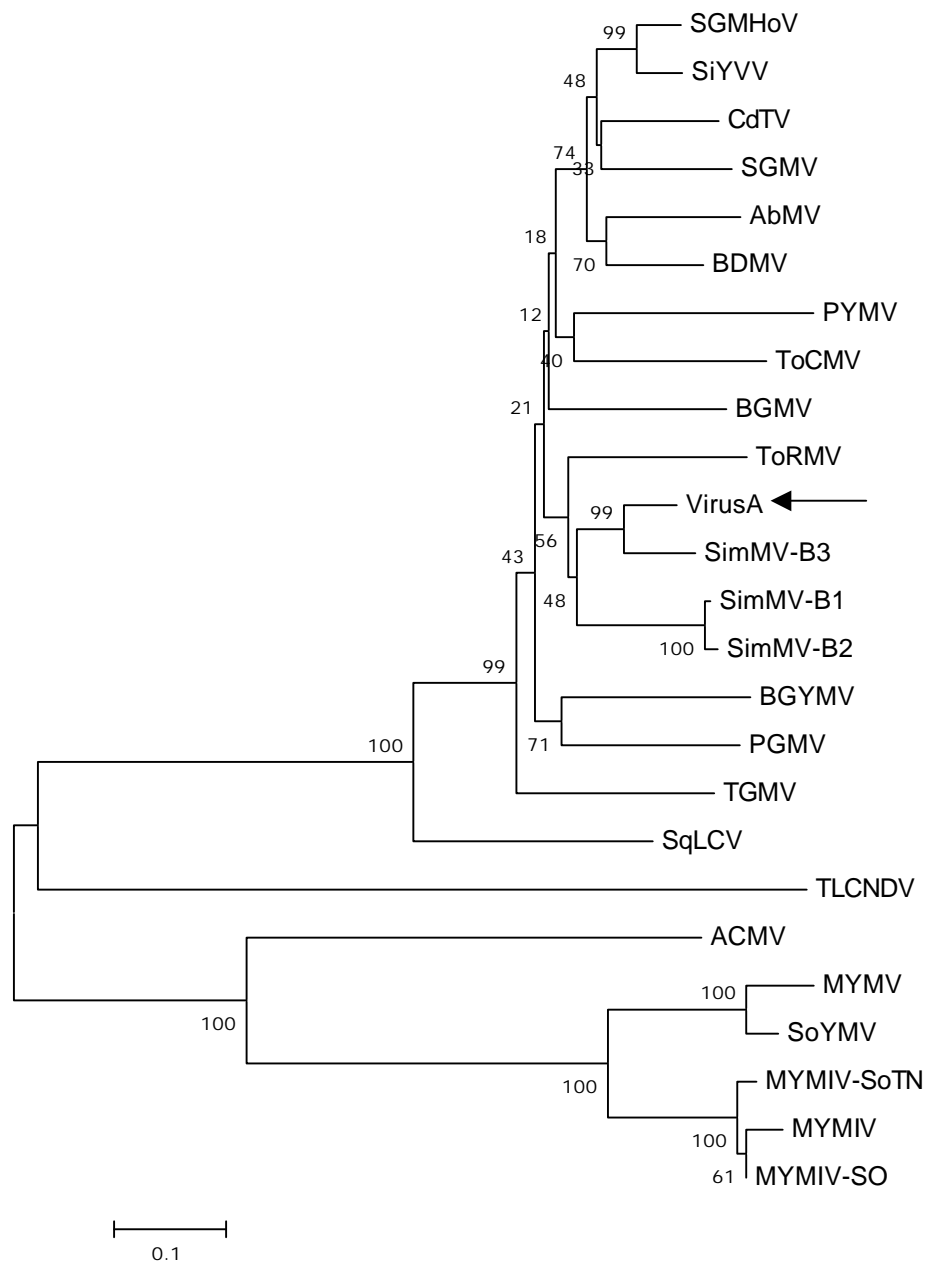
**Figura 5.** Sequência completa de nucleotídeos do DNA-B clonado para o “vírus A”. A posição +1 está localizada no nonanucleotídeo que inclui a origem de replicação da fita viral.

GTCTGGGTCAAGAGGTTCTGGAAGTCAACAATCATGTGGTGTACAACCGCCCCAGGAAGCTGGCAAGTATGAGAATCCCCACG  
GAGAAATGCTTTTTTATTGTATATGGCATGTACCCCATGCCTCTAATCCCTGTGTATGCAACGCTTAAGATTCGGATCTACTT  
CTACGATTCGATAACCAATTAATAAAAATTTGAATTTTATATCATGATCTTCAAGTACATAGTTTACATAGGCTTTGTACAGTG  
GCAAAGCGAACAGCTCTAATTACATTATTAAGGGCAATTACCCCTAATTGATCTAAGTACATCATTACAAGACGCCTAAACCT  
AGTCAAATAAGTCGTTCCAGAAGCTGTCCAGAGAAGTCGTCCAGACTTGGAAGTTCCAGGTAGGCCTTGTGGAGACCCCAATGC  
TCTCCTGAGGTTGTGGTTGAACCTTATCCTGTATGTGGTACACTCTGGTCCCTCGTGTACCGGTGGATCCCTCTACGCGGTACA  
TGCTTGAAATAGAGGGGATTTGGTATCTCCCCAGATATAAACGCCATTACTCTGGCCTGAGGTGCCAGTGATGAATTCCTCCGG  
TGCGTGAATCCATGGCCGGTGCAGTTGAGGTGTTGGAATATGGAGCAACCGCACTCTAGGTCCACTCGTCTACGTCCGATGGC  
CCTCTTCTTGGCAATCCTGTGTCTCGGTTTGATAGAGGGGGCGTCGAGGAAGATGAATTTTGCATTGTGGAGTGTCCAACCA  
CGGAGTGCTGCATTTTCTCTTTGTCTAGGAAGTCTTTATAGCTAGCCCCCTCTCCAGGATTGCACAGCACGATTGGAAGGGA  
CCCCACCTTCAATCAAACGAGGCTTCCGTACTTGCAAGTTGTCTGCCATTTTTGTTGGGCCCTATTAGTTCTTTCCAGTGT  
TTCAACTTTAAGTAATGCGGAAGCGACGTCATCAATGGACGTTATACTCCACTTCGTCTGAGAACACCTTTGAGTTGAAATCT  
AGATGGCCACTCAAGTTAATTATGTGGCCCTAATGGTTAGCCACATCGTCTTACCAGTTCGAGAATCACCCCTCAACAATTA  
ACTAACAGGCCTCAAtGGCGCGCAGCGGT

