

RAFAELO MARQUES GALVÃO

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE DOIS NOVOS BEGOMOVÍRUS QUE
INFECTAM TOMATEIRO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2000

À minha família e à minha querida Rita.

AGRADECIMENTO

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de obter este título.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão da bolsa.

À professora Elizabeth P. B. Fontes, pela orientação, pelo aprendizado e pela oportunidade no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas.

À minha querida Rita, pelo carinho, pelo apoio, pelo incentivo e pela compreensão.

À minha família, principalmente meus pais e meu irmão Renan.

Ao grupo de almoço, pelo alegre convívio.

A todos os colegas de bancada do laboratório, pelo aprendizado, pelo convívio e pela amizade.

Ao meu companheiro Marcelo Mandelli, pela brilhante colaboração na realização deste trabalho.

Aos professores Francisco Murilo Zerbini e Wagner Campos Otoni e à equipe dos laboratórios de Virologia Molecular e de Cultura de Tecidos.

Ao professor Everaldo Gonçalves de Barros, pelo aprendizado e pela concessão do programa “DNA Star”.

BIOGRAFIA

RESUM RAFAELO MARQUES GALVÃO, filho de Elizeu Nunes Galvão e Angela M. Rodrigues Marques Galvão, nasceu em 26 de novembro de 1974, em Vitória-ES.

INTRODUÇÃO No início de 1997, recebeu o grau de Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Viçosa.

2.1 No período de 1995 a 1997, foi monitor nível I de Citologia, disciplina oferecida pelo Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa à diversos cursos de graduação. Recém formado, em 1997 ingressou no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (BIOAGRO/UFV) na qualidade de bolsista de Aperfeiçoamento, atuando no projeto “Métodos Moleculares Para Diagnose de Infecções por *Geminivirus* e Caracterização Molecular de Novos Isolados Brasileiros”.

3.1 Em fevereiro de 1998 foi admitido no Programa de Pós-Graduação de Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em 27 de março 2000.

3.2 Clonagem dos fragmentos amplificados 22

3.4. Reações de sequenciamento 23

4.3. Clonagem do genoma viral 23

3.5.1. Clonagem do componente B a partir de DNA total de tomateiros do Rio de Janeiro	23
3.5.2. Amplificação do componente A e sua clonagem parcial	24
3.6. Caracterização molecular do genoma viral	25
3.6.1. Sequenciamento dos clones	25
3.6.2. Obtenção e descrição dos subclones de pUFV 248	25
3.7. Análise das seqüências	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. Identificação de dois novos <i>Begomovirus</i> que infectam tomateiros ..	28
4.1.1. Diagnóstico molecular dos tomateiros infectados	28
4.1.2. Clonagem dos fragmentos amplificados e identificação de dois novos <i>Begomovirus</i> ..	28
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Organização do genoma dos geminivírus	4
2.2. Função gênica	8
2.3. Replicação	14
2.4. Movimento	16
2.5. Geminivírus de tomateiros do Novo Mundo	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Material vegetal e extração de DNA	20
3.2. Diagnose da infecção viral via PCR	21
3.3. Clonagem dos fragmentos amplificados	22
3.4. Reações de seqüenciamento	23
3.5. Clonagem do genoma viral	23

3.5.1. Clonagem do componente B a partir de DNA total de tomateiros do Rio de Janeiro	23
3.5.2. Amplificação do componente A e sua clonagem parcial	24
3.6. Caracterização molecular do genoma viral	25
3.6.1. Seqüenciamento dos clones	25
3.6.2. Obtenção e descrição dos subclones de pUFV 248	25
3.7. Análise das seqüências	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. Identificação de dois novos <i>Begomovirus</i> que infectam tomateiros ...	28
4.1.1. Diagnóstico molecular dos tomateiros infectados	28
4.1.2. Clonagem dos fragmentos amplificados e identificação de dois novos <i>Begomovirus</i>	30
4.2. Clonagem e caracterização molecular do TYhMV	35
4.2.1. Clonagem do componente B do TYhMV	35
4.2.2. Caracterização molecular do componente B do TYhMV	35
4.3.3. Filogenia do componente B do TYhMV	39
4.2.4. Clonagem do componente A de TYhMV	42
5. RESUMO E CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
APÊNDICE	60

EXTRATO

GALVÃO, Rafaelo Marques, M.S., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2000. **Caracterização parcial de dois novos begomovírus que infectam tomateiro**. Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Conselheiros: Francisco Murilo Zerbini Júnior e Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

A família Geminiviridae compreende um grupo de vírus de plantas que são empacotados em vírions como DNA fita simples e ocorrem como DNA fita simples e fita dupla nas células infectadas. Seu genoma pode ser monopartido ou bipartido. O genoma dos geminivírus bipartidos é dividido em dois componentes genômicos, denominados DNA A e DNA B. Utilizando-se ensaios de PCR, foram detectados geminivírus em plantas sintomáticas de tomateiros (*Lycopersicon esculentum*), coletadas nos Estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro, Brasil. Com oligonucleotídeos degenerados específicos para cada componente, fragmentos de tamanhos esperados, correspondentes aos componentes A e B de geminivírus, foram amplificados a partir do DNA total de tomateiros infectados. Esses resultados confirmaram a natureza bipartida destes geminivírus. Os fragmentos amplificados, contendo as regiões intergênicas mais as seqüências flanqueadoras 3' e 5', foram clonados e seqüenciados. A análise comparativa das seqüências revelou que os fragmentos destes geminivírus

apresentam moderada conservação de seqüência com outros membros do gênero *Begomovirus* e preenchem os requerimentos para serem caracterizados como novos vírus distintos. Suas regiões intergênicas diferem significativamente na seqüência de nucleotídeos, e a seqüência deduzida de aminoácidos da região N-terminal de suas proteínas capsidiais não supera 85% de identidade com outras espécies do gênero *Begomovirus*. Coletivamente, esses resultados indicam que os dois geminivírus que infectam tomateiro, detectados em plantas coletadas nos Estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais, são novas espécies da família Geminiviridae. O geminivírus do Estado do Rio de Janeiro, aqui designado TYhMV (“Tomato yellowish mosaic virus”), foi parcialmente caracterizado com a clonagem e o seqüenciamento completo do componente B. A taxonomia do novo vírus foi confirmada pela análise filogenética baseada na seqüência do componente B e na seqüência deduzida de aminoácidos das proteínas BV1 e BC1. Esses resultados confirmaram que o novo vírus pode ser classificado como uma espécie distinta de *Begomovirus*, sendo mais relacionado com os *Begomovirus* TGMV e BGMV, previamente identificados no Brasil. A tentativa de clonagem do componente A completo amplificado com oligonucleotídeos específicos resultou em quatro clones distintos, os quais compartilham a seqüência da região intergênica. Embora estes clones não tenham sido totalmente caracterizados, a comparação de suas regiões intergênicas com a correspondente região do componente B clonado revelou que eles compartilham 98,5% de identidade de seqüência. O alto grau de conservação da seqüência de suas regiões intergênicas indica que o componente B clonado e os clones do componente A pertencem ao genoma de TYhMV.

ABSTRACT

GALVÃO, Rafaelo Marques, M.S., Universidade Federal de Viçosa, September 2000. **Partial characterization of two new tomato-infecting begomovirus.** Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Committee Members: Francisco Murilo Zerbini Júnior and Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

The Geminiviridae family comprises a group of plant viruses that are packaged as single-stranded DNA in virions and exist as single-stranded and double-stranded DNA in infected cells. Their genome can be either monopartite or bipartite. The genome of the bipartite geminiviruses is spliced between two genomic components, designated DNA A and DNA B. We have used a PCR-based diagnostic assay to detect geminiviruses in symptomatic tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants, collected in the states of Minas Gerais and Rio de Janeiro, Brazil. With degenerate primers specific for each component, the correctly sized fragments corresponding to A and B components of geminiviruses were amplified from DNA extracts of tomato plants. These results confirmed the bipartite nature of these geminiviruses. The amplified fragments corresponding to the intergenic region plus 5' and 3' flanking sequences were cloned and sequenced. Sequence comparison analysis revealed that they share a moderate conservation of sequences with other members of the *Begomovirus*

genus and fit well into the requirements for distinct, new viruses. Their intergenic regions differ significantly in nucleotide sequence and the deduced N-terminal regions of their coat protein share no more than 85% identity with other species of the *Begomovirus* genus. Taken together, these results indicate that the two tomato-infecting geminiviruses detected in plants collected in the states of Minas Gerais and Rio de Janeiro, Brazil, are distinct, new species of the family Geminiviridae. The tomato-infecting geminivirus from Rio de Janeiro, here designated TYhMV (tomato yellowish mosaic virus), was further characterized by full-length cloning and sequencing of its B component. The taxonomy of the new virus was further confirmed by phylogenetic analysis based on the sequence of the B component and the deduced aminoacid sequence of the BV1 and BC1 proteins. These results confirmed that the new virus may be classified as a distinct species of *Begomovirus*, more related to other previously characterized *Begomovirus* from Brazil, such as TGMV and BGMV. Attempts to clone the fully amplified A component with specific primers resulted in four distinct clones, which share the same sequence of the intergenic region. Although these clones have not been fully characterized, comparison of their intergenic region with the corresponding region of the cloned B component revealed that they share 98.5 % sequence identity. The high degree of sequence conservation of their intergenic regions indicates that the cloned B component and the clones of the A component belong to the genome of TYhMV.

1. INTRODUÇÃO

A família *Geminiviridae* representa um dos mais importantes grupos de vírus que infectam plantas, tanto no contexto agrônômico quanto no científico. Os geminivírus causam grandes prejuízos econômicos, infectando culturas de grande importância em todo o mundo, como milho, algodão, mandioca, feijão e tomate. Nos últimos anos, graças à explosão populacional de um de seus principais vetores, os geminivírus têm sido considerados um grupo de vírus emergente (BROWN e BIRD, 1992).

Esses vírus se caracterizam por ter seu genoma representado por uma ou duas moléculas de DNA fita simples circular, empacotadas em partículas icosaédricas geminadas, característica marcante do grupo. Sua replicação ocorre no núcleo das células infectadas via um intermediário de DNA fita dupla. Em sua maioria, são restritos ao floema e, portanto, de difícil transmissão mecânica (LAZAROWITZ, 1992). São transmitidos naturalmente por insetos, de forma circulativa não-propagativa, mais especificamente por moscas-brancas (*Homoptera: Stenorrhyncha: Aleyrodidae*), por cigarrinhas (*Homoptera: Auchenorrhyncha: Cicadellidae*) ou por "treehopper" (*Homoptera: Auchenorrhyncha: Membracidae*).

A natureza bioquímica de seu genoma, o mecanismo de replicação e transcrição a ele associados e sua estratégia de movimento fazem dos

geminivírus um grupo de vírus de plantas incomum. Eles codificam uma única proteína viral requerida e suficiente para o processo de replicação e que não tem função de polimerase. Isso indica alto envolvimento da maquinaria de replicação da célula infectada no sucesso da amplificação do genoma viral. A disseminação desses vírus dentro da planta é assistida por uma proteína de movimento intracelular, além de uma outra tipicamente envolvida no movimento célula - célula. Essas características elevam os geminivírus à qualidade de excelentes modelos para estudo de eventos celulares em plantas, como replicação, controle de transcrição e transporte de macromoléculas (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999; WARD e LAZAROWITZ, 1999). A evolução e o surgimento de novas espécies de geminivírus por recombinação (HONG e HARRISON, 1995; BRIDDON et al., 1996; ZHOU et al., 1997), bem como a influência da infecção no ciclo celular do hospedeiro (NAGAR et al., 1995; XIE et al., 1995; ACH et al., 1997), também têm sido alvo de diversos estudos.

A família Geminiviridae é composta por quatro gêneros: 1) *Mastrevirus*, que são transmitidos por cigarrinha, possuem apenas um componente genômico e infectam espécies monocotiledôneas; 2) *Curtovirus*, que também são transmitidos por cigarrinha, possuem componente único e infectam dicotiledôneas; 3) *Begomovirus*, que incluem os vírus transmitidos por mosca-branca a dicotiledôneas e possuem um ou dois componentes genômicos; e 4) *Topocuvirus*, com uma única espécie de um componente, que é transmitido por “treehopper” em dicotiledôneas.

Diversas novas espécies de *Begomovirus* têm sido identificadas, devido principalmente à expansão populacional de uma nova e mais agressiva espécie de mosca-branca (*Bemisia argentifoli*). Muitos destes novos isolados têm sido encontrados em tomateiros. O crescente número de *Begomovirus* que infectam tomateiros vem causando sérios danos econômicos em regiões tropicais e subtropicais. Têm sido relatadas perdas nas culturas de tomate em regiões da América do Sul, da América Central e dos Estados Unidos e em alguns países do Mediterrâneo, da África, do Oriente Médio, da Ásia e Austrália. No Brasil, geminivirose de tomateiros foram relatadas pela primeira vez em 1975. Nos

últimos anos a sua disseminação ocorreu rapidamente, e hoje estão presentes em praticamente todos os estados onde se produz tomate.

O diagnóstico, a identificação e a caracterização de novos isolados são de suma importância para o conhecimento básico desse importante grupo de vírus e também para a pesquisa aplicada que objetiva o desenvolvimento de estratégias de proteção de plantas cultivadas. O presente estudo visou a identificação e caracterização de dois novos geminivírus que infectam tomateiros, pertencentes ao gênero *Begomovirus*. Ambos tiveram parte de seu genoma clonado e seqüenciado. Os dados obtidos permitiram a caracterização molecular e filogenética desses novos isolados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Organização do genoma dos geminivírus

Os geminivírus possuem genoma de DNA fita simples circular com cerca de 2,6 Kb, podendo ser constituído por um ou dois componentes, denominados A e B (LAZAROWITZ, 1992). Os componentes genômicos de um vírus divergem completamente em seqüência, com exceção de uma região de 250 - 300 pb, denominada região comum (CR – "Comon Region"), que é cerca de 95% conservada entre os componentes (Figura 1). Esta região se caracteriza por conter uma seqüência repetida invertida, rica em CG, que gera uma estrutura secundária em forma de grampo ("hairpin"). Nos vírus monopartidos, a região homóloga à região comum é chamada de região intergênica maior (LIR – "Large Intergenic Region") ou simplesmente de região intergênica (IR - "Intergenic Region"). A estrutura de grampo formada é comum ao genoma de todos os geminivírus, apesar de a CR, ou IR, como um todo, ser, em termos de seqüência, uma das mais divergentes regiões entre os geminivírus de diferentes espécies (LAZAROWITZ, 1992; HANLEY-BOWDOIN et al., 1999).

A seqüência 5'-TAATATTAC-3', flanqueada pelas seqüências repetidas invertidas ricas em CG, representa a alça ("loop") da estrutura em forma de grampo. Esta seqüência foi identificada como o sítio de início de replicação da

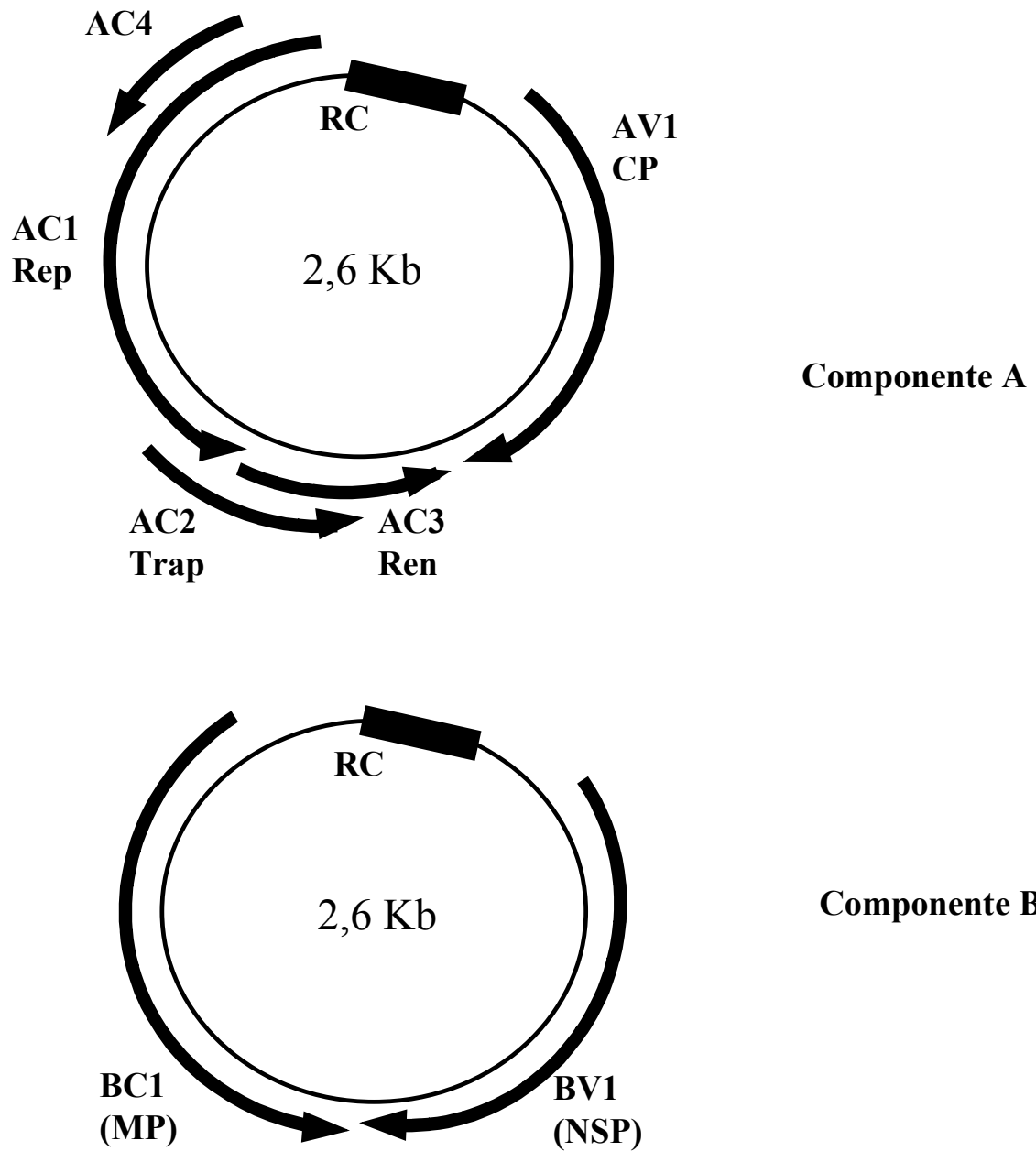


Figura 1 - Organização do genoma de um *Begomovirus* de dois componentes (A e B). O retângulo preto representa a região comum, e as setas, as ORFs e a direção de sua transcrição.

fita positiva e é conservada em todos os membros da família *Geminiviridae* (FONTES et al., 1994b; LAUFS et al., 1995b; STANLEY, 1995; HEYRAUD-NITSCHKE et al., 1995; OROZCO e HANLEY-BOWDOIN, 1996). A origem de replicação da fita negativa ainda não foi identificada.

Na CR, ou IR, encontram-se, além do sítio de clivagem, outros cis - elementos envolvidos na interação com transfatores que atuam na replicação e no controle da transcrição (FONTES et al., 1994a,b; EAGLE e HANLEY-BOWDOIN, 1997; LIU et al., 1997b). Ensaios com os geminivírus correlatos, “*Bean golden mosaic mirus*” (BGMV) e “*Tomato golden mosaic mirus*” (TGMV) pseudo-recombinados, demonstraram que a estrutura de grampo conservada não contribui para a especificidade da interação com *Rep*, a proteína iniciadora da replicação dos geminivírus, mas constitui um domínio funcional da origem de replicação. Além do potencial “hairpin”, pelo menos mais dois cis-elementos requeridos para a replicação estão contidos na CR. Um deles é um sítio vírus-específico de ligação de *Rep*, com o qual a proteína de replicação interage com alta afinidade (FONTES et al., 1994a,b). O outro cis-elemento adicional contribui para o reconhecimento específico da origem por transfatores (OROZCO et al., 1998).

A CR, ou IR, separa duas unidades de transcrição divergentes, uma na fita senso e outra na fita complementar do vírion. De fato, ela contém os promotores de ambas as unidades de transcrição. As seqüências abertas de leitura (ORF - “open reading frame”) nos geminivírus são denominadas conforme o sentido de transcrição e, no caso dos bipartidos, do componente em que se encontram. Assim, as ORFs na fita do vírion (+) são denominadas V (anteriormente R - “right”), que correspondem à unidade de transcrição à direita da Região Comum ou Intergênica, e, na fita complementar (-), são designadas C (anteriormente L - “left”), que correspondem à unidade à esquerda da Região Intergênica (LAZAROWITZ, 1992).

Em “*Maize streak virus*” (MSV), membro tipo do gênero *Mastrevirus* (antigo subgrupo I), o seu único componente codifica quatro ORFs, denominadas

V1 e V2 (na fita do vírion) e C1 e C2 (na fita complementar). Os produtos das ORFs da fita senso estão envolvidos no desenvolvimento de sintomas sistêmicos e de empacotamento, enquanto os da fita complementar, na replicação. Em oposição à LIR, os geminivírus desse gênero possuem a chamada região intergênica menor (SIR - “Small Intergenic Region”) ao final das unidades transcricionais divergentes (STANLEY, 1993; BOULTON et al., 1993; RYBICKI, 1994).

O gênero *Begomovirus* (antigo subgrupo III), que engloba os geminivírus bipartidos, é provavelmente o grupo mais bem caracterizado. Os geminivírus de dois componentes são capazes de transcrever sete ORFs, denominadas AV1 da fita senso, AC1, AC2, AC3 e AC4, da fita complementar do componente A; e BV1 e BC1 no componente B, respectivamente na orientação do vírion e complementar (Figura 1). Os genes localizados no componente A estão relacionados com replicação, controle de transcrição e empacotamento, e aqueles situados no componente B, com o movimento e desenvolvimento de sintomas sistêmicos (SUNTER e BISARO, 1989; ELMER et al., 1988; KALLENDER et al., 1988; BROUGH et al., 1992; SANDERFOOT e LAZAROWITZ, 1995). Os *Begomovirus* de apenas um componente, como o “*Tomato yellow leaf curl virus*” (TYLCV), possuem seis ORFs: V1, V2 e C1, C2, C3 e C4. A organização da unidade transcricional da fita do vírion parece com a dos membros dos gêneros *Mastrevirus* e *Curtovirus*, e os produtos das ORFs dessa orientação (V1 e V2) estão envolvidos com o movimento viral e o empacotamento. As ORFs da fita complementar contêm a informação para proteínas envolvidas na replicação, com exceção de C4, que está relacionada com o desenvolvimento de sintomas sistêmicos (JUPIN et al., 1994; DESBIEZ et al., 1995).

Nos *Curtovirus*, cujo membro-tipo é o “*Beet curl top virus*” (BCTV), são observadas sete ORFs: C1, C2, C3 e C4, na unidade de transcrição da fita complementar, e V1, V2 e V3, na fita senso. Os produtos das ORFs da fita complementar estão envolvidos na replicação e na transativação das ORFs da fita senso, que por sua vez estão envolvidas no desenvolvimento de sintomas sistêmicos e no empacotamento (BRIDDON et al., 1989; STENGER e

OSTROW, 1996). Os *Curtovirus* têm a particularidade de serem provavelmente originados da fusão por recombinação da unidade de transcrição à esquerda da RC do componente A dos *Begomovirus* com a unidade à direita da LIR dos *Mastrevirus*. Análises de comparação de seqüência e homologia de função dos genes apóiam essa hipótese (LAZAROWITZ, 1992; RYBICKI, 1994).

O recém-criado gênero *Topocuvirus* está representado pela espécie “*Tomato pseudo curly top virus*” (TPCTV). O genoma deste vírus possui seis ORFs. A unidade transcricional da fita complementar ao vírion possui quatro ORFs sobrepostas, denominadas C1, C2, C3 e C4, assim como ocorre nos *Curtovirus* e *Begomovirus*. Na fita do sentido do vírion, o TPCTV possui duas ORFs (V1, a capa protéica, e V2, a proteína de movimento), numa organização similar à que ocorre no BCTV. Entretanto, em termos de seqüência, o TPCTV, na região dessas ORFs, diverge intensamente dos demais geminivírus (BRIDDON et al., 1996).

2.2. Função gênica

Os geminivírus codificam uma única proteína suficiente para iniciar o processo de replicação, *Rep* (“replication protein”), que é o produto da ORF AC1 ou C1 nos *Begomovirus*, *Curtovirus* e *Topocuvirus*, ou a fusão dos produtos das ORFs V1 e V2 nos *Mastrevirus*. A proteína *Rep*, apesar de não possuir nenhuma semelhança com as polimerases conhecidas, é a única proteína viral requerida e suficiente para o processo de replicação. Ensaio de complementação de função de vírus defectivos por expressão transgênica de ORFs virais determinaram que a *Rep* é capaz de, na presença de fatores do hospedeiro, sustentar a amplificação, no caso dos vírus bipartidos, de ambos os componentes (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999).

A *Rep* é muito conservada, principalmente entre os geminivírus que infectam dicotiledôneas. Ela reconhece especificamente a origem de replicação da fita (+), cliva uma das fitas da forma replicativa em uma seqüência específica

para iniciar o processo de replicação e catalisa a ligação para recircularização do genoma recém-sintetizado (LAZAROWITZ, 1992; FONTES et al., 1992, 1994a, b; HANLEY-BOWDOIN et al., 1999). SUNTER et al. (1993) demonstraram que a *Rep* de TGMV interfere na regulação da própria expressão, inibindo sua transcrição na fase adiantada da infecção.

A *Rep* é capaz de alterar a programação do ciclo celular nos tecidos infectados do hospedeiro. Tanto a infecção por TGMV como a expressão transgênica de sua proteína *Rep* foram capazes de promover, em células diferenciadas de tabaco, a síntese de PCNA (“Proliferating Cell Nuclear Antigen”), um fator acessório para a DNA polimerase δ , produzido apenas em células em franco processo de multiplicação (NAGAR et al., 1995). Além disso, a proteína *Rep* do “*Wheat dwarf virus*” (WDV), através do domínio LxCxE, é capaz de se ligar a p130^{Rb2}, um membro da família das proteínas de retinoblastoma de animais (XIE et al., 1995). A associação estável entre duas proteínas do milho homólogas a proteínas de retinoblastoma com a proteína *Rep* de TGMV também foi demonstrada (ACH et al., 1997). Uma vez que a família de proteínas de retinoblastoma exerce papel-chave na regulação da progressão do ciclo celular, esses resultados indicam que a *Rep* está diretamente envolvida no mecanismo pelo qual o vírus cria um ambiente permissível à sua replicação em células completamente diferenciadas.

Estudos com proteínas quiméricas e truncadas mapearam os diversos domínios funcionais das atividades bioquímicas desempenhadas por *Rep*. No terminal amino, encontram-se os domínios de clivagem, oligomerização e de ligação ao DNA, em relativa sobreposição (LAUFS et al., 1995b; OROZCO et al., 1997). Para *Rep* de TGMV, a oligomerização é pré-requisito para a atividade de ligação, apesar de a estequiometria da interação de *Rep* com a origem de replicação não ter sido determinada (SETTLAGE et al., 1996).

Ainda na porção amino de *Rep*, três domínios têm sido caracterizados com funções relacionadas à ligação e clivagem do DNA, assim representadas: NH – I (FLTY), II (HLH) e III (tirosina conservada) – COOH (LAUFS et al., 1995a). A presença desses três domínios caracteriza uma grande família de

proteínas, que agrupam as proteínas iniciadoras de replicação círculo rolante (RCR) e proteínas *Mob* envolvidas na conjugação de bactérias, ambas comuns em sistemas procariotos (ILYINA e KOONIN, 1992).

A *Rep* dos geminivírus de dicotiledôneas possui, também na porção amino, duas α -hélices, relacionadas com a função de ligação e clivagem do DNA. Apesar de muitos domínios de ligação de proteínas ligantes de DNA (“DNA Binding Proteins”) incluírem α -hélices, baixa é a homologia entre a referida região de *Rep* e os domínios clássicos de ligação ao DNA (“zinc-finger”, “helix-loop-helix” e “leucine zipper”). A maior similaridade do N-terminal ocorre em comparação com o domínio “helix-turn-helix” (JUPIN et al., 1995; OROZCO et al., 1997).

Além dos domínios comuns às proteínas iniciadoras da RCR, a proteína *Rep* dos geminivírus possui no seu terminal carboxílico uma seqüência conservada de ligação a nucleotídeos trifosfatos (Gly-x-x-x-x-Gly-Lys-Thr) chamada “P-loop” (DESBIEZ et al., 1995; OROZCO et al., 1997).

Com exceção dos geminivírus que infectam monocotiledôneas, todos os demais codificam uma proteína acessória envolvida na replicação, designada *Ren* (“Replication Enhancer Protein”), que é o produto da ORF C3 ou AC3 nos bipartidos (ELMER et al., 1988). *Ren* é uma proteína de aproximadamente 18 kDa, traduzida a partir de um mRNA policistrônico. Apesar de não ser essencial para replicação do genoma viral, AC3/C3 é responsável pelo acúmulo de DNA viral em níveis normais. Ensaio com protoplastos de tabaco demonstraram que *Ren* é capaz de aumentar 50 vezes a eficiência da replicação (SUNTER et al., 1990), e mutações na ORF AC3/C3 causam atenuação de sintomas (SUNTER et al., 1993; PEDERSEN e HANLEY-BOWDOIN, 1994).

Diversas proteínas iniciadoras de replicação reconhecem a origem com auxílio de proteínas acessórias com as quais se complexam. Experimentos de imunoprecipitação com TGMV e proteínas quiméricas demonstraram a ocorrência das interações *Rep:Rep*, *Rep:Ren*, *Ren:Ren*, sugerindo que a atividade “enhancer” de *Ren* envolve sua interação direta com *Rep* (SETTLAGE et al., 1996). Ensaio de expressão transiente revelaram transcomplementação de vírus

mutantes pela expressão transgênica de *Ren* heteróloga. Assim, a atividade de *Ren* não contribui para a especificidade da replicação de vírus cognatos (SUNTER et al., 1994).

Nos geminivírus que infectam dicotiledôneas, a ORF AC2/C2 na unidade à esquerda da CR codifica uma proteína chamada *TrAp* (“Trans Activador Protein”). Mutantes para esta ORF diminuem drasticamente a infectividade, apesar de não alterarem o acúmulo de DNA viral, conforme demonstrado em ensaios de replicação em discos foliares e protoplastos de tabaco (SUNTER et al., 1990).

A função de *TrAp* no geminivírus é de transativar o(s) promotor(es) da unidade direita de transcrição. O produto de AC2/C2 é requerido para a expressão normal da capa protéica e de BV1, proteína de movimento dos vírus bipartidos (HAYES e BUCK, 1989; SUNTER et al., 1990; SUNTER e BISARO, 1992). Experimentos *in vitro* e *in vivo* de expressão do gene repórter GUS, controlada pelo promotor da proteína do capsídeo, revelaram que AC2 atua, provavelmente, em combinação com proteínas do hospedeiro, ativando ou reprimindo a expressão de CP, dependendo do tipo de célula. AC2 é capaz ainda de ativar promotores cromossomais, influenciando a expressão de genes do hospedeiro (SUNTER et al., 1993).