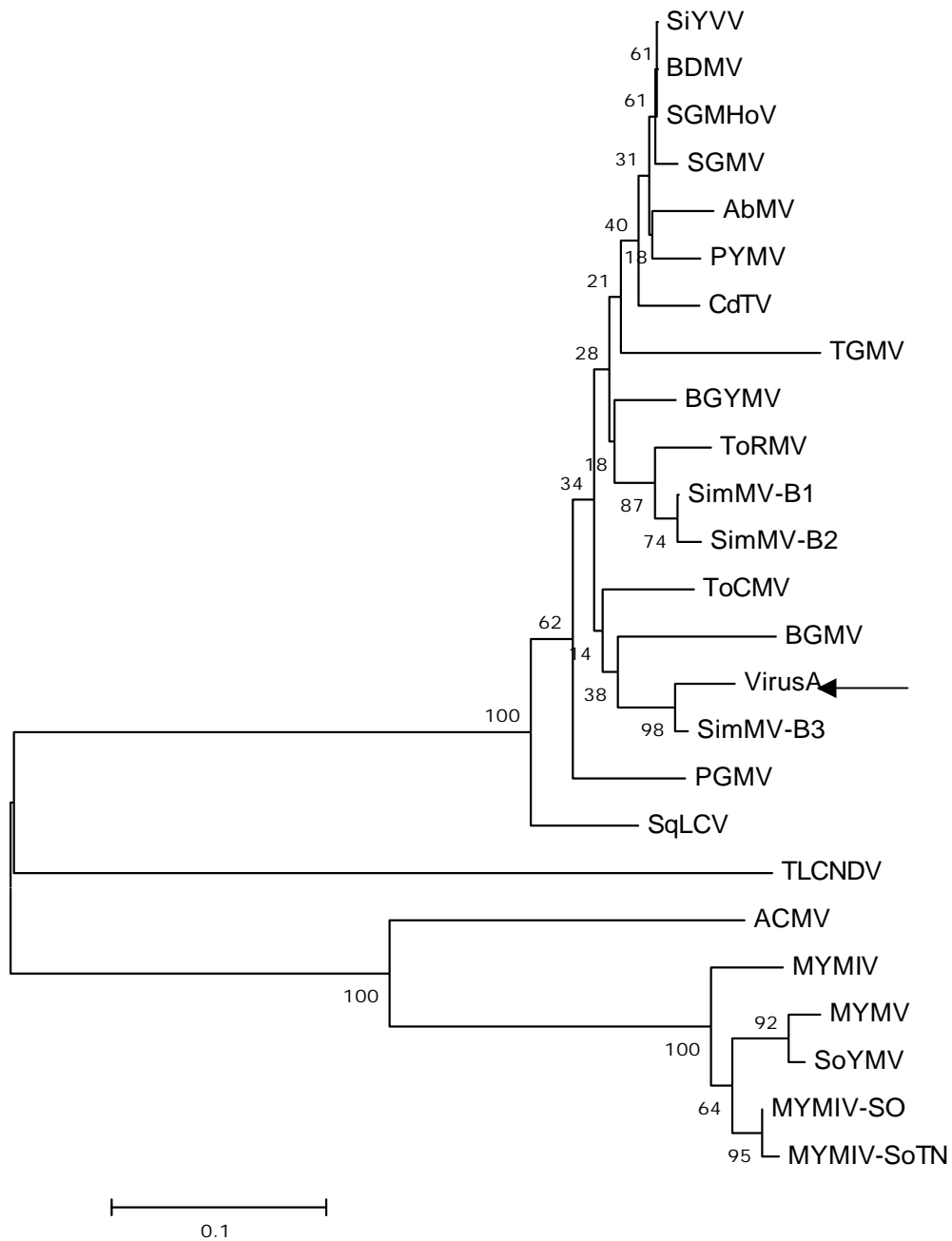
**Figura 6.** Sequência parcial de nucleotídeos do DNA-A clonado para o “vírus B”.