Os membros do gênero *Mastrevirus* que infectam monocotiledôneas expressam a partir da unidade transcricional complementar um mRNA policistrônico com um intron típico, o qual contém a informação para a tradução de C1 e C2, que, unidas em exons, correspondem a uma proteína com a função de *Rep*. Os geminivírus desse grupo, com exceção dos adaptados às dicotiledôneas, não codificam nenhum homólogo a *TrAp* e *Ren* (LAZAROWITIZ, 1992).

Em sobreposição a ORF AC1/C1, os geminivírus que infectam dicotiledôneas possuem a ORF AC4/C4, em outro quadro de leitura. A proteína traduzida tem aproximadamente 10 kDa. Nos *Begomovirus* bipartidos, a AC4 não parece ser funcional ou sua função se sobrepõe à de outro produto viral (POOMA et al., 1996). Nos bipartidos TGMV e "*African cassava mosaic virus*"

(ACMV), mutações em AC4 não resultam em nenhum fenótipo aparente em ensaios de infectividade. Em contraste, a AC4 de TGMV foi capaz de reprimir a expressão da ORF AC1 em protoplastos de tabaco (GRONING et al., 1994). JUPIN et al. (1994) sugeriram seu envolvimento no movimento de TYLCV, especificamente no floema, apesar de C4 não possuir homologia com nenhuma outra proteína de movimento. Essa função de movimento parece estar relacionada à C4 dos geminivírus monopartidos, para os quais ela é essencial no desenvolvimento de sintomas sistêmicos da doença. Entre os *Curtovirus* e *Topocuvirus*, C4 é muito conservada, sendo determinante na patogenicidade (BRIDDON et al., 1996).

Os geminivírus são encapsulados por partículas icosaédricas geminadas, formadas por uma única proteína capsidial. A proteína do capsídeo (CP – “coat protein”) é o produto da ORF V2 nos monopartidos e da AR1/AV1 nos bipartidos. Uma vez que os geminivírus mutantes para CP perdem a capacidade de serem transmitidos por insetos, o empacotamento do vírion é requerido no processo de transmissão natural (AZZAM et al., 1994). A CP também influencia a especificidade da propagação por inseto (BRIDDON et al., 1990, 1996; HOFER et al., 1997).

Embora a CP não interfira na replicação do genoma viral, a mutação no gene AV1/V2 diminui a eficiência de acúmulo de DNA fita simples (AZZAM et al., 1994; LIU et al., 1997a). Provavelmente a presença de CP protege o “pool” de DNA viral fita simples contra degradação por nucleases. Alternativamente, a proteína do capsídeo exerce algum papel regulatório na síntese de DNA fita simples.

A proteína do capsídeo dos *Begomovirus* bipartidos parece não ser essencial para o desenvolvimento dos sintomas sistêmicos quando infecta hospedeiros aos quais está bem adaptada, como no caso de TGMV em *N. benthamiana* e BGMV em feijoeiro (GARDINER et al., 1988). Em contraste, hospedeiros aos quais os referidos vírus estão menos adaptados, por exemplo *Datura stramonium* (TGMV) e *N. benthamiana* (BGMV), exigem a presença de CP funcional para a propagação sistêmica do vírus (POOMA et al., 1996).

Conseqüentemente, a dependência da proteína do capsídeo para o estabelecimento de uma infecção sistêmica causada por *Begomovirus* se deve ao “background” genético do hospedeiro.

Nos geminivírus monopartidos, a CP (V2) é traduzida por um mRNA policistrônico com um códon de iniciação interno e absolutamente requerida no processo de movimento e desenvolvimento dos sintomas sistêmicos (BOULTON et al., 1989; BRIDDON et al., 1989; WARTIG et al., 1997). A proteína do capsídeo de MSV exibe atividade bioquímica de ligação ao DNA fita dupla e fita simples, sendo seu domínio de ligação ao DNA já mapeado, assim como um sinal de localização nuclear (NLS – “Nuclear Localization Signal”) (LIU et al., 1997a). Com base nessas observações, além da função de empacotamento viral, o envolvimento da CP no movimento nuclear do genoma viral, agindo como “Nuclear Shuttle Protein” (NSP), tem sido proposto.

Na mesma unidade transcricional da CP, os geminivírus monopartidos codificam a única proteína não-estrutural exclusiva de movimento, V1, com aproximadamente 10,5 kDa, que é traduzida a partir do primeiro códon de iniciação do transcrito policistrônico da fita no sentido do vírion. Enquanto mutações no gene V1 não afetam a replicação e o empacotamento viral, os mutantes são deficientes no movimento sistêmico (BOULTON et al., 1993). O produto da ORF V1 possui domínios hidrofóbicos e já foi localizado próximo à membrana, o que sugere sua atuação junto aos plasmodesmas, onde facilita o movimento do vírus (LIU et al., 1997a; WARTIG et al., 1997).

Nos geminivírus bipartidos, as funções de movimento estão concentradas no componente B. O produto de AC2 está, indiretamente, envolvido no movimento, por transativar a expressão do gene BV1. Mutantes para ambas as ORFs do componente B são deficientes no movimento sistêmico. Recentes estudos bioquímicos, moleculares e celulares têm atribuído diversas funções à BC1 e BV1 no movimento do genoma viral. Ensaio bioquímico demonstraram que a BV1 é uma proteína típica de ligação de ácidos nucleicos, mais especificamente DNA fita simples, com o qual se liga com maior afinidade, como demonstrado em experimentos de “gel-shift” (PASCAL et al., 1994).

Consistentemente com sua localização nuclear, a proteína BV1 possui dois NLSs funcionais, localizados no terminal amino (SANDERFOOT et al., 1996). Nos atuais modelos propostos para o movimento dos geminivírus bipartidos, a BV1 desempenha a função de transportar o ssDNA viral do núcleo para o citoplasma, atuando como uma “Nuclear Shuttle Protein” (NSP) (SANDERFOOT et al., 1996; SANDERFOOT e LAZAROWITZ, 1996). Ensaio de infectividade com mutantes demonstraram ainda a interferência de BV1 na determinação da gama de hospedeiro (INGHAM e LAZAROWITZ, 1993).

A BC1 é essencial no movimento e na patogenicidade dos geminivírus bipartidos (PASCAL et al., 1993, INGHAM et al., 1995) e, ao contrário da BV1, atua provavelmente como a proteína de movimento típica análoga à proteína de 30 kDa de TMV. A expressão transgênica de BC1 do "*Squash leaf curl virus*" (SqLCV) em tabaco foi capaz de provocar sintomas similares à infecção pelo próprio SqLCV na ausência de todas as outras proteínas virais (PASCAL et al., 1993). A localização de BC1 na membrana/parede da célula foi demonstrada por imunolocalização, microscopias eletrônica e confocal (SANDERFOOT e LAZAROWITZ, 1995; WARD et al., 1997) e fracionamento celular (PASCAL et al., 1993; NOUEIRY et al., 1994). A BC1, provavelmente, atua nos plasmodesmas, aumentando seu limite de exclusão e facilitando o movimento do genoma viral (NOUEIRY et al., 1994). Recentemente, ROJAS et al. (1998) demonstraram que BC1 e BV1 do BDMV se ligam preferencialmente a DNA fita dupla circular aberto e DNA fita simples. No mesmo trabalho, porém, esses autores mostraram que BV1 e BC1 possuem a propriedade inédita de reconhecer DNA com base no tamanho e na forma.

2.3. Replicação

Coerentemente com o mecanismo do círculo rolante, a replicação do genoma dos geminivírus pode ser separada em duas etapas: i) síntese da fita

complementar ao DNA do vírion, gerando o intermediário replicativo DNA fita dupla; e ii) síntese da fita positiva (sentido do vírion) a partir desse intermediário.

Pouco se sabe sobre a síntese da fita complementar e conversão do genoma do vírion em DNA fita dupla. Esse processo não conta com a participação de nenhum produto viral. Oligonucleotídeos vírion-associados já foram encontrados em alguns *Mastrevirus* (HAYES et al., 1988), bem como no "*Banana bunch top virus*", um outro vírus de DNA fita simples circular (HAFNER et al., 1997).

O DNA viral fita dupla é montado no núcleo em nucleossomos como o DNA genômico do hospedeiro, e, simultaneamente, os genes de expressão precoces são transcritos. A tradução de *Rep* desencadeia, concomitantemente, a alteração da programação do ciclo celular e a replicação do vírion pelo mecanismo do círculo rolante (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999).

Nos modelos sugeridos na literatura, a *Rep*, no mínimo como um dímero, reconhece uma seqüência à esquerda da estrutura em grampo na qual se liga com alta afinidade (FONTES et al., 1994a, b). Essa associação *Rep*:origem de replicação é vírus-específica. A *Rep*, associada ao seu sítio na CR, alcança o sítio de clivagem com o auxílio da proteína *Ren*, com a qual, provavelmente, oligomeriza (SETTLAGE et al., 1996). O nona-nucleotídeo conservado em todos os geminivírus é clivado pela proteína *Rep* entre o 7^o e o 8^o nucleotídeo. A fita (+) é estendida a partir da extremidade 3'-OH livre, reconhecida pela maquinaria replicativa da célula. Uma atividade de helicase parece ser requerida para deslocamento da fita (+) clivada. A DNA polimerase sintetiza uma nova fita (+), que, ao conter uma volta completa, é covalentemente ligada em si mesma, pela ação da própria *Rep*, surgindo um novo genoma de um vírion (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999). A eletroforese em gel bidimensional de agarose permitiu a identificação de diversas formas intermediárias (concatâmeros) do DNA viral de ACMV, que são consistentes com o uso do mecanismo de círculo rolante para replicação de seu genoma (SAUNDERS et al., 1991).

Acredita-se que o DNA viral recém-sintetizado e acumulado no núcleo possa ter destinos diferentes: ser movido, ligando-se à NSP; ser encapsulado pela CP; ou ser convertido em DNA fita dupla.

Em fases iniciais da infecção, a unidade transcricional complementar é fortemente expressa. Ocorre nessa etapa acúmulo de proteínas virais envolvidas principalmente na replicação, além de *TrAP*, que atua no controle de transcrição dos geminivírus de dicotiledôneas (SUNTER et al., 1993). Nessa etapa, o recrutamento do DNA fita simples viral para encapsulamento e movimento é muito baixo. O novo DNA fita simples é convertido novamente em DNA fita dupla, tornando-se um novo molde para transcrição e replicação em círculo rolante.

A *TrAP* acumulada na fase inicial da infecção é a chave para a indução da nova fase da infecção, transativando as funções de empacotamento e “nuclear shuttling”. A CP, tanto na função de empacotamento quanto na de “shuttle protein”, BV1 (nos bipartidos) recrutam o DNA viral fita simples. Concomitantemente, o acúmulo de *Rep* promove sua auto-repressão (SUNTER et al., 1993). Uma nova fase de infecção se instala: a expressão dos genes precoces diminui e a taxa de amplificação cai. Nesta fase, o acúmulo dos chamados genes tardios permite a propagação do vírus para as células vizinhas e produção de novos vírions. Os *Mastrevirus* não possuem homólogos de *TrAP*, porém outro mecanismo age sobre o controle de transcrição dos genes tardios nestes vírus.

2.4. Movimento

O sucesso da infecção sistêmica no hospedeiro por vírus de plantas depende não só de sua habilidade em replicar seu genoma, mas também de sua capacidade de mover célula-a-célula a partir do local de inoculação e no sistema vascular, através do qual alcança novos tecidos não-infectados.

A parede celular é a barreira comum à propagação de todos os vírus de plantas. Em geral, eles codificam uma proteína, não-estrutural, não envolvida na

replicação e no encapsulamento, denominada proteína de movimento (MP). A MP mais bem caracterizada - 30 kDa, do “*Tobacco mosaic virus*” (TMV) - associa-se à membrana celular, atuando como uma espécie de “chaperone” molecular, alterando a arquitetura dos plasmodesmas e aumentando seu limite de exclusão. Alternativamente, as MPs podem formar túbulos associados aos plasmodesmas, facilitando o transporte dos genomas virais associados às proteínas ou até empacotados em vírions (STORM et al., 1995).

Nos geminivírus, que replicam no núcleo, além da parede celular, o envelope nuclear também representa uma barreira para o movimento. No núcleo das células infectadas são retidas todas as formas do DNA viral replicado. Os geminivírus, portanto, dependem de duas proteínas com função de movimento: uma NSP, responsável pelo transporte nuclear do DNA viral, e uma MP típica, que atua ao nível dos plasmodesmas (SANDERFOOT e LAZAROWITZ, 1996).

Experimentos de infectividade e imunolocalização com mutantes para as ORFs BV1 e BC1 de SqLCV possibilitaram a proposição de um modelo em que ambas as proteínas, numa ação coordenada, promovem o movimento do genoma viral, célula-a-célula e nos tecidos do hospedeiro via floema (SANDERFOOT et al., 1996; SANDERFOOT e LAZAROWITZ, 1995, 1996). De acordo com esses estudos, a BV1, no núcleo, interage com o DNA viral fita simples. A ligação da BV1 ao DNA deve, de alguma forma, mascarar seu sinal de retenção nuclear, habilitando o complexo a transpor o envelope nuclear e atingir o citossol. Lá, a BC1 interage diretamente com a BV1-DNA (fita simples), direcionando esse complexo para a periferia da célula, onde, via plasmodesma, atinge a célula adjacente.

Estudos *in situ* de microscopia eletrônica provaram a formação de túbulos em *Datura stramonium* infectada com “*Euphorbia mosaic virus*” (KIM e LEE, 1992). Em células procambiais de *Cucurbita maxima* infectadas com SqLCV, a proteína BC1 foi observada associada ao retículo endoplasmático, formando túbulos com ~40 nm entre células adjacentes, pelos quais proporcionaria o movimento de BV1-DNA viral (WARD et al., 1997). A

interação de BC1 com o ER obedece a uma regulação determinada pelo desenvolvimento do hospedeiro.

No entanto, estudos *in vivo* de microinjeção em mesofilo de tabaco de BC1 Do “*Bean dwarf mosaic virus*” (BDMV) produzida em bactérias (NOUEIRY et al., 1994) resultaram em conclusões divergentes do papel de BC1 no movimento e na forma do DNA viral movida (ROJAS et al., 1998). Nesses estudos, foi demonstrado que BC1 move DNA viral fita dupla de célula-a-célula e à longa distância, via plasmodesma. Esse modelo é fundamentado na capacidade da proteína BC1 de aumentar o limite de exclusão dos plasmodesmas.

2.5. Geminivírus de tomateiros do Novo Mundo

Até meados da década de 70, foi registrada a ocorrência de apenas três diferentes geminivírus infectando tomateiros nas Américas: o TGMV, no Brasil, o “*Tomato yellow mosaic virus*” (TYMV), na Venezuela, e o “*Chino del tomate virus*” (CdTV), no México. Na década de 80, houve a disseminação de uma nova espécie de mosca-branca (*Bemisia argentifoli*). Esse vetor alternativo de *Begomovirus* tem origem nos países do Mediterrâneo, e acredita-se que sua introdução no Novo Mundo se deve à importação de plantas ornamentais. Esta espécie de mosca-branca é muito bem adaptada à cultura do tomateiro e, por ser mais agressiva que a espécie nativa (*Bemisia tabaci*), propagou-se intensamente no Novo Mundo (POLSTON e ANDERSON, 1997). Atualmente, mais de 20 diferentes espécies de *Begomovirus* infectam tomateiros nas Américas (RIBEIRO, 1999).

No Brasil, os primeiros relatos de ocorrência da *Bemisia argentifoli* surgiram no início da década de 90. Desde então, começaram a aparecer os primeiros relatos da ocorrência de novos *Begomovirus*. Atualmente, os geminivírus estão presentes em muitos estados, como Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Pernambuco, Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo

(GALVÃO et al., 1997; RIBEIRO, 1999), infectando tomateiros e também plantas daninhas.