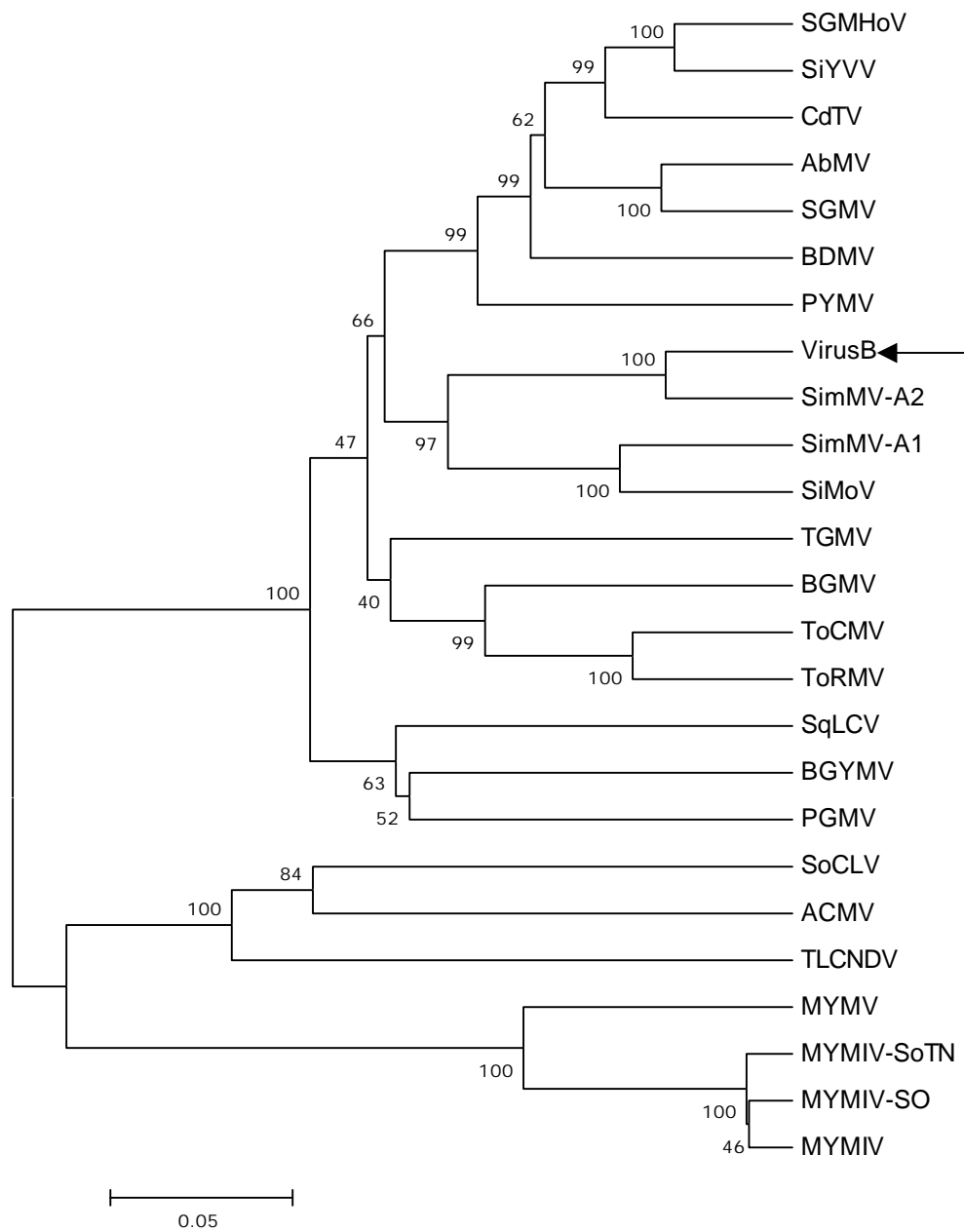
**Figura 7.** Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento da seqüência de nucleotídeos completa do DNA-B, indicando o relacionamento entre o “vírus A” (indicado pela seta) e outros begomovírus. A árvore foi construída com o programa Mega, utilizando o método de UPGMA com correção de Poisson e análise de “bootstrap” com 2.000 repetições.



**Figura 8.** Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento da seqüência de aminoácidos da proteína NS, indicando o relacionamento entre o “vírus A” (indicado pela seta) e outros begomovírus. A árvore foi construída com o programa Mega, utilizando o método de “neighbor-joining” com correção de Poisson e análise de “bootstrap” com 2.000 repetições.



**Figura 9.** Árvore filogenética obtida a partir da seqüência de aminoácidos da proteína MP, indicando o relacionamento entre o “vírus A” (indicado pela seta) e outros begomovírus. A árvore foi construída com o programa Mega, utilizando o método de “neighbour-joining” com correção de Poisson e análise de “bootstrap” com 2.000 repetições.



**Figura 10.** Árvore filogenética obtida a partir da sequência parcial de nucleotídeos do DNA-A, indicando o relacionamento entre o “vírus B” (indicado pela seta) e outros begomovírus. A árvore foi construída com o programa Mega, utilizando o método de UPGMA com correção de Poisson e análise de “bootstrap” com 2.000 repetições.

## **CAPÍTULO 2**

### **CONSTRUÇÃO DE UM VETOR VIRAL BASEADO EM UM BEGOMOVÍRUS PARA INDUÇÃO DE SILENCIAMENTO GÊNICO EM PLANTAS DE SOJA E TOMATEIRO**

Moreira, A.G.; Pereira, C.De O.; Zerbini, F.M. Construção de um vetor viral baseado em um begomovírus para indução de silenciamento gênico em plantas de soja e tomateiro.

# CONSTRUÇÃO DE UM VETOR VIRAL BASEADO EM UM BEGOMVÍRUS PARA INDUÇÃO DE SILENCIAMENTO GÊNICO EM PLANTAS DE SOJA E TOMATEIRO

**Adriana G. Moreira, Carlos De Ocesano Pereira e**

**F. Murilo Zerbini**

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa MG, 36570-000.

E-mail: [zerbini@ufv.br](mailto:zerbini@ufv.br)

(Aceito para publicação em / / )

Autor para correspondência: F. Murilo Zerbini

---

Moreira, A.G.; Pereira, C.De O.; Zerbini, F.M. Construção de um vetor viral baseado em um begomovírus para indução de silenciamento gênico em plantas de soja e tomateiro.

## RESUMO

O silenciamento gênico induzido por vírus é uma ferramenta eficiente e poderosa em estudos de genômica funcional. Vírus de plantas, incluindo os begomovírus, têm sido utilizados com sucesso para a construção de vetores para indução de silenciamento em diversas espécies de plantas. Entretanto, existem poucos vetores eficientes para inoculação de plantas de tomateiro, e não existem relatos de vetores para plantas de soja. Este trabalho teve como objetivo a construção de um vetor viral baseado no DNA-A do begomovírus *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), para a indução de silenciamento gênico em plantas de soja e de tomateiro. A estratégia utilizada foi a construção de um clone infeccioso sem o gene da proteína capsidial, substituído pelo sítio múltiplo de clonagem do vetor pKS+. Como o ToRMV é um vírus com genoma de DNA, pode ser inoculado diretamente em sua forma plasmidial. A infecção sistêmica de plantas de soja e tomateiro pelo vetor pToR-A1.4ΔCP vazio, inoculado conjuntamente com o DNA-B, foi confirmada 28 dias após a inoculação. Plantas infectadas com o vetor vazio não apresentaram sintomas macroscópicos, o que é uma

característica desejável em um vetor VIGS para que não ocorra sobreposição com o fenótipo de silenciamento. Este vetor viral servirá como um complemento e uma alternativa em estudos de genômica funcional de soja e de tomateiro, e na análise de genes envolvidos em vários processos biológicos.

**Palavras-chave:** geminivírus, VIGS, *Tomato rugose mosaic virus*, ToRMV.

## ABSTRACT

Construction of a viral vector based in a begomovirus for the induction of gene silencing in tomato and soybean plants.

Gene silencing induced by viruses is an efficient and powerful tool in functional genomics. Plant viruses, including begomoviruses, have been successfully used for the construction of gene silencing vectors in several plants species. However, there are few effective vectors for the inoculation of tomato plants and none for soybean plants. The objective of this work was to construct a viral vector based on the DNA-A of the begomovirus *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), for the induction of gene silencing in soybean and tomato plants. The strategy used was the construction of an infectious clone without the capsid protein gene, replaced by the multiple cloning site from the plasmid vector pKS+. Because ToRMV is a DNA virus, it can be inoculated directly as a plasmid. Systemic infection of soybean and tomato plants by the empty vector (pToR-A1.4ΔCP) was confirmed at 28 days post-inoculation. Infected plants showed no symptoms, which is an advantage since the phenotype of silenced plants is not masked by symptoms of viral infection. This viral vector will be a complement and an alternative in functional genomics of soybean and tomato, and in the study of genes involved in various biological processes.

**Keywords:** geminivirus, VIGS, *Tomato rugose mosaic virus*, ToRMV.

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos vários grupos de pesquisa têm se empenhado no seqüenciamento do genoma de inúmeras espécies de plantas, animais e procariotos. Uma das maiores limitações no estudo funcional destes genomas é a dificuldade de atribuir funções gênicas a uma grande

parte das seqüências geradas. O silenciamento gênico constitui uma forma simples e eficiente para estudar genes com funções desconhecidas em plantas e animais (Waterhouse & Helliwell, 2003; Dorsett & Tuschl, 2004; Miki & Shimamoto, 2004; Paddison *et al.*, 2004). O silenciamento gênico induzido por vírus (*virus-induced gene silencing*, VIGS) é uma alternativa atraente e rápida para o estudo da expressão e função de genes, pois não há necessidade de transformação genética da planta (Peele *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2003).

O uso de vetores virais para VIGS apresenta duas grandes vantagens. Em primeiro lugar, é um procedimento rápido: as construções podem ser montadas em alguns dias e o fenótipo VIGS pode ser observado entre duas a quatro semanas após a inoculação (Lu *et al.*, 2003). Em segundo lugar, podem ser montados por clonagem direta, não envolvendo a montagem na forma de repetições invertidas, as quais podem ser instáveis durante a propagação em *E. coli*. Os vetores VIGS têm sido freqüentemente empregados em estudos de genética reversa, sendo promissores para plantas difíceis de serem transformadas, caso estas sejam suscetíveis à infecção viral (Robertson, 2004). Além disso, VIGS permite analisar genes que possuem um fenótipo letal, uma vez que esse sistema é aplicado em plantas adultas, não havendo morte do embrião como ocorre em sistemas de mutagênese insercional (Baulcombe, 1999).

A maioria dos estudos envolvendo VIGS tem sido realizados no hospedeiro experimental *Nicotiana benthamiana*. Como consequência desta limitação, vários esforços têm sido feitos em busca de VIGS eficiente em outros hospedeiros. Em tomateiro, até o presente momento, existem poucos vetores virais para VIGS que se mostraram promissores, dentre eles o tobrovírus *Tobacco rattle virus* (TRV) (Liu *et al.*, 2002; Brigneti *et al.*, 2004) e o DNA satélite (DNA  $\beta$ ) associado ao begomovírus *Tomato yellow leaf curl China virus* isolado Y10 (TYLCCV-Y10) (Tao & Zhou, 2004). Não existem relatos de vetores VIGS para plantas de soja. Dessa forma, a construção de um vetor VIGS eficiente para a indução de silenciamento gênico nestas duas espécies de plantas seria de grande utilidade.

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é uma das hortaliças de maior importância econômica, cultivado em regiões tropicais e subtropicais durante todo o ano. Mais de 40 espécies de geminivírus, a maioria pertencente ao gênero *Begomovirus*, são capazes de infectar o tomateiro (Fauquet *et al.*, 2003). A grande maioria dos begomovírus apresenta dois componentes genômicos, denominados DNA-A e DNA-B, e são transmitidos por *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleurodidae) para espécies dicotiledôneas. Cada componente genômico possui aproximadamente 2.600 nucleotídeos (nt) e é encapsidado separadamente em partículas geminadas, sendo necessárias as duas partículas para que ocorra infecção

sistêmica (Stanley, 1983). Vetores virais baseados em begomovírus constituem boas ferramentas para expressão transiente de genes em plantas, uma vez que possuem uma estrutura genética altamente conservada (organização genômica similar entre espécies) e infectam ampla gama de hospedeiros (Turnage *et al.*, 2002; Robertson, 2004). Além disso, possuem genoma pequeno, realizam a replicação e transcrição no núcleo da planta (Peele *et al.*, 2001) e movem-se sistemicamente sem necessidade do gene da proteína capsidial (Saunders *et al.*, 1991).

Este trabalho teve como objetivo a construção de um vetor viral baseado no DNA-A do begomovírus *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), que infecta naturalmente o tomateiro, para indução de VIGS nesse hospedeiro e também em plantas de soja.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Isolado viral

O isolado MG-Ub1 do ToRMV foi caracterizado por Fernandes (2001). O genoma viral foi clonado no plasmídeo pBLUESCRIPT KS+ (pKS+) e completamente sequenciado (números de acesso do GeneBank: AF291705, DNA-A, e AF291706, DNA-B).