As técnicas utilizadas para o diagnóstico das plantas infectadas estão bem estabelecidas e são rotina para os laboratórios que trabalham com geminivírus no Brasil. Entretanto, só recentemente características moleculares e filogenéticas desses novos *Begomovirus* têm sido elucidadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e extração de DNA

Tomateiros infectados foram identificados nas regiões de Itaperuna e Betim, nos Estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais, respectivamente. Suas folhas foram coletadas, submetidas ao congelamento em N₂ e conservadas a -80°C até o uso.

O DNA total do material conservado foi extraído por dois métodos. No primeiro, descrito por GILBERTSON et al. (1991), aproximadamente 2 g de tecido foliar infectado foram macerados em N₂ e homogeneizados com 10 mL de tampão (Tris-HCl 10 mmol L⁻¹, pH 7,5, EDTA 10 mmol L⁻¹, SDS 1% p/v, β-mercaptoetanol 0,0007% v/v) até o congelamento da mistura. Após o descongelamento do homogeneizado, este foi incubado a 0 °C por 10 minutos, e os resíduos celulares foram separados por centrifugação a 15.000 g durante 15 minutos. Ao sobrenadante foi adicionada solução de NaCl 5 molL⁻¹ até atingir uma concentração final de 1 molL⁻¹ e a mistura foi incubada por 14 h a 37°C. Após o período de incubação, o resíduo insolúvel foi descartado por centrifugação a 41.000 xg, por uma hora e meia. Os ácidos nucleicos foram extraídos com igual volume de fenol:clorofórmio (1:1), precipitados com NaOAc 0,3 molL⁻¹ e isopropanol 50% (v/v), sedimentados por centrifugação a 16.000 g

durante 15 minutos, lavados com etanol 70%, secos a vácuo e ressuspensos em H₂O.

No segundo método de extração, descrito por FULTON et al. (1995), aproximadamente três folhas jovens de tomateiros infectados, previamente congeladas em N₂ líquido, foram maceradas na presença de sorbitol (0,175 molL⁻¹, Tris-HCl 0,15 molL⁻¹, pH 7,5, EDTA-Na₂ 2,5 mmolL⁻¹, NaCl 1 molL⁻¹, CTAB 1% p/v), sarcosil (1% P/V) e bissulfito de sódio (0,1% p/v). Após incubação a 65°C por uma hora, os ácidos nucleicos foram extraídos com igual volume de clorofórmio álcool isoamílico (24:1), precipitados com isopropanol 58% (v/v) e sedimentados por centrifugação durante 15 minutos a 15.000 xg. O precipitado foi lavado com etanol 70%, seco a vácuo e dissolvido em H₂O.

3.2. Diagnose da infecção viral via PCR

Para confirmar a presença de geminivírus nas amostras de DNA total extraído de plantas sintomáticas, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores degenerados, específicos para o componente A ou B, conforme descrito por ROJAS et al. (1993), e listados no Quadro 1. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador MJ RESEARCH Peltier Thermal Cycler 200, com incubação inicial de 1 min a 94°C, seguido por 30 ciclos consecutivos de 94°C por 45 seg, para desnaturação, de 50°C por 1 min, para anelamento, e extensão por 1h 30 min a 72°C. Após os ciclos, as reações foram submetidas a um período adicional de polimerização de 10 min a 72°C. Cada reação continha 30 a 50 ng de DNA extraído de plantas, uma unidade de Taq polimerase e 40 pmoles dos oligonucleotídeos, em um volume final de 25 µL. A estimativa do tamanho dos produtos de amplificação por eletroforese em géis de agarose 1% p/v, seguida por clonagem e seqüenciamento do produto amplificado, confirmou a diagnose.

Quadro 1 - Oligonucleotídeos degenerados para o componente A ou B

Oligonucleotídeo	Seqüência	Região amplificada
PAL1v1978	5' GCAT <u>CTGCAG</u> GGCCCACTYGTCTTYCCNGT 3'	Parte de CP, a região comum e uma parte de Rep
PAR1c496	5' AATA <u>CTGCAG</u> GGGCTTYCTRTACATRGG 3'	
PCRc1	5' CTAG <u>CTGCAG</u> CATATTTACRARWATGCCA 3'	Parte de MP até o primeiro nucleotídeo da região comum
PBL1v2040	5' GCCT <u>CTGCAG</u> CARTGRGRTCKATCTTCATACA 3'	

* As regiões sublinhadas correspondem ao sítio da endonuclease de restrição *Pst* I.

* Os oligonucleotídeos nas posições degeneradas são representados por uma única letra do código da ambigüidade da IUPAC: R=A, G; W=A, T; K=G, T; Y=C, T; e N=A, C, G, T.

3.3. Clonagem dos fragmentos amplificados

Ambos os pares de oligonucleotídeos descritos no item anterior (Quadro 1) foram utilizados na amplificação de fragmentos para a clonagem, usando-se a enzima *Pfu* polimerase (Amersham Pharmacia Biotech) conforme instruções do fabricante, na presença do DNA total de tomateiros infectados como DNA molde. Os produtos da amplificação foram purificados, utilizando-se o “kit Prep-A-Gene” (BIO RAD), em seguida digeridos com a enzima *Pst*I e novamente purificados com o mesmo *kit*. Os fragmentos de DNA virais foram clonados no sítio *Pst* I do vetor pUC118, previamente digerido e defosforilado. Os clones positivos foram identificados pelo tamanho do inserto. Os clones de 1,1 Kb correspondentes aos fragmentos do componente A foram denominados pUFV 70 (amostra do Rio de Janeiro) e pUFV 68 (amostra de Minas Gerais). Os clones de 0,3 Kb correspondentes aos fragmentos do componente B foram denominados pUFV 82 (amostra do Rio de Janeiro) e pUFV 107 (amostra de Minas Gerais).

3.4. Reações de seqüenciamento

As reações de seqüenciamento foram realizadas em seqüenciador automático Perkin-Elmer, modelo 377, utilizando-se o "Perkin-Elmer ABI-Prism Thermocycle Sequencing Dye Terminator Kit", segundo as instruções do fabricante. Os oligonucleotídeos utilizados anelam em regiões dos vetores que flanqueiam o fragmento clonado.

3.5. Clonagem do genoma viral

3.5.1. Clonagem do componente B a partir de DNA total de tomateiros do Rio de Janeiro

Na clonagem molecular do componente B completo foi utilizada a enzima de restrição *Eco* RI, que possui sítio único na seqüência desse componente. O DNA total de tomateiros infectados foi submetido à digestão com *Eco* RI. A forma replicativa do vírus, DNA fita dupla, foi, portanto, linearizada. O produto da reação foi purificado utilizando-se o "kit Prep-A-Gene" (BIO RAD) e posteriormente submetido a uma reação de ligação com o vetor pUC 118 linearizado no sítio *Eco*RI e devidamente defosforilado.

Os clones cujo inserto possuía aproximadamente 2,6 Kb foram selecionados. A confirmação foi feita por meio de "dot blot". Os DNAs plasmidiais extraídos das colônias selecionadas foram transferidos em solução de SSC 6X sob vácuo parcial para uma membrana de náilon, utilizando-se o aparato "dot blot" (BIO RAD). Após a imobilização com ultravioleta, o DNA, na membrana, foi hibridizado com uma sonda radioativa específica, conforme metodologia descrita por SAMBROOK et al. (1989). Os sinais de hibridização foram revelados por auto-radiografia, conduzida a -80°C, utilizando-se "Lightning-Plus Intensifying Screen" (SIGMA).

A sonda utilizada na hibridização corresponde ao fragmento do clone pUFV 70 de 1,1 Kb anteriormente descrito, que contém a região comum, conservada em ambos os componentes genômicos do mesmo vírus.

Aproximadamente 50 ng do fragmento purificado foram marcados com [³²Pα-] dCTP pela técnica de oligonucleotídeos aleatórios, utilizando-se o “Kit Redprime” (Amersham Pharmacia Biotech).

3.5.2. Amplificação do componente A e sua clonagem parcial

De posse da seqüência obtida a partir do clone pUFV 70, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores específicos para amplificar o componente genômico A em sua extensão total (Quadro 2). A reação de amplificação foi realizada com a enzima *Pfu* polimerase (Amersham Pharmacia Biotech) em reações montadas conforme protocolo sugerido pelo fabricante, a partir do DNA total de tomateiros infectados. As condições otimizadas para a amplificação de um único fragmento de 2,6 Kb foram: incubação inicial de 2 min a 94°C, por 1 min, para desnaturação, de 55°C, por 2 min, para anelamento, e de extensão por 3 min a 72°C. Após os ciclos, as reações foram submetidas a um período adicional de polimerização de 10 min a 72°C. O produto da amplificação foi purificado utilizando-se o ‘kit Prep-A-Gene’ (bio Rad), em seguida digerido com a enzima *ClaI* e novamente purificado com o mesmo *kit*. Os fragmentos virais purificados foram clonados no sítio *ClaI* do vetor pBS II KS⁺, previamente digerido e defosforilado.

A seleção dos clones positivos foi realizada por “dot blot”, conforme descrito no item anterior. Quatro diferentes clones foram selecionados; nenhum deles, entretanto, representava a seqüência do componente A completo. Os clones reconhecidos pela sonda foram denominados pUFV 244 (0,5 Kb), 245 (0,6 Kb), 246 (1,3 Kb) e 247 (0,8 Kb).

Quadro 2 - Oligonucleotídios específicos derivados da seqüência de pUFV 70

Oligonucleotídeo	Seqüência	Fragmento amplificado
F70FCLAF	5' CCCGGAT CGATTT GGAAA ACTCC ATGAC 3'	Fragmento de 2,6 Kb correspondendo ao componente genômico A
R70FCLAR	5' CCCGGAT CGATG GGAAGATCAGCTAGAGGA 3'	

* Em negrito está destacado o sítio da enzima de restrição *Cla*I.

3.6. Caracterização molecular do genoma viral

3.6.1. Seqüenciamento dos clones

Os clones pUFV 68, 82, 107, 244, 245, 246 e 247 foram seqüenciados como descrito no item 3.4. O clone pUFV 248, devido ao seu tamanho, teve seu padrão de restrição determinado com diversas enzimas de restrição, em reações montadas nas condições recomendadas pelo fabricante. Posteriormente, foram clonados seis subclones, que facilitaram o seqüenciamento das fitas senso e anti-senso do componente genômico clonado. Da mesma forma, o clone pUFV 70 foi subclonado em dois fragmentos menores, para facilitar o seqüenciamento. Além da estratégia de subclonagem, o oligonucleotídeo 248F 1400099 (5' GGTTCGGAGGGAGTACAATTGG 3') foi desenhado com base na seqüência de pUFV 248 e utilizado no seqüenciamento.

3.6.2. Obtenção e descrição dos subclones de pUFV 248

Os fragmentos de DNA de pUFV 248, subclonados em pUC 118, estão esquematizados na Figura 7. O fragmento *Bam*HI, de aproximadamente 0,9 Kb, foi isolado do DNA recombinante pUFV 248 e ligado ao vetor pUC 118, previamente digerido com *Bam*HI e defosforilado, resultando no subclone

pUFV 266. O subclone pUFV 267 foi obtido por meio da liberação do fragmento *Bam*HI de pUFV 248 e recircularização *in vitro*, resultando em um clone de 1,8 Kb. Os clones pUFV 277 (584 pb), 278 (658 pb), 279 (522 pb) e 280 (212 pb) são fragmentos *Sau*3AI do inserto do clone pUFV 248, clonados no sítio *Bam*HI do pUC 118.

3.7. Análise das seqüências

Para manipulação e análise das seqüências, foram utilizados os programas “BLAST” (GenomeNetWWWServer – www.genome.ad.jp), CAP “Assembly Machine” (<http://gcg.tigem.it/ASSEMBLY/assemble.html>) e “Sequence Manipulation Tools” (www.sdsc.edu/ResTools). A determinação da similaridade entre pares de seqüências foi feita utilizando-se o programa “Bestfit”, disponível no provedor do Centro Nacional de Recursos Genéticos - CENARGEN (asparagin.cenargen.embrapa).

As seqüências utilizadas nas comparações e análises filogenéticas foram acessadas no “GeneBank” pelo programa “DBGET” (GenomeNetWWWServer) (Quadro 3) e alinhadas pelo algoritmo “Clustal” no programa “MegaAlign” (“DNASStar”). Neste programa, foram produzidas as árvores filogenéticas.

Quadro 3 – Vírus utilizados nas comparações e análises filogenéticas

Nome do vírus e abreviação	Acesso no GenBank	Referência
<i>Mastrevirus</i>		
Transmitidos por cigarrinha, infectam monocotiledôneas		
<i>Digitaria streak virus</i> , DSV	M23022	DONSON et al. (1987)
<i>Maize streak virus</i> , MSV	X01089	HOWELL (1984)
<i>Wheat dwarf virus</i> , WDV	X02869	MACDOWELL et al.(1985)
Transmitidos por cigarrinha, infectam dicotiledôneas		
<i>Tobaccoyellow dwarf virus</i> , TYDV	M81103	MORRIS et al. (1992)
<i>Bean yellow dwarf virus</i> , BeYDV	Y11023	LIU et al. (1997b)
<i>Curtovirus</i>		
Transmitidos por cigarrinha, infectam dicotiledôneas		
<i>Beet curl top virus</i> , BCTV	X04144	STANLEY et al. (1986)
<i>Horseradish curl top virus</i> , HrCTV	U49907	KLUTE et al. (1996)
<i>Topocuvirus</i>		
Transmitido por “Treehopper”, infectam dicotiledoneas		
<i>Tomato pseudo-curl top virus</i> , TPCTV	X84735	BRIDDON et al. (1996)
<i>Begomovirus</i>		
Transmitidos por mosca-branca, infectam dicotiledôneas no Novo Mundo		
<i>Bean golden mosaic virus</i> , BGMV	M88686	GILBERTSON et al. (1991)
<i>Squash leaf curl virus</i> , SqLCV	M38183	LAZAROWITZ e LAZDINS (1991)
<i>Potato yellow mosaic virus</i> , PYMV	D00941	COUTTS et al. (1991)
<i>Tomato golden mosaic virus</i> , TGMV	K02029	HAMILTON et al. (1984)
<i>Tomato leaf curl virus</i> , TLCV	Y15033	ENGEL et al. (1988)
<i>Tomato mottle virus</i> , ToMoV	L14461	ABOUZID et al. (1992)
<i>Tomato leaf cruple virus</i> , TLCrV	AF101478	JIANG et al. (1998)
<i>Sida golden mosaic virus</i> , SiGMCV	X99550	HOFER et al. (1997)
Transmitidos por mosca-branca, infectam dicotiledôneas no Velho Mundo		
<i>African cassava mosaic virus</i> , ACMV	J02057	STANLEY e GAY (1983)
<i>India cassava mosaic virus</i> , ICMV	Z24759	HONG et al. (1993)
<i>Tomato Yellow Leaf curl virus</i> , TYLCV-Si	Z28390	CRESPI et al. (1995)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação de dois novos *Begomovirus* que infectam tomateiros

4.1.1. Diagnóstico molecular dos tomateiros infectados

Em razão da crescente incidência de *Begomovirus* bipartidos, métodos eficientes de detecção e identificação de novos isolados têm sido desenvolvidos. Com base no alinhamento de seqüências completas de alguns *Begomovirus* bissegmentados, ROJAS et al. (1993) desenharam oligonucleotídeos capazes de amplificar fragmentos de tamanhos específicos em diversas amostras de DNA de plantas infectadas por diferentes geminivírus. Esses oligonucleotídeos são complementares a regiões conservadas de ambos os componentes genômicos, sendo, portanto, ferramenta de grande utilidade na diagnose molecular e identificação de novos *Begomovirus*.