### Construção do vetor viral

O vetor viral para VIGS foi construído com base no clone pUB1-49, correspondente ao DNA-A completo do ToRMV (Fernandes, 2001), com a substituição do gene *cp* pelo sítio múltiplo de clonagem derivado do plasmídeo pBLUESCRIPT KS+ (pKS+).

Inicialmente, oligonucleotídeos contendo sítios para as enzimas de restrição *Kpn* I e *Xho* I foram sintetizados para a amplificação de um fragmento de 535 nt que contém a região comum, incluindo a origem de replicação, a partir do clone pUB1-49 (Quadro 1; Figura 1). Esse fragmento foi clivado com *Kpn* I e *Xho* I e inserido no plasmídeo pKS+, previamente clivado com as mesmas enzimas, gerando o clone pToR-A0.4. Em seguida, oligonucleotídeos contendo sítios para as enzimas *Not* I e *Sac* II foram sintetizados para a amplificação de um fragmento de 1.870 nt a partir do clone pUB1-49 (Quadro 1; Figura 1). Esse fragmento foi clivado com *Not* I e *Sac* II e inserido no clone pToR-A0.4 previamente clivado com as mesmas enzimas, gerando o clone pToR-A1.4 CP (Figura 2).

As reações de PCR foram executadas em um volume de 50 µl, contendo tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,3 e KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, mistura de dNTPs a 0,2 mM, 20 pmoles de cada oligonucleotídeo e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase, completando-se o volume com

água. Foram realizados 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. Os produtos da amplificação via PCR foram analisados em gel de agarose (0,9%). As clivagens enzimáticas e os procedimentos de ligação, transformação e análise de plasmídeos recombinantes foram realizados de acordo com técnicas padrão (Sambrook *et al.*, 1989).

### **Teste de infectividade**

Plantas de tomateiro ‘Rutgers’ e *N. benthamiana*, no estágio de 4-6 folhas definitivas, e radículas de soja ‘MSoy8400’, 24 horas após a germinação, foram inoculadas com os clones pToR-A1.4ΔCP e pUB1-81, correspondendo ao vetor VIGS e ao DNA-B completo do ToRMV, respectivamente. A inoculação foi realizada via biobalística (Aragão *et al.*, 1996). As plantas inoculadas foram mantidas em casa-de-vegetação e a infectividade do vetor viral foi verificada por meio da observação visual de sintomas da infecção viral e amplificação de fragmentos do genoma viral via PCR utilizando-se oligonucleotídeos universais para o DNA-A e DNA-B de begomovírus (Rojas *et al.*, 1998), aos 28 dias após a inoculação.

## **RESULTADOS**

### **Construção do vetor viral**

A amplificação dos fragmentos do genoma viral via PCR foi confirmada por meio de eletroforese em gel de agarose, observando-se a presença um fragmento com 1.870 nt (oligonucleotídeos P1-CP/*Sac* II e P2-AC3/*Not* I) ou 535 nt (oligonucleotídeos P3-CP/*Xho* I e P4-Rep/*Kpn* I) (Figura 3). O códon de terminação da ORF CP foi mantido no fragmento de 1.870 nt, e o códon de iniciação da mesma ORF foi preservado em ambos os fragmentos.

Após a linearização do plasmídeo pKS+ e clivagem do fragmento de 535 nt, procedeu-se à reação de ligação e transformação de *E. coli*. Foram obtidas várias colônias recombinantes, cujos plasmídeos apresentaram o comprimento esperado de aproximadamente 3.500 nt. Estes plasmídeos foram então submetidos à clivagem com as enzimas *Kpn* I e *Xho* I, liberando o fragmento de 535 nt (Figura 4). Uma vez comprovada a clonagem do fragmento de 535 nt, procedeu-se à nova reação de ligação e transformação de *E. coli* para clonagem do fragmento de 1.870 nt. Foram obtidas colônias recombinantes em que os plasmídeos apresentaram o comprimento esperado de aproximadamente 5.400 nt (Figura 5). Estes plasmídeos foram submetidos a várias clivagens enzimáticas para confirmação da clonagem (Figura 6). Para as clivagens com as enzimas *Hind* III e *Bam*H I, observou-se a linearização de

um fragmento com aproximadamente 5.400 nt, correspondente ao clone pToR-A1.4 CP. Na clivagem utilizando a enzima *Sal* I, observou-se um padrão enzimático com três fragmentos, um fragmento de aproximadamente 2.900 nt correspondente ao vetor pKS+, um fragmento de 1.600 nt, correspondente ao ToRMV CP, e um fragmento de aproximadamente 1.050 nt. Para a clivagem utilizando-se as enzimas *Sac* II, *Kpn* I e *Hind* III e *Sac* II, *Kpn* I e *Bam*H I simultaneamente, foram obtidos fragmentos com aproximadamente 2.900 nt, correspondente ao vetor pKS+, 1.870 nt e 535 nt. Observou-se também um fragmento com aproximadamente 650 nt, provavelmente devido a clivagem inespecífica.

### **Teste de infectividade**

As plantas de soja, tomateiro e *N. benthamiana* inoculadas com os clones pToR-A1.4ΔCP e pUB1-81, correspondentes ao vetor VIGS e ao DNA-B completo do ToRMV, respectivamente, não apresentaram sintomas visuais de infecção viral, 28 dias após a inoculação. Entretanto, a infecção sistêmica foi confirmada via PCR (Quadro 2).

## **DISCUSSÃO**

Vírus com genoma de RNA e de DNA têm sido utilizados como vetores para indução de silenciamento de RNA em plantas. A capacidade dos begomovírus em induzir o silenciamento de RNA já foi demonstrada para o *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) (Kjemtrup *et al.*, 1998, Peele *et al.*, 2001), *Cabbage leaf curl virus* (CbLCV) (Turnage *et al.*, 2002), *African cassava mosaic virus* (ACMV) (Fofana *et al.*, 2004), e o DNA satélite (DNA β) associado ao TILCCV isolado Y10 (Tao & Zhou, 2004). Este último foi o único promissor em plantas de tomateiro, pois mesmo o isolado de TGMV utilizado para construção do vetor VIGS perdeu a capacidade de infectar essa espécie, tendo sido utilizado para VIGS em plantas de fumo (Peele *et al.*, 2001). Como o TYLCV é uma praga quarentenária no Brasil, a importação e utilização desse vetor é proibida. Assim, o objetivo central deste trabalho foi desenvolver um vetor viral baseado no ToRMV, um begomovírus descrito no Brasil infectando plantas de tomateiro (Fernandes, 2001), permitindo o uso de VIGS para determinar a função de genes nessa espécie de planta, e em outras espécies hospedeiras como *N. benthamiana* e soja.