O DNA total extraído de tomateiros infectados, provenientes das regiões de Itaperuna-RJ, Figura 2(A), e Betim-MG, Figura 2(B), foi utilizado como molde em ensaios independentes de PCR, visando ao diagnóstico molecular da virose. Os oligonucleotídeos degenerados para o componente A (Quadro 1) amplificaram fragmentos a partir de ambas as amostras de DNA total dos tomateiros (reações 1), cujos tamanhos (1,1 Kb) foram similares àquele

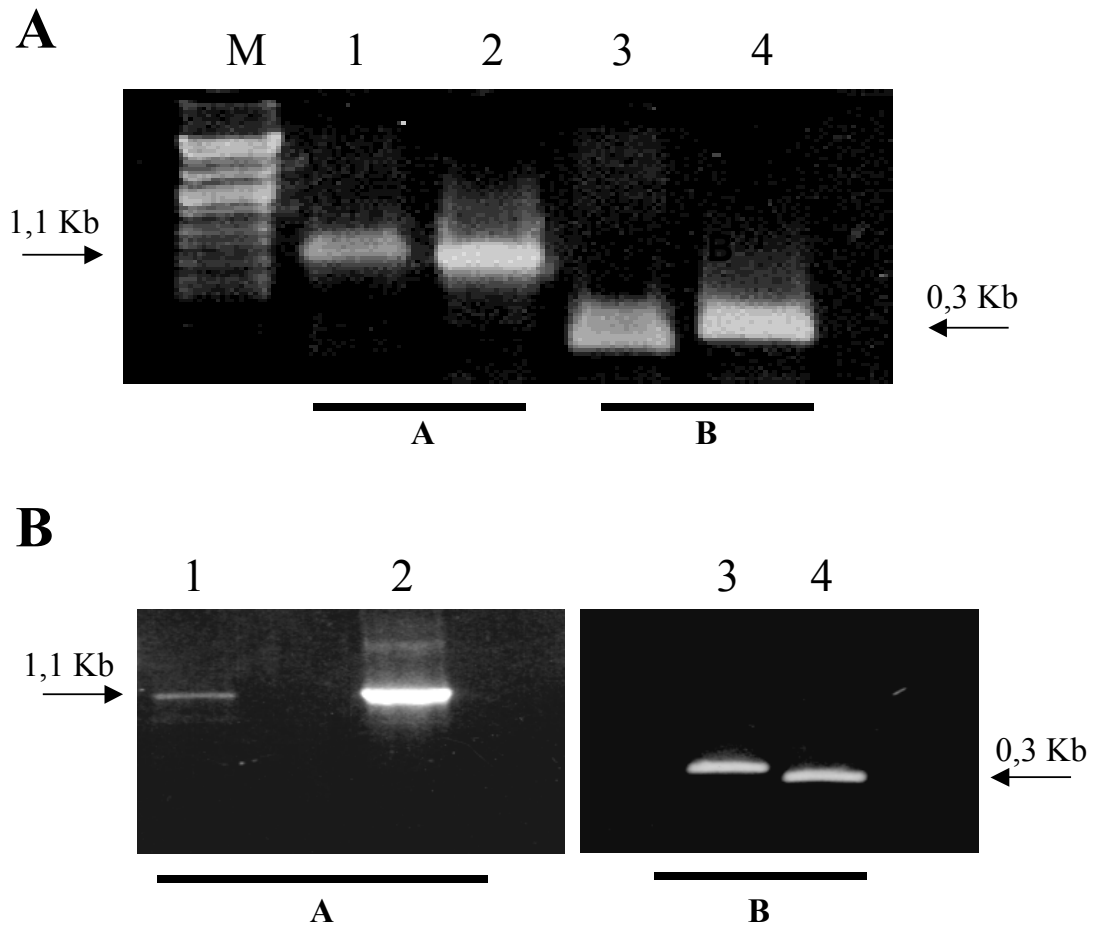


Figura 2 - Detecção molecular de *Begomovirus* em tomateiros infectados. O DNA total extraído de tomateiros infectados das regiões de Itaperuna-RJ (A) ou Betim-MG (B) foi utilizado como molde em ensaios de PCR com oligonucleotídeos degenerados, específicos para os componentes genômicos **A** e **B**, conforme indicado na figura. O DNA total de tomateiros foi utilizado como molde nas reações 1 e 3, enquanto nas reações 2 e 4 foram utilizados os DNAs plasmidiais dos clones pTG1.3A e pTG1.4B, respectivamente. O tamanho aproximado dos produtos amplificados está indicado. M indica a mobilidade eletroforética de fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos utilizados como padrões de comparação.

amplificado a partir do DNA controle pTG1.3A (reações 2), indicando a presença de geminivírus nas amostras. Da mesma forma, os oligonucleotídeos específicos para o componente B (reações 3 e 4) amplificaram fragmentos de tamanhos similares tanto a partir do DNA total de tomateiros (reações 3) quanto a partir do DNA controle pTG1.4B (reações 4). Entretanto, os fragmentos amplificados do componente B a partir das amostras de DNA de tomateiros (reações 3) apresentaram migração eletroforética ligeiramente diferente do resultado da amplificação do controle pTG1.4B (comparar reações 3 e 4). Esses resultados, além de indicarem que os vírus dos tomateiros dos Estados do Rio de Janeiro e de Minas Gerais são bissegmentados, sugerem a existência de diversidade ou variabilidade genética entre os geminivírus detectados que infectam tomateiros.

4.1.2. Clonagem dos fragmentos amplificados e identificação de dois novos *Begomovirus*

Tem sido crescente a utilização de dados de seqüências na caracterização e taxonomia de vírus de plantas. Dentre os geminivírus, a análise comparativa de seqüências tem estabelecido critérios taxonômicos amplamente utilizados para discriminação de novos isolados em espécies ou estirpes (RYBICKI, 1994). Particularmente para os *Begomovirus*, tem sido proposto que 90% de identidade de seqüência corresponde ao limite de distinção entre as espécies, e similaridade acima desse valor caracteriza o isolado em questão como estirpe da espécie relacionada. Além da proposição desse critério, PADIDAM et al. (1995) demonstraram que a região 5' do gene da proteína do capsídeo, que codifica uma extensão de 70 aminoácidos no aminoterminal, é extremamente representativa do genoma completo, sendo suficiente para determinar a posição taxonômica de um dado isolado de geminivírus.

Assim, com a finalidade de obter dados de seqüência parcial dos isolados, os fragmentos amplificados (Figura 2) foram clonados no sítio *Pst* I do vetor pUC118. Os clones denominados pUFV82 (isolado do RJ) e pUFV107 (isolado de MG) contêm parte do componente B, mais

especificamente a região 5' do gene da proteína de movimento, BC1. Os clones denominados pUFV68 (isolado de MG) e pUFV70 (isolado do RJ) correspondem a uma região do componente A, contendo a extremidade 5' do gene da proteína Rep, a região comum, e a extremidade 5' do gene da proteína capsidial.

A clonagem parcial do componente A dos geminivírus aqui analisados permitiu a identificação da seqüência de nucleotídeos que codifica uma extensão de 48-50 aminoácidos na região aminoterminal da proteína do capsídeo. Esta seqüência deduzida de aminoácidos dos isolados em estudo foi comparada com a mesma região da proteína do capsídeo de outros vírus, selecionados de forma que se tivesse uma amostra representativa dos diversos grupos de geminivírus (Figura 3).

As porcentagens de similaridade obtidas entre os isolados do Rio de Janeiro e de Minas Gerais e os demais geminivírus indicam que eles são diferentes entre si e entre os geminivírus comparados. A maior identidade de seqüência alcançada foi de 85,41%, entre o isolado do Rio de Janeiro e ToMoV, e de 82,22%, entre o isolado de Minas e BGMV. Ambos são *Begomovirus* de dois componentes genômicos, transmitidos por mosca-branca e de ocorrência nas Américas. A similaridade de seqüência com as espécies dos demais gêneros foi em geral, menor. De fato, a análise filogenética baseada na seqüência do N-terminal da proteína do capsídeo posicionou os novos isolados junto aos *Begomovirus* (Figura 4). Esses resultados indicam que estes isolados são novas espécies de *Begomovirus*.

Uma vez que o fragmento do componente A amplificado codifica apenas 48-50 aminoácidos no N-terminal da proteína do capsídeo, a análise filogenética também foi conduzida com a seqüência da região comum (Figura 5). O resultado filogenético sustenta a hipótese de que tanto o vírus detectado em Minas Gerais quanto o detectado no Rio de Janeiro são novas espécies de *Begomovirus*. Estudos subseqüentes e complementares de caracterização molecular foram conduzidos com o isolado do Rio de Janeiro, aqui designado TYhMV (*Tomato yellowish mosaic virus*).

	Isolado RJ	Isolado MG
Isolado RJ	-	82,22
Isolado MG	82,22	-
<i>Mastrevirus</i>	WDV	66,66
	MSV	41,66
	DSV	26,92
	TYDV	75,00
	BeYDV	38,46
	BCTV	35,89
<i>Curtovirus</i>	HrCTV	40,00
	TPCTV	42,85
<i>Topocuvirus</i>	TYLCV	54,54
	BDMV	81,25
<i>Begomovirus</i>	SqLCV	83,33
	ToMoV	85,41
	SiGMV	77,08
	TGMV	79,54
	BGMV	85,41

Figura 3 - Porcentagem de similaridade da região amino da proteína da capa dos isolados do Rio de Janeiro e de Minas Gerais com a de outros geminivírus. Quarenta e oito aminoácidos da proteína capsidial do isolado RJ e 45 do isolado de MG foram comparados aos 50 primeiros aminoácidos de diversos geminivírus já caracterizados (o gênero ao qual os geminivírus comparados pertencem está indicado ao lado).

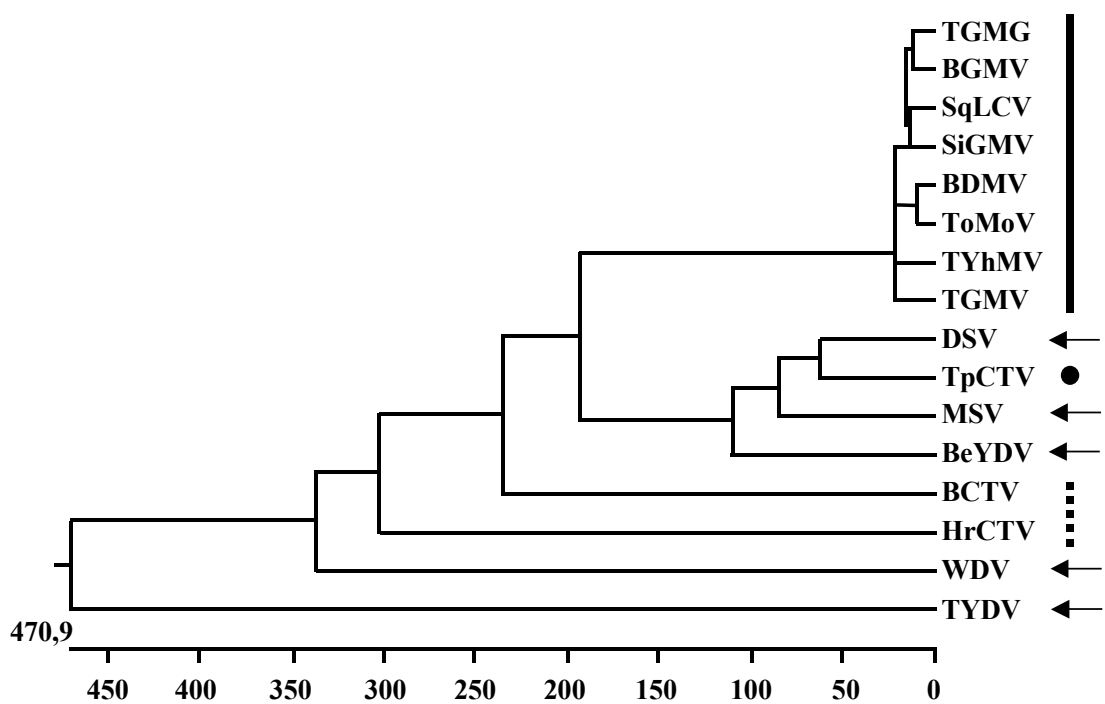


Figura 4 - Árvore filogenética baseada na seqüência dos primeiros 50 aminoácidos deduzida para a proteína capsidial de diversos *Begomovirus*. As barras pretas destacam os *Begomovirus*; a barra pontilhada, os *Curtovirus*; as setas os *Mastrevirus*; e o círculo fechado, o *Topocuvirus*. O isolado do Rio de Janeiro está identificado como TYhMV, e o isolado de Minas Gerais, como TGMG.

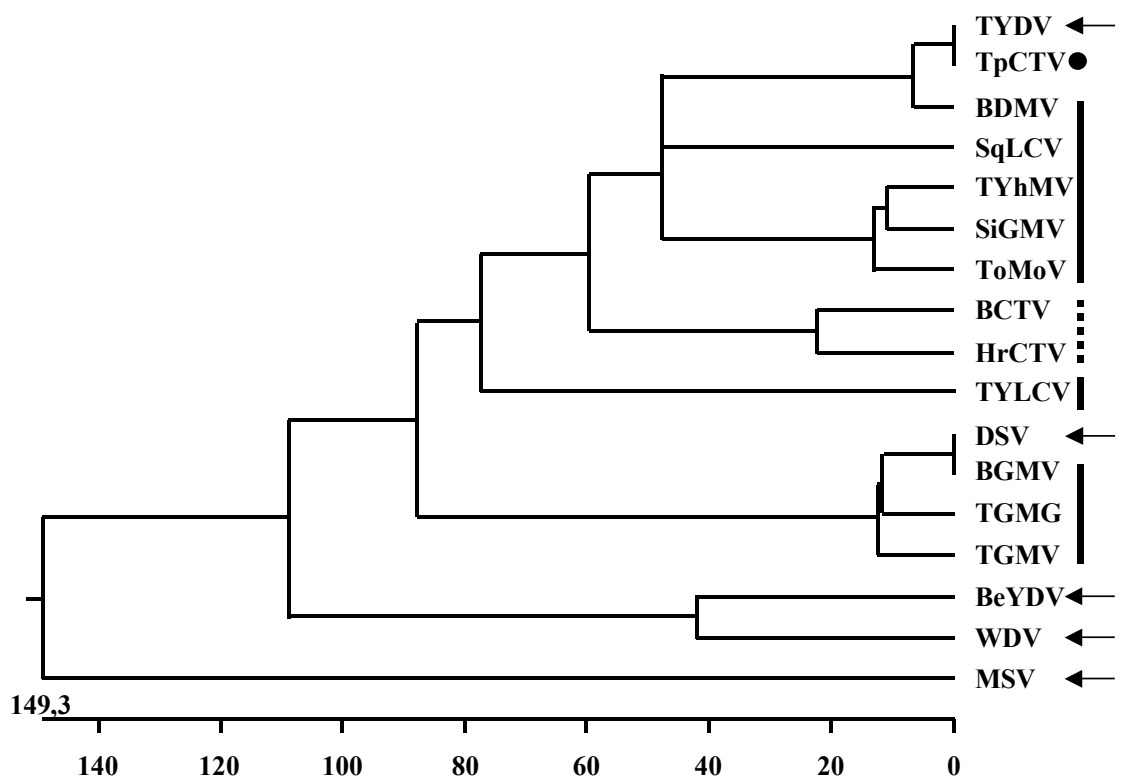


Figura 5 - Árvore filogenética baseada na seqüência de nucleotídeos da região comum ou intergênica de diversos geminivírus. As barras pretas destacam os *Begomovirus*; a barra pontilhada, os *Curtovirus*; as setas, os *Mastrevirus*; e o círculo fechado, o *Topocuvirus*. O isolado do Rio de Janeiro está identificado como TYhMV, e o isolado de Minas Gerais, como TGMG.

4.2. Clonagem e caracterização molecular do TYhMV

4.2.1. Clonagem do componente B do TYhMV

A partir do DNA total extraído de tomateiros infectados, procedentes do Rio de Janeiro, foi obtido o clone do componente B em sua completa extensão. O DNA total foi digerido com a enzima *EcoR* I, bem como o vetor de clonagem pUC118. A reação de ligação, portanto, continha o DNA genômico do tomateiro fragmentado, o componente B linear e o vetor compatível. Apesar da alta frequência de recombinação entre o vetor e os fragmentos *Eco* RI gerados na digestão (dado não-mostrado), a clonagem do componente genômico viral foi um evento raro.

Um clone com o tamanho específico de 2,6 Kb foi selecionado e denominado pUFV248. A confirmação da identidade do clone foi feita por “dot blot”, usando-se como sonda o inserto do clone pUFV 70, que abrange a região comum, idêntica em ambos os componentes virais (Figura 6). Essa característica faz com que esta sonda seja capaz de reconhecer ambos os componentes virais e, portanto, representa importante ferramenta na identificação de clones positivos.

A sonda derivada do clone pUFV70 reconheceu o DNA plasmidial do clone de tamanho específico pUFV 248 (coluna A1), assim como os controles positivos pTG1.3A (coluna C1) e pUFV 70 (coluna C4). A ausência de interação da sonda com DNA do vetor pUC 118 e pTG1.4B (colunas C2 e C3) demonstrou a especificidade da hibridização. Uma vez que a sonda contém seqüências da região comum, a identidade do clone pUFV248 foi determinada por seqüenciamento.

4.2.2. Caracterização molecular do componente B do TYhMV

O DNA plasmidial do clone pUFV248 foi digerido com diversas endonucleases, e o padrão de restrição foi determinado. Dois fragmentos

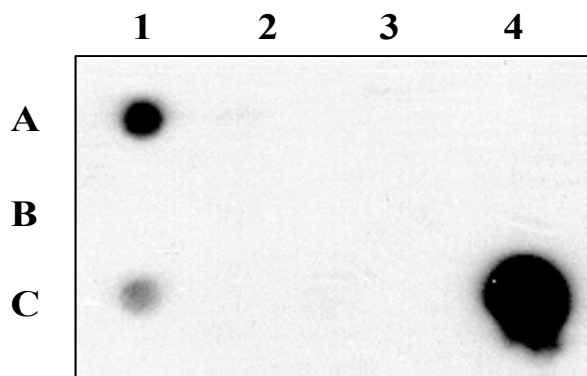


Figura 6 - “Dot blot” para a confirmação da clonagem molecular de um componente genômico de TYhMV. O DNA plasmidial de oito transformantes (A 1-4 e B 1-4) foi imobilizado em uma membrana de náilon e hibridizado a 55°C com a sonda derivada do clone pUFV 70. A amostra de DNA plasmidial A1 reconhecida pela sonda, corresponde ao clone pUFV 248. Na linha C foram aplicados os DNAs plasmidiais dos controles da hibridização: pTG1.3A (C1), pTG1.4B (C2), pUC 118 (C3) e pUFV 70 (C4).

EcoR I – *Bam*HI e mais quatro fragmentos *Sau*3AI, clonados conforme descrito no item 3.6.2., estão indicados na Figura 7.

Todos os fragmentos foram seqüenciados; as setas pretas na Figura 7 indicam o sentido da amplificação nas reações de seqüenciamento e a seta vermelha indica a posição de anelamento do oligonucleotídeo desenhado para auxiliar no seqüenciamento. A estratégia de seqüenciamento utilizada foi eficiente e a seqüência completa do clone pUFV248 foi determinada. A Figura 8 mostra a seqüência de 2.590 pb do componente B do TYhMV.

A análise da seqüência completa revelou que pUFV248 corresponde ao componente B do novo geminivírus, TYhMV, apresentando organização gênica idêntica àquela observada nos *Begomovirus* bipartidos. A ORF BV1 foi identificada no quadro de leitura +3 da fita do vírion, cuja seqüência deduzida de aminoácidos possui 255 resíduos, e a ORF BC1, no quadro de leitura –2 da fita complementar, com 294 resíduos. Além disso, a região intergênica, denominada

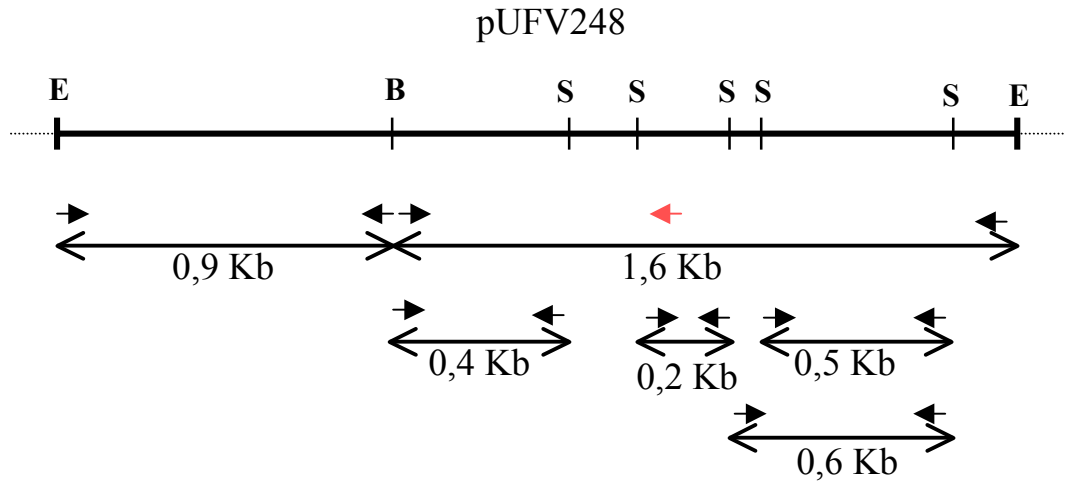


Figura 7 - Padrão de restrição e subclones de pUFV248. Como estratégia de seqüenciamento, diversos fragmentos de pUFV248 foram subclonados. As letras **B**, **E**, e **S** indicam, respectivamente, os sítios de restrição das enzimas *Bam* HI, *Eco* RI e *Sal* 3AI que foram utilizados na obtenção dos subclones (setas bidirecionais), cujos tamanhos estão indicados abaixo. As setas pretas indicam o sentido da extensão nas reações de seqüenciamento. A seta cinza indica a posição de anelamento do oligonucleotídeo desenhado para auxiliar no seqüenciamento. As linhas pontilhadas representam parte da seqüência do vetor de clonagem.

região comum, que exerce funções regulatórias na expressão e replicação do genoma viral, foi identificada (Figura 9).

Na região comum, estão localizados os principais *cis* elementos relacionados à replicação e ao controle da transcrição de genes virais (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999). A origem de replicação mínima compreende o sítio de ligação de Rep e a estrutura em forma de grampo que contém em sua alça o nonanucleotídeo (TAATATT/AC) conservado em todos os geminivírus, Figura 10 (A e B). Além dos elementos relacionados com a replicação, um TATA *box* foi identificado na seqüência da RC do componente B de TYhMV. A Figura 10(B) mostra a seqüência da origem de replicação do componente B do TYhMV, destacando os potenciais *cis* elementos funcionais localizados por comparação de seqüência, Figura 10A.

```

>Componente B de TYhMV
1      ACCGGATGGC CGCGCCGATC CCCCCCCCCT CCCGCAATCC CTGGCGCTCC
51     ACGTTTCCCC TTGAATTTAG TTTAGCGAGA ATTTGAGTTC CGCCAAATGA
101    GTTGAGCGCA TTTTTTGGAGT TCCGCTCACC GATAAGCGCC ACGTGCATCA
151    ATCTAAGACC GTTGAAAAAA ATATGATAAG CGGAACCTTA CGGAATTCG
201    TGGTGTGTTT TAGACCATTG AATAACTTTA AAATTCGACC ATTAGATTGC
251    ACATGAGATT TGAATTATTG TTATTTGTGC CGGAATAATT GATGATATGT
301    ATAACCTTTT CATGTGTGCA ATCGTACATC CGCGGTTACG TGGACCAATT
351    GAATTTGAAC TATATAATCA AAATAACGCA TACATGCAAC AACACTTGTC
401    TATATAAGGT GTTTGTAAAA AAATTTGAAA ACACGTCCAA CTACAAAATT
451    TGAACATGTA TTTTTTTAAA AATAAGCGTG GTTGGTCGTC CAGTTCTCGA
501    CGTAATTACG CACGATATGG TACGTTTAAA AGGTGCTATG GTTTGTTACG
551    TAATGATGGG AACCGTCGAT TGGGTTATTC AAACAAGGCC AAGGTAAGATA
601    ACAAGATGAC GTCGCATCGG ATCCATGAAA ACCAATATGG GCCTGAATTT
651    GTATTGGGCC ATAACACAGC AATATCCACA TTTATTACGT ATCCCAGTCT
701    TGGTAAGACG GAGCCAAGTC GTACCAGGTC ATTCATTAAG TTTAAAACGAC
751    TGCGTTTAAA AACGACGGTA AAAATTGAAC GTGTTCCAC CATGTTAAT
801    ATGAACGGGT TACCCTACTAA GATTGATGGA GTTTTTTCTC TGGTAATCGT
851    CGTTGACCGA AAACCTCATT TAAGTCCCTC TGGAAGTTTA TTTACTTTCG
901    ATGAGTTGTT TGGTGCTAGA ATCCACAGTC ATGGAAATCT GGCATAACT
951    CTTGTTCTTA AGGACCGTTT CTACATACGC CATGTTGTGA AAGTGTTTT
1001   GTCTGTGGAG AAGGACACGA CTATGGTTGA TCTTGAAGGG ACGACTAATT
1051   TATCTAGCAG GCGTTATAAT TGTGCGGCAA ATTTTAGAGA CCTTGATCGA
1101   ACATGTAATG GTGTATATGC TAACATCAGC AAGAACTCCA TTTTAGTTTA
1151   TTATTGTTGG ATGTCGGATG CTGTTTCCAA GGCATCTACA TTTGTATCAT
1201   TTGACCTTGA TTATTTTGGG TAAATATAAA GATCAATTTG CAAATTAATA
1251   TTGTACAAC TAAATTCGAT AATAAAATGC ATATTAAC TGTAATGTC
1301   CAGAAAATCA TAATTTATTT CAAAGACTTT GGTTCGGAGG GAGTACAATT
1351   GGTATTAATA CATCCCTGGA CTGTTGATCT AACTATGTCA TTTCAACTGGG
1401   CTAACGATAA CGTTATGTTG GACTGTGTCC TCTGTGCTGC AACGATCGAT
1451   GCTGATTCAC CNGGGTCAAG AATGTTGTC CCCAATCTGT TTAGGCTCTCT
1501   ATATGGATCT AGTTGATCGT TGCCCCGTTT AGAGTCCCA CATGAATTGC
1551   TGAGACCAAT TGTACTTCTT GAAGCCCATG ACTCTCCGGG TTTAATTTCT
1601   ATTGGGCCGT TTAGTCCAAA CCTGGTTGTT GACGCGCATC GGACTAATTT
1651   CCGCTCCCAT GTCCCGTAAC CAACATGGGC GAAATCAATA TCCTTATCTG
1701   AGAACTGCTT CGATAAGATT TTAAGTGTG GTGCCCGGAA AGGAATATCT
1751   ACGGAGTGT TACTGTGGA TAGTTTAAAC TTGCCCTTGA ACTTGGCGGAA
1801   ATGTGTTCTT TGGTGAACAT TTGTATCGCT ACCCCTGTAG TATAATTTCC
1851   ATGGAATAGG GTCCTTAAGC GAGAAGAAAG ACGATGAGAA ATAATGTAAA
1901   TCTATGTTAC ATCTAATTGG GAATGTCCAT GAGGCCTGTA ATGACTCGTT
1951   GTCCGTCATT CTCTGTTCAT GAATTTCTAC TATGACGGAC CCATTGCGGT
2001   TTATTGGAAC CTGCTGCCTG TATTCAATGA CGCAATGATC GATTTTCATA
2051   CAGCTACGAC TGAGTTTAGC ACTAATTTGA GACGCCGTAG AGGGAAATTG
2101   CAGAACAATT TCAGTCAGAT CATGAGACAG TTGATATTCA TCACGCTGTG
2151   ACTCTACATA ATTAAGGCA TTAGGAGGAA TCACCTAAGT AAGAACTATT
2201   ATAAATTTGA AAAGGCCGCG CAGCGCAACC GACAACTGAA AATGAATAAG
2251   CGAAAACGAT ATACACACTT CAACTAAGA ATTCGGCAGA TAATATGTGA
2301   AGGGACATAT GTGTTAATA ATGAAGTTGA ATAAGTACTT TGTAGCGATG
2351   GGTAATTGTA ACTGGGTTGT ATTTATAGAC AAATGTTGTT ATGAAGTTG
2401   TAATATGAAA CGCTGATATA AAAGTCGTTT TATACGGGGA GTGGCATTCT
2451   TGTAATAAAA GGGGTGTAC CAATGGGGT CTGCTCAA CTCCGCTAGT
2501   CAATGGTGA CTGGTGACA ATATATAGTA GAAGCCTCTA TAGAACTCTC
2551   AATCTCGTTC GAACACGTGG GCGCCATCC GTATAATATT

```

Figura 8 - Sequência completa de nucleotídeos do componente B do TYhMV. O nucleotídeo 1 corresponde ao primeiro nucleotídeo após o sítio de clivagem da origem de replicação. O nonanucleotídeo destacado em vermelho corresponde ao sítio de clivagem de Rep, conservada em todos os geminivírus. Em negrito sublinhado estão representados os mesmos sítios de restrição indicados na Figura 7: *EcoRI* (**GAATTC**), *BamHI* (**GGATCC**) e *Sau3AI* (**GATC**).

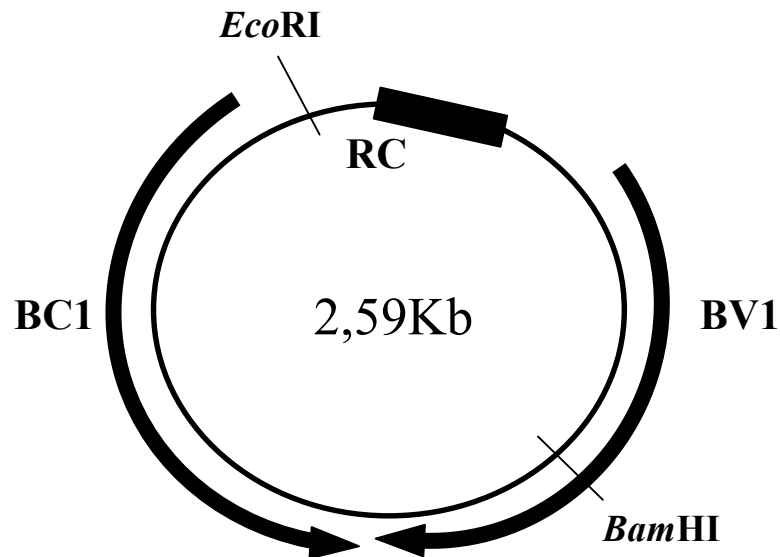


Figura 9 - Organização gênica do componente B do TYhMV. O esquema mostra o componente genômico circular, no qual está destacada a região comum (retângulo preto). As setas indicam as ORFs que codificam para as proteínas BV1 e BC1. O sítio de clonagem *EcoRI* de pUFV248 está indicado, bem como o sítio *BamHI* utilizado na subclonagem.

4.2.3. Filogenia do componente B de TYhMV

Com a finalidade de propor um posicionamento adequado do TYhMV dentro da família *Geminiviridae*, a seqüência completa do seu componente B foi alinhada com a de outros geminivírus bipartidos. Foi selecionado um grupo representativo de geminivírus bipartidos, com membros de ocorrência no Novo e Velho Mundo. Da mesma forma, as seqüências deduzidas de aminoácidos das proteínas virais BV1 e BC1 foram analisadas filogeneticamente. Os alinhamentos foram feitos pelo método “Clustal” no programa “MegAlign”, e as seqüências utilizadas nas comparações foram adquiridas junto ao “GenBank”.