A construção do vetor pToR-A1.4ΔCP baseou-se no princípio de que os begomovírus não requerem a proteína capsidial para causar infecção sistêmica. Assim, esse gene foi

removido, permanecendo apenas seus códons de iniciação e de terminação. Uma vez que a região anterior ao gene não foi eliminada, permaneceram o promotor e os *cis* elementos necessários para a transcrição do fragmento a ser inserido no vetor. O sítio múltiplo de clonagem do pToR-A1.4ΔCP contém nove sítios para enzimas de restrição (*Acc* I, *Hinc* II, *Hind* III, *EcoR* V, *Pst* I, *Sma* I, *BamH* I, *Spe* I e *Xba* I) e uma grande vantagem: contém duas enzimas que produzem extremidades abruptas (*EcoR* V e *Sma* I), o que facilitará estudos futuros caso o fragmento que venha a ser inserido não possua sítios de clivagem para as enzimas presentes no vetor.

Os resultados aqui obtidos confirmam a infectividade do vetor pToR-A1.4ΔCP. As plantas de soja, tomateiro e *N. benthamiana* foram inoculadas com o DNA plasmidial do vetor pToR-A1.4ΔCP e do clone pUB1-81 via biobalística. Esta forma de inoculação foi escolhida uma vez que o vetor pToR-A1.4ΔCP não possui origem de replicação para *Agrobacterium*, o que descarta a possibilidade de agroinoculação (Grimsley *et al.*, 1986). As três espécies de plantas testadas foram positivas para infecção viral e não apresentaram sintomas macroscópicos da infecção. Este fato constitui uma grande vantagem em estudos futuros utilizando VIGS, uma vez que não ocorrerá sobreposição entre o fenótipo do silenciamento e os sintomas da infecção viral.

O vetor pToR-A1.4ΔCP possui grande potencial em estudos utilizando VIGS em plantas de soja e tomateiro, permitindo a elucidação rápida da função gênica e a validação dos resultados. A eficiência do vetor para indução de silenciamento de RNA nessas plantas será analisada em experimentos futuros.

## LITERATURA CITADA

- Aragão, F.J.L., Barros, L.M.G., Brasileiro, A.C.M., Ribeiro, S.G., Smith, F.D., Sanford, J.C., Faria, J.C. & Rech, E.L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 93, p. 142-150, 1996.
- Baulcombe, D.C. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 2, p. 109-113, 1999.
- Brigneti, G., Martin-Hernandez, A.M., Jin, H., Chen, J., Baulcombe, D.C., Baker, B. & Jones, J.D.G. Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. *Plant Journal*, v. 39, p. 264-272, 2004.
- Dorsett, Y. & Tuschl, T. siRNAs: Applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 3, p. 318-329, 2004.

- Fauquet, C.M., Bisaro, D.M., Briddon, R.W., Brown, J.K., Harrison, B.D., Rybicki, E.P., Stenger, D.C. & Stanley, J. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family *Geminiviridae*, and an updated list of begomovirus species. *Archives of Virology*, v. 148, p. 405-421, 2003.
- Fernandes, J.J. Caracterização e diversidade genética de geminivírus associados ao tomateiro na região do Triângulo Mineiro. Tese D.S., Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 192 p., 2001.
- Fofana, I.B.F., Sangare, A., Collier, R., Taylor, C. & Fauquet, C.M. A geminivirus-induced gene silencing system for gene function validation in cassava. *Plant Molecular Biology*, v. 56, p. 613-624, 2004.
- Grimsley, N., Hohn, B., Hohn, T. & Walden, R. "Agroinfection", an alternative route for viral infection of plants by using the T-DNA plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 83, p. 3282-3286, 1986.
- Kjemtrup, S., Sampson, K.S., Peele, C., Nguyen, L., Conkling, M., Thompson, W. & Roberson, D. Gene silencing from DNA carried by a geminivirus. *Plant Journal*, v. 14, p. 91-100, 1998.
- Liu, Y., Schiff, M. & Dinesh-Kumar, S.P. Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant Journal*, v. 31, p. 777-786, 2002.
- Lu, R., Martin-Hernandez, A.M., Peart, J.R., Malcuit, I. & Baulcombe, D.C. Virus-induced gene silencing in plants. *Methods*, v. 30, p. 296-303, 2003.
- Miki, D. & Shimamoto, K. Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. *Plant and Cell Physiology*, v. 45, p. 490-495, 2004.
- Paddison, P.J., Silva, J.M., Conklin, D.S., Schlabach, M., Li, M.M., Aruleba, S., Baliya, V., O'shaughnessy, A., Gnoj, L., Scobie, K., Chang, K., Westbrook, T., Cleary, M., Sachidanandam, R., McCombie, W.R., Elledge, S.J. & Hannon, G.J. A resource for large-scale RNA-interference-based screens in mammals. *Nature*, v. 428, p. 427-431, 2004.
- Peele, C., Jordan, C.V., Muangsan, N., Turnage, M., Egelkrot, E., Eagle, P., Hanley-Bowdoin, L. & Robertson, D. Silencing of a meristematic gene using geminivirus-derived vectors. *Plant Journal*, v. 27, p. 357-366, 2001.
- Robertson, D. VIGS vectors for gene silencing: Many targets, many tools. *Annual Review of Plant Biology*, v. 55, p. 495-519, 2004.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Saunders, K., Lucy, A. & Stanley, J. DNA forms of the geminivirus African cassava mosaic virus are consistent with a rolling circle mechanism of replication. *Nucleic Acids Research*, v. 19, p. 2325-2330, 1991.
- Stanley, J. Infectivity of the cloned geminivirus genome requires sequences from both DNAs. *Nature*, v. 305, p. 643-645, 1983.
- Tao, X. & Zhou, X. A modified viral satellite DNA that suppresses gene expression in plants. *Plant Journal*, v. 38, p. 850-860, 2004.
- Turnage, M.A., Muangsan, N., Peele, C.G. & Robertson, D. Geminivirus-based vectors for gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, v. 30, p. 107-114, 2002.