O alinhamento da seqüência completa do componente B, representado em formato de árvore filogenética (Figura 11), mostrou que o TYhMV está

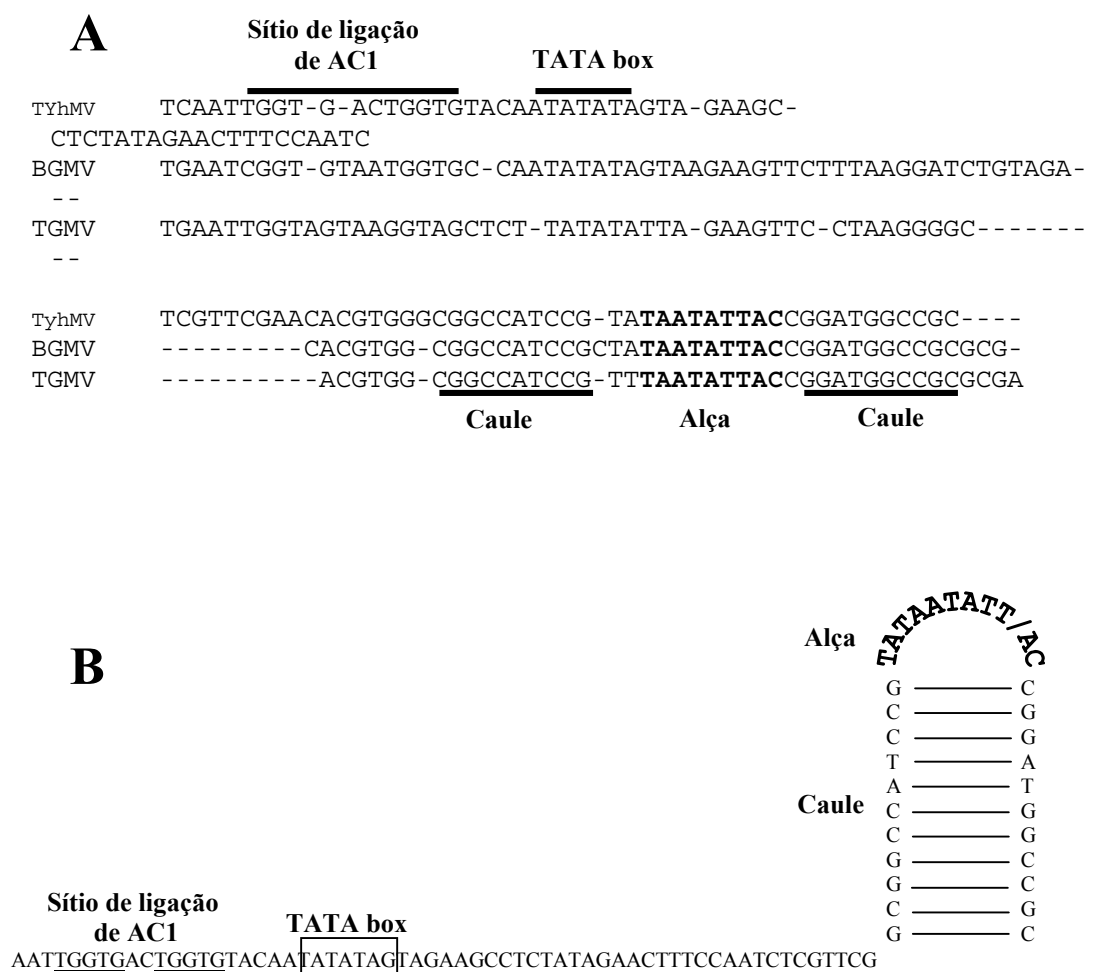


Figura 10 - Seqüência da origem de replicação do componente B de TYhMV e seus potenciais *cis* elementos. (A) Comparação da seqüência da região comum do TYhMV alinhada à mesma região dos *Begomovirus* TGMV e BGMV. (B) Seqüência da região comum de TYhMV, com destaque para os potenciais domínios funcionais.

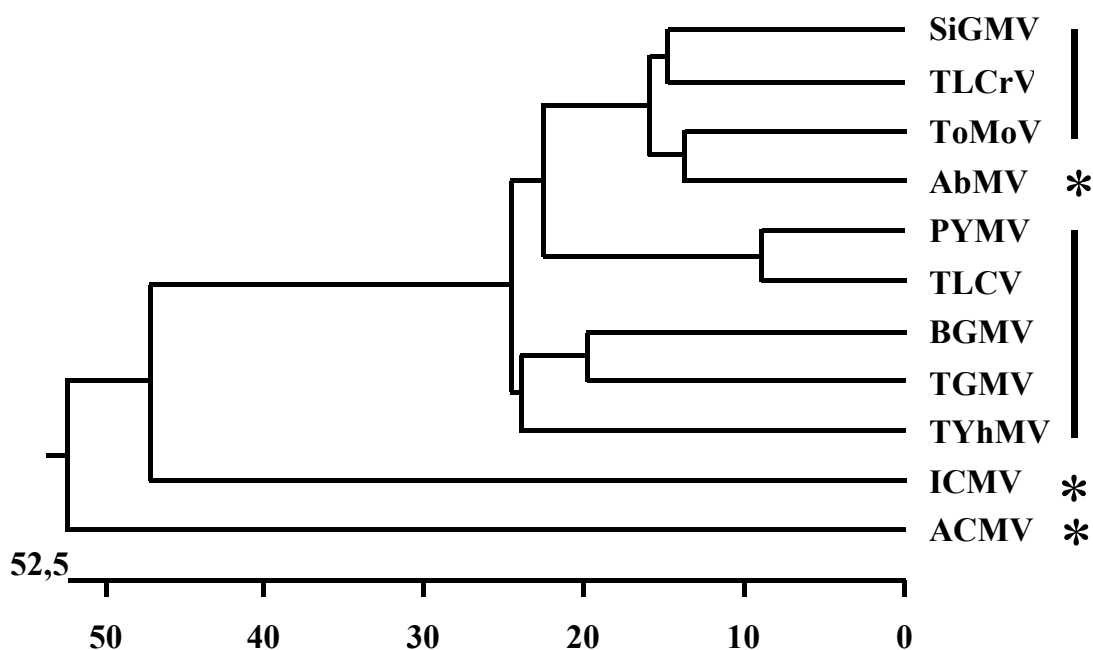


Figura 11 - Árvore filogenética baseada na seqüência completa de nucleotídeos do componente B de diversos *Begomovirus*. As barras pretas destacam os isolados do Novo Mundo, e os asteriscos, os isolados do Velho Mundo.

agrupado junto aos *Begomovirus* do novo mundo, exceto o AbMV, que, embora tenha sido isolado na Índia, está agrupado com os *Begomovirus* do Novo Mundo. Mais especificamente, o TYhMV apresenta estreito relacionamento com os geminivírus BGMV e TGMV. Ambos os vírus foram identificados no Brasil, o que provavelmente justifica a similaridade entre eles e a nova espécie.

A árvore filogenética baseada no alinhamento da seqüência de aminoácidos deduzida da ORF BV1 dos mesmos vírus utilizados na figura anterior foi muito similar ao resultado do alinhamento das seqüências completas (Figura 12). O TYhMV está agrupado com os geminivírus brasileiros BGMV e TGMV. Entretanto, para a seqüência de aminoácidos de BV1, o TYhMV apresenta relacionamento mais estreito com o TGMV do que com o BGMV.

A árvore filogenética baseada no alinhamento da seqüência de aminoácidos deduzida da ORF BC1 apresentou um padrão ligeiramente diferente

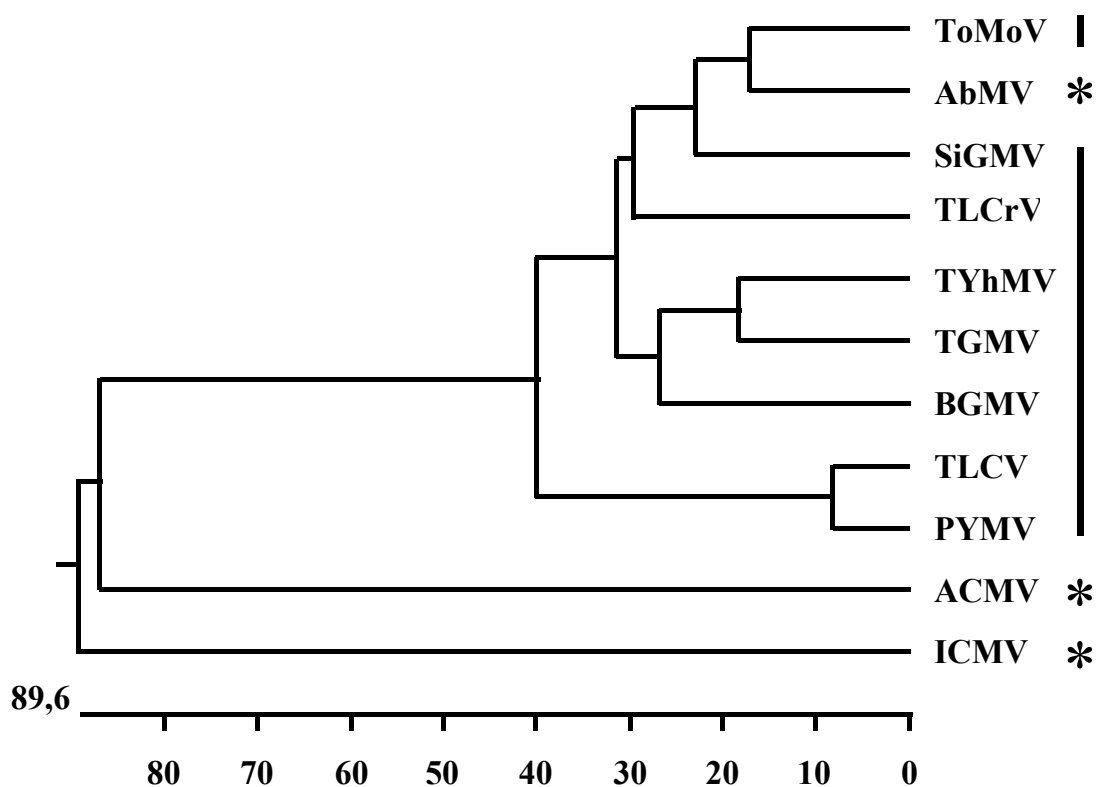


Figura 12 - Árvore filogenética baseada na seqüência de aminoácidos deduzida para a proteína BV1 do componente B de diversos *Begomovirus*. As barras pretas destacam os isolados do Novo Mundo, e os asteriscos, os isolados do Velho Mundo.

do das demais árvores (Figura 13). Nesta árvore, embora os vírus do Novo e Velho Mundo também estejam agrupados, o agrupamento entre os vírus do Novo Mundo é menos definido. Quanto ao TYhMV, o vírus não só se encontra desagrupado do TGMV e do BGMV, como também se apresenta como um ramo divergente dentre os demais vírus do Novo Mundo.

4.2.4. Clonagem do componente A de TYhMV

A estratégia empregada na clonagem do componente A de TYhMV baseou-se na amplificação do componente genômico viral por PCR (PATEL et

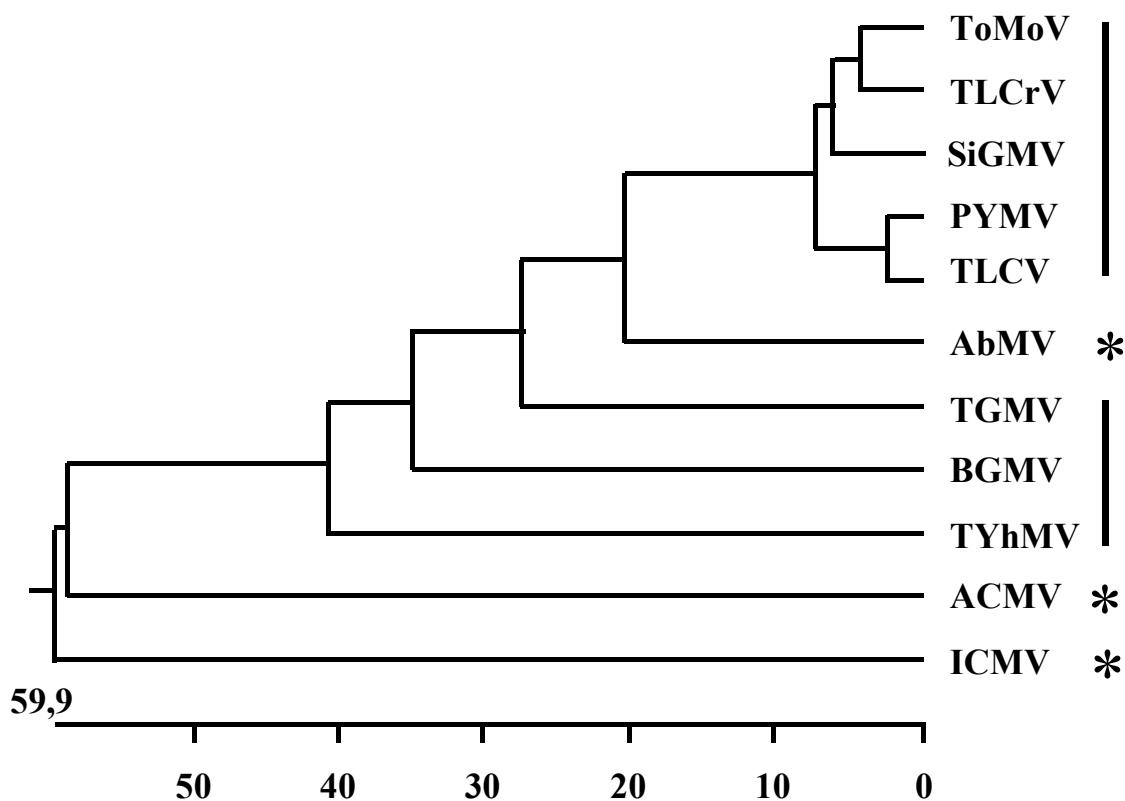


Figura 13 - Árvore filogenética baseada na seqüência de aminoácidos deduzida para a proteína BC1 do componente B de diversos *Begomovirus*. As barras pretas destacam os isolados do Novo Mundo, e os asteriscos, os isolados do Velho Mundo.

al., 1993). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação possuem seqüências sobrepostas que abrangem um sítio de restrição, previamente identificado, com base na seqüência do clone pUFV70. As seqüências que flanqueiam o sítio *Cla* I foram utilizadas para desenhar os oligonucleotídeos específicos F70FCLAF e R70FCLAR (Quadro 2).

Utilizando o DNA total de tomateiros infectados como molde, os oligonucleotídeos específicos amplificaram uma única banda com o tamanho específico de aproximadamente 2,6 Kb (Figura 14), correspondendo provavelmente ao componente A do TYhMV. Esse resultado demonstra a eficiência dos oligonucleotídeos desenhados.

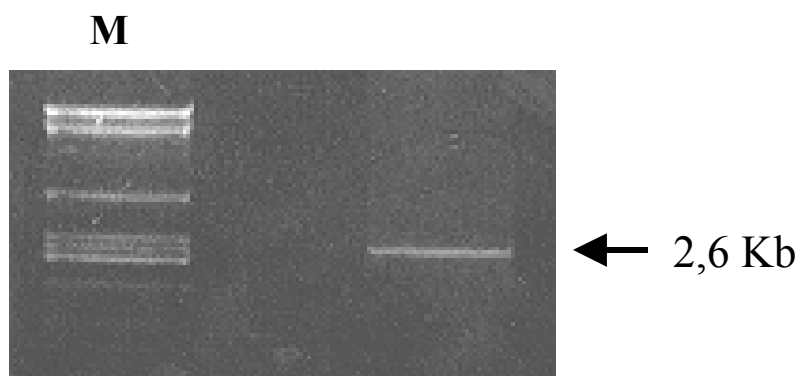


Figura 14 - Amplificação do componente A do TYhMV. O DNA total de tomateiros infectados foi amplificado com os oligonucleotídeos F70FCLAF e R70FCLAR (Quadro 3). O tamanho do fragmento amplificado é indicado à direita da figura. M indica a mobilidade eletroforética de fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos, utilizados como padrões de comparação.

Como resultado do procedimento padrão de clonagem molecular do componente A amplificado, foram isolados quatro colônias transformantes com inserto clonado no sítio *Cla* I de pBSIISK+. A seleção dos clones positivos foi baseada na hibridização do DNA plasmidial recombinante dos transformantes com uma sonda derivada do clone pUFV70 (Figura 15). Quatro clones (A9, A10, B1 e B3) foram reconhecidos pela sonda e denominados pUFV244, pUFV245, pUFV246 e pUFV247, respectivamente. Entretanto, os clones selecionados diferiram entre si quanto à intensidade do sinal de hibridização, sugerindo que contêm insertos distintos. De fato, os quatro clones possuem insertos de diferentes tamanhos, e nenhum deles apresentou em digestões preliminares, um inserto com o tamanho específico de 2,6 Kb, como era esperado para o componente A (dado não-mostrado).

Apesar do êxito dos oligonucleotídeos desenhados em amplificar o componente A, a técnica utilizada para clonagem do componente genômico viral completo parece não ter sido eficiente. Uma possível explicação para o resultado

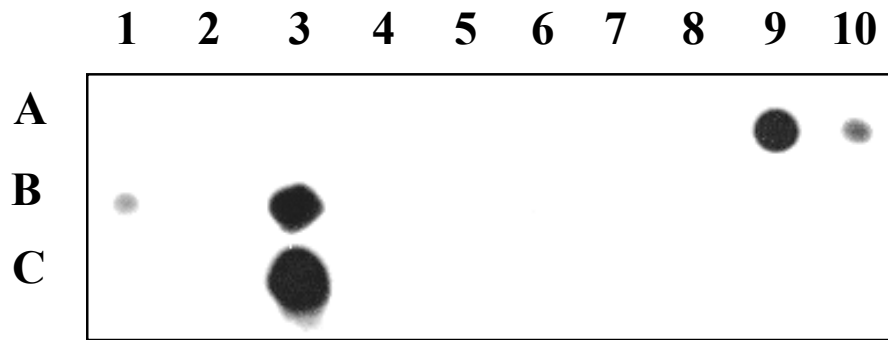


Figura 15 - “Dot blot” para seleção de clones do componente A de TYhMV. O DNA plasmidial de 20 transformantes (A 1-10 e B 1-10) foi imobilizado em uma membrana de náilon e hibridizado a 55°C com a sonda derivada do clone pUFV 70. Na linha C foram aplicados os DNAs plasmidiais dos controles da hibridização: pBS IISK+ (C1) e pUFV 70 (C3).

da clonagem é a existência de diversos sítios *Cla* I, até então não identificados, na seqüência do componente A de TYhMV. Neste caso, os subclones obtidos seriam fragmentos em série do componente A. No entanto, o seqüenciamento parcial dos subclones revelou que as seqüências dos oligonucleotídeos F70FCLAF e R70FCLAR (Quadro 2) estão presentes nas extremidades dos insertos e que são resultado de amplificação específica, exceto pUFV245, cujo inserto parece ser produto de amplificação inespecífica (dados não-mostrados). Esta observação elimina a possibilidade de terem sido clonados fragmentos seqüenciais do componente A.

A determinação precisa do tamanho dos fragmentos de DNA viral clonados foi dificultada pela resistência do sítio da endonuclease *Cla* I à clivagem, exceto para o clone pUFV244, cuja hidrólise liberou um inserto de 0,5 Kb. Os demais clones obtidos inicialmente em *E. coli* JM109 foram transferidos para a estirpe JM110, um mutante negativo para *dam* metilase. Os clones pUFV246 e 247, ao contrário do clone pUFV245, liberaram fragmentos com, aproximadamente 1,2 e 0,8 Kb, respectivamente (dados não-mostrados).

Uma vez que o mapa de restrição do componente A de TYhMV não foi determinado, esses resultados de hidrólise com *Cla* I não implicam que os tamanhos dos insertos foram determinados conclusivamente. Somente após a confecção de um mapa de restrição saturado dos clones, bem como o seqüenciamento completo, será possível avaliar se de fato um desses clones possui o componente A completo de TYhMV.

O seqüenciamento parcial destes subclones do componente A de TYhMV mostrou que eles se sobrepõem às seqüências parciais obtidas do clone pUFV70. O resultado desta sobreposição gerou a seqüência completa do clone pUFV70, a qual compreende as regiões 5' da CP e da Rep e também a região comum (Figura 1A).

A fim de determinar o relacionamento do componente B de TYhMV clonado com o componente A subclonado, foi feito o alinhamento da seqüência da região comum de ambos os componentes (Figura 16). Apenas dois nucleotídeos diferem nas seqüências alinhadas. A identidade dos 136 nucleotídeos comparados supera 98%, o que fornece evidência conclusiva de que ambos os componentes virais, aqui discutidos, pertencem ao mesmo vírus, o TYhMV.

```

A      AATTGGGGTCTCGCTCAAACCTCCGCTAGTCAATTGGTGACTGGTGTACAATATATAGTAG
B      AATTGGGGTCTCGCTCAAACCTCCGCTAGTCAATTGGTGACTGGTGTACAATATATAGTAG
*****

A      AAGCCTCTATAGAACTTTCCAATCTCGTTTCGAACACGTGGGCGGCCATCCGTATAATATT
B      AAGCCTCTATAGAACTCTC-AATCTCGTTTCGAACACGTGGGCGGCCATCCGTATAATATT
***** ** *****

A      ACCGGATGGCCGC
B      ACCGGATGGCCGC
*****

```

Figura 16 - Alinhamento das seqüências da região comum procedentes do seqüenciamento parcial do componente A e do seqüenciamento completo do componente B clonado de TYhMV. Os asteriscos abaixo das seqüências representam os nucleotídeos idênticos.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

A partir do DNA total de tomateiros infectados, provenientes das regiões de Itaperuna-RJ e Betim-MG, foi realizado o diagnóstico molecular de geminivirose baseado em ensaios de PCR, utilizando-se dois pares de oligonucleotídeos degenerados específicos para os componentes A e B do genoma viral. A amplificação de fragmentos com tamanho específico confirmou a presença de geminivírus em ambas as amostras.

A fim de caracterizar os isolados identificados, os fragmentos amplificados foram clonados e sua seqüência parcial foi determinada. O seqüenciamento dos clones derivados do componente A, pUFV70 e pUFV68 (respectivamente dos isolados do RJ e MG), permitiu a identificação da região 5' do gene da proteína capsidial e da região comum.

A análise comparativa da seqüência de aminoácidos do N-terminal da CP dos isolados do Rio de Janeiro e Minas Gerais com diversos geminivírus mostrou que estes isolados são diferentes entre si, possuindo maior homologia com os geminivírus do gênero *Begomovirus*. A análise filogenética baseada na seqüência da CP confirmou o constatado e claramente agrupou os dois novos isolados entre os *Begomovirus*. Entretanto, a similaridade de seqüência entre os isolados e os demais geminivírus não alcançou 90%. Uma vez que a seqüência de aminoácidos do N-terminal é altamente representativa do genoma, esses resultados são

coerentes com o argumento de que os geminivírus identificados são novas espécies. Análise comparativa de seqüência de nucleotídeos da região comum dos isolados forneceu suporte adicional para essa proposição. Embora os agrupamentos na árvore filogenética da região amino da CP sejam bem mais definidos, a análise filogenética baseada na região comum também demonstrou que os novos isolados têm estreita relação com os *Begomovirus* comparados. Além disso, com exceção da presença de *cis*-elementos funcionais altamente conservados na região intergênica dos geminivírus em geral, a divergência de nucleotídeos da região comum foi suficientemente alta para caracterização de novas espécies.

Para completa caracterização molecular do isolado do Rio de Janeiro, aqui referido como TYhMV (“*Tomato yellowish mosaic virus*”), foram utilizadas duas estratégias na clonagem dos componentes genômicos virais. A primeira baseou-se na clonagem direta do componente B do vírus isolado de tomateiros infectados, enquanto o componente A foi inicialmente amplificado por PCR com oligonucleotídeos especificamente desenhados a partir da seqüência parcial de pUFV70.

A partir do DNA total isolado de plantas infectadas foi obtido um clone de 2,6 Kb, denominado pUFV248, que corresponde à completa extensão do componente B de TYhMV. A organização gênica do componente viral foi determinada por meio de seqüenciamento. O componente B de TYhMV possui duas ORFs, BV1 e BC1, além da região comum, seguindo o padrão de organização gênica observado nos componentes B dos *Begomovirus*.

A seqüência completa do componente B de TYhMV, bem como as seqüências deduzidas de aminoácidos das proteínas BV1 e BC1, foram utilizadas em análises filogenéticas, visando a classificação taxonômica de TYhMV. Os resultados destas análises revelaram que o TYhMV está agrupado com outros *Begomovirus* do Novo Mundo, mais especificamente com dois isolados de ocorrência no Brasil: TGMV e BGMV.

O alinhamento da seqüência da região comum do componente B do TYhMV com a mesma região dos vírus correlatos BGMV e TGMV possibilitou

a identificação de potenciais *cis* elementos da origem de replicação envolvida no controle de transcrição. Embora os requisitos de seqüência estejam satisfeitos para a funcionalidade do componente clonado, não foram realizados ensaios biológicos para verificar a infectividade do clone.

Na tentativa de clonar o componente A amplificado com os oligonucleotídeos específicos a partir do DNA total de tomateiros infectados, foram isolados quatro clones, pUFV244, pUFV245, pUFV246 e pUFV247, que hibridizaram com a sonda pUFV70. As seqüências parciais destes clones foram determinadas, e suas sobreposições com a seqüência parcial do clone pUFV70 proporcionaram o seqüenciamento completo deste clone. Embora os quatro clones provenientes do componente A não tenham sido totalmente caracterizados, o alinhamento de sua região comum com a região comum do componente B clonado revelou uma identidade de seqüência de 98,5%. Este alto nível de conservação da região comum indica que ambos os componentes virais caracterizados pertencem ao genoma do vírus TYhMV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUZID, A.M., POLSTON, J.E., HIEBERT, E. The nucleotide sequence of tomato mottle virus, a new geminivirus isolated from tomatoes in Florida. **Journal of General Virology**, v.73, p.3225-3229, 1992.
- ACH, R.A., DURFEE, T., MILLER, A.B., TARANTO, P., HANLEY-BOWDOIN, L., ZAMBRYSKI, P.C., GRUISSEM, W. RRB1 and RRB2 encode maize retinoblastoma-related protein that interact with a plant D-type Cyclin and geminivirus replication protein. **Molecular and Cellular Biology**, v.17, p.5077-5086, 1997.
- AZZAM, O., FRAZER, J., DE LA ROSA, D., BEAVER, J.S., AHLQUIST, P., MAXWELL, D.P. Whitefly transmission and efficient ssDNA accumulation of bean golden mosaic geminivirus require functional coat protein. **Virology**, v.204, p.289-296, 1994.
- BOULTON, M.I., PALLAGHY, C.K., CHATANI, M., MACFARLANE, S., DAVIES, J.W. Replication of maize streak virus mutants in maize protoplasts: evidence for a movement protein. **Virology**, v.192, p.85-93, 1993.
- BOULTON, M.I., STEINKELLNER, J., DONSON, J., MARKHAM, P.G., KING, D.I., DAVIES, J.W. Mutational analysis of the virion-sense genes of maize streak virus. **Journal of General Virology**, v.70, p.2309-2323, 1989.
- BRIDDON, R.W., LUNNESS, P., BEDFORD, I.D., CHAMBERLIN, C.L., MESFIN, T., MARKHAM, P.G. A streak disease of pearl millet caused by a leafhopper-transmitted geminivirus. **European Journal of Plant Pathology**, v.102, p.397-400, 1996.

- BRIDDON, R.W., PINNER, M.S., STANLEY, J., MARKHAM, P.G. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. **Virology**, v.177, p.85-94, 1990.
- BRIDDON, R.W., WATTS, J., MARKHAM, P.G., STANLEY, J. The coat protein of beet curly top virus is essential for infectivity. **Virology**, v.172, p.628-633, 1989.
- BROUGH, C.L., SUNTER, G., GARDINER, W.E., BISARO, D.M. Kinetics of tomato golden mosaic virus DNA replication and coat protein promoter activity in *Nicotiana tabacum* protoplasts. **Virology**, 187, 1-9, 1992.
- 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.
- COUTTS, R.H., COFFIN, R.S., ROBERTS, E.J., HAMILTON, W.D. The nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of potato yellow mosaic virus. **Journal of General Virology**, v.72, p.1515-1520, 1991.
- CRESPI, S., NORIS, E., VAIRA, A., ACCOTTO, G. Molecular characterizaion of cloned DNA from a tomato yellow leaf curl virus isolate from Sicily. **Phytopatology Medit.**, v.34, p.93-99, 1995.
- 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 of the United States of America**, v.92, p.5640-5644, 1995.
- DONSON, J., ACCOTTO, G.P., BOULTON, M.I., MULLINEAUX, P.M., DAVIES, J.W. The nucleotide sequence of a geminivirus from *digitaria sanguinalis*. **Virology**, v.160, p.161-169, 1987.
- EAGLE, P.A., HANLEY-BOWDOIN, L. Cis Elements that contribute to geminivirus transcriptional regulation and the efficiency of DNA replication. **Journal of Virology**, v.71, p.6947-6955, 1997.
- ELMER, J.S., BRAND, L., SUNTER, G., GARDINER, W., BISARO, D.M., ROGERS, S.G. Genetic analysis of the tomato golden mosaic virus. II. The product of the AL1 coding sequence is required for replication. **Nucleic Acids Research**, v.16, p.7043-7060, 1988.
- ENGEL, M., FERNANDEZ, O., JESKE, H., FRISCHMUTH, T. Molecular characterization of a new whitefly-transmissible bipartite geminivirus infecting tomato in Panama. **Journal of General Virology**, v.79, p.2313-2317, 1988.

- FONTES, E.P.B., EAGLE, P.A., SIPE, P.S., LUCKOW, V.A., HANLEY-BOWDOIN, L. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. **The Journal of Biological Chemistry**, v.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. **The 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. **The Plant Cell**, v.4, p.597-608, 1992.
- FULTON, T.M., CHUNWONQSE, Z.E., TANKSLEY, S.D. Microprep protocol for extractions of DNA from tomato and other herbaceous plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.13, p.207-209, 1995.
- GALVÃO, R.M., ALMEIDA, J.D., CAMINI, N., ZERBINI, F.M., FONTES, E.P.B. Molecular detection and biobalistic propagation of novel malvaceae and tomato-infecting geminiviruses. **Fitopatologia Brasileira**, v.88, p.602, 1997.
- GARDINER, W.E., 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., FARIA, J.C., HANSON, S.F., MORALES, F.J., AHLQUIST, P.G., MAXWELL, D.P., RUSSELL, D.R. Cloning of the complete DNA genomes of four bean-infecting. Geminiviruses and determining their infectivity by electric discharge. Particle acceleratio. **Phytopathology**, v.81, p.980-985, 1991.
- GRONING, B.R., HAYES, R.J., BUCK, K.W. Simultaneous regulation of tomato golden mosaic virus coat protein and all gene expression: expression of the al4 gene may contribute to suppression of the all gene. **Journal of General Virology**, v.75, p.721-726, 1994.
- HAFNER, G.J., HARDING, R.M., DALE, J.L. A DNA primer associated with banana bunch top virus. **Journal of General Virology**, v.78, p.479-486, 1997.
- HAMILTON