Waterhouse, P.M. & Helliwell, C.A. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nature Reviews Genetics*, v. 4, p. 29-38, 2003.

**Quadro 1.** Oligonucleotídeos utilizados na amplificação de fragmentos do clone pUB1-49 para construção do vetor viral pToR-A1.4ΔCP.

Oligonucleotídeo	Seqüência	Região de anelamento no clone pUb1-49
<b>P1-CP/Sac II</b>	5' <u>CCGCGG</u> CATCGCGCTTAGGCATTTTG 3'	<b>338-359 (anti-senso)</b>
<b>P2-AC3/Not I</b>	5' <u>GCGGCCGCG</u> GATAACAAATTAATAAATTTTG 3'	<b>1084-1106 (senso)</b>
<b>P3-CP/Xho I</b>	5' <u>CTCGAGG</u> CATCGCGCTTAGGCATTTTG 3'	<b>338-359 (anti-senso)</b>
<b>P4-Rep/Kpn I</b>	5' <u>GGTACCTTC</u> GAATTGAAGAAGCACATGG 3'	<b>2429-2452 (senso)</b>

**Quadro 2.** Resultado da inoculação de plantas de soja, tomateiro e *N. benthamiana* com o vetor pToR-A1.4ΔCP vazio juntamente com o clone pUB1-81 (DNA-B do ToRMV). As plantas foram inoculadas via biobalística e a infecção viral foi confirmada via PCR utilizando oligonucleotídeos universais para begomovírus, 28 dias após a inoculação.

<b>Espécie/ cultivar</b>	<b>Plantas/sementes inoculadas</b>	<b>Plantas infectadas sistemicamente</b>
Tomateiro ‘Rutgers’	18	16
Soja ‘MSoy8400’	18	12
<i>N. bentahmiana</i>	16	14

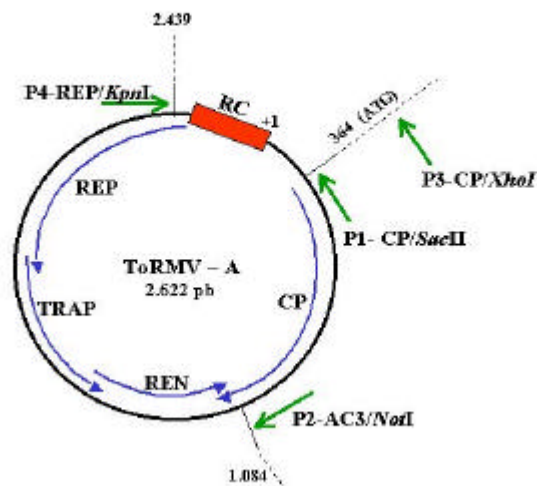
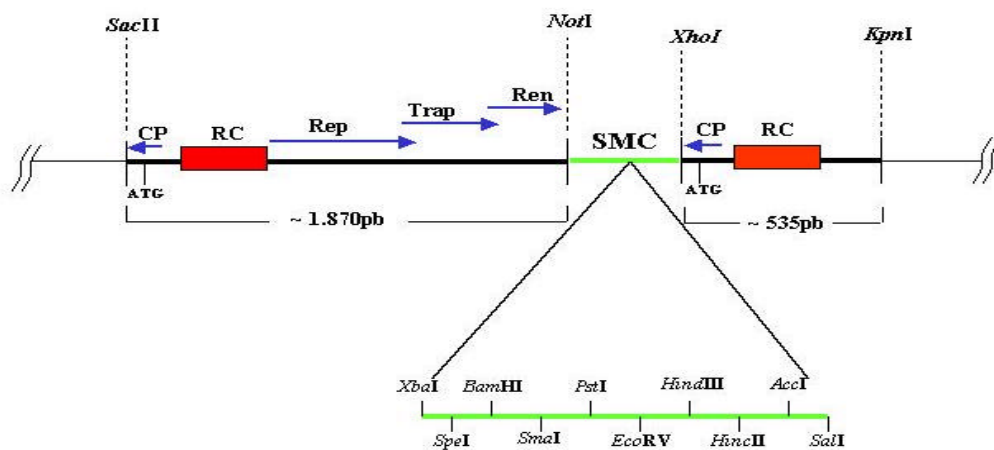
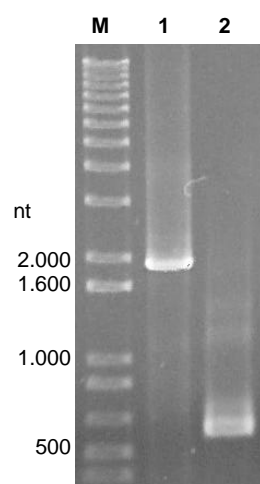


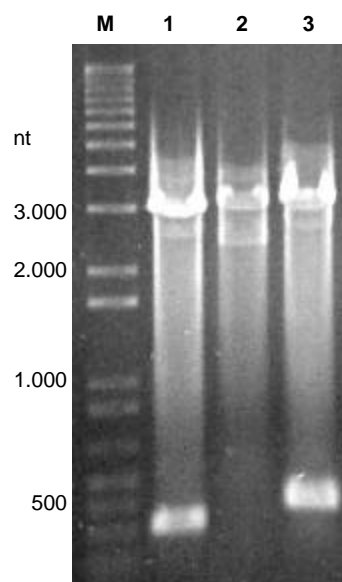
Figura 1. Representação esquemática do genoma do DNA-A do ToRMV e dos oligonucleotídeos utilizados para construção do vetor viral pToR-A1.4ΔCP. As setas em azul indicam os genes virais e a direção em que ocorre a transcrição: *rep*, “replication-associated protein”; *trap*, “trans-activating protein”; *ren*, “replication-enhancer protein”; *cp*, proteína capsial (“coat protein”). A região comum (RC) e a posição do nucleotídeo +1 do genoma viral também estão indicadas. As setas verdes indicam a região de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados para a construção do vetor viral. P1-CP/Sac II e P2-AC3/Not I, amplificação de fragmento de 1.870 nt. P3-CP/Xho I e P4-Rep/Kpn I, amplificação de fragmento de 535 nt.



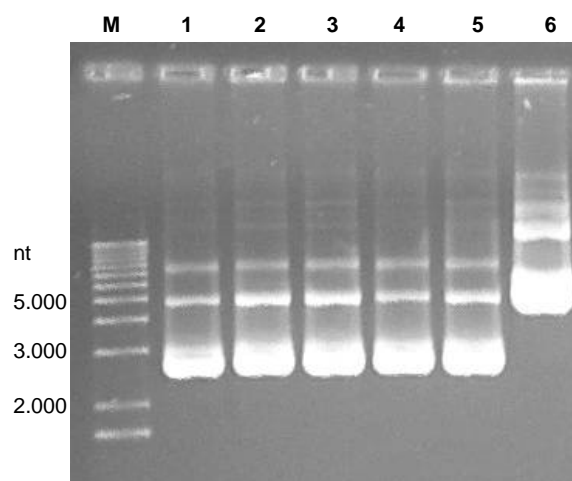
**Figura 2.** Representação esquemática do vetor viral pToR-A1.4 CP. As setas em azul indicam os genes virais provenientes do DNA-A do ToRMV, e a direção em que ocorre a transcrição: *rep*, “replication-associated protein”; *trap*, “trans-activating protein”; *ren*, “replication-enhancer protein”; *cp*, proteína capsial (“coat protein”). A região comum (RC) e o códon de iniciação da ORF CP também estão indicados. SMC, sítio múltiplo de clonagem proveniente do plasmídeo pKS+.



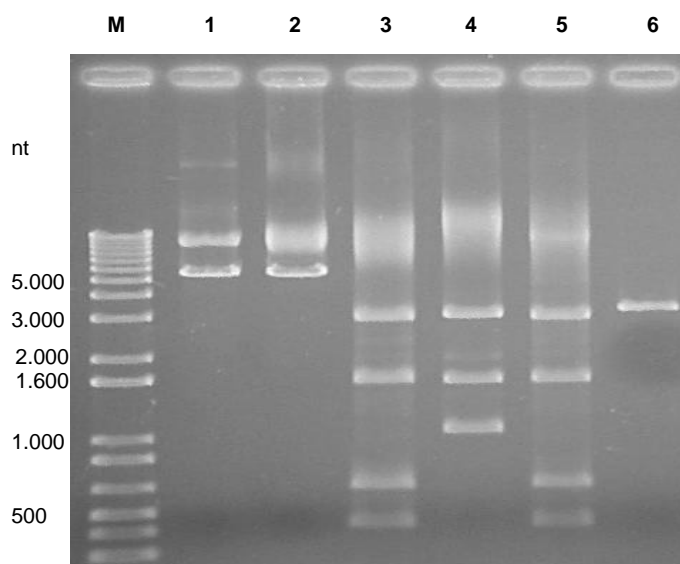
**Figura 3.** Padrão eletroforético em gel de agarose (0,9%) dos produtos da amplificação via PCR para a construção do vetor pToR-A1.4 CP. **M**, marcador de comprimento (“1 kb plus DNA ladder”); **1**, amplificação do fragmento com 1.870 nt; **2**, amplificação do fragmento com 535 nt.



**Figura 4.** Padrão eletroforético em gel de agarose (0,9%) dos plasmídeos recombinantes correspondentes ao clone pToR-A0.4 clivados com *Kpn* I e *Xho* I. **M**, marcador de comprimento (“1 kb DNA ladder plus”); **1**, plasmídeo recombinante com inserto de comprimento inferior ao esperado; **2**, plasmídeo recombinante sem inserto; **3**, plasmídeo recombinante com inserto do comprimento esperado (535 nt).



**Figura 5.** Padrão eletroforético em gel de agarose (0,9%) dos plasmídeos recombinantes correspondentes ao clone pToR-A1.4 CP. **M**, marcador de comprimento (“1 kb DNA ladder plus”); **1, 2, 3, 4, 5**, plasmídeos recombinantes sem inserto; **6**, plasmídeo recombinante com inserto do comprimento esperado (aproximadamente 5.400 nt).



**Figura 6.** Padrão eletroforético em gel de agarose (0,9%) dos plasmídeos recombinantes correspondentes ao clone pToR-A1.4 CP clivados com várias enzimas. **M**, marcador de comprimento (“1 kb DNA ladder plus”); **1**, pToR-A1.4 linearizado com *Hind* III; **2**, pToR-A1.4 linearizado com *Bam* HI; **3**, clone pToR-A1.4 CP clivado simultaneamente com as enzimas *Sac* II, *Kpn* I e *Hind* III, observando-se o fragmento correspondente ao plasmídeo pKS+ (1.900 nt) e os fragmentos com 1.870 nt e 535 nt.; **4**, clone pToR-A1.4 CP clivado com a enzima *Sal* I, observando-se o fragmento correspondente ao vetor pKS+ (1.900 nt), o fragmento com 1.870 nt e um fragmento de aproximadamente 1.050 nt; **5**, clone pToR-A1.4 CP clivado simultaneamente com as enzimas *Sac* II, *Kpn* I e *Bam* HI, observando-se o fragmento correspondente ao plasmídeo pKS+ (3.000 nt) e os fragmentos com 1.870 nt e 535 nt. **6**, clone pToR-A0.4 CP clivado com a enzima *Kpn* I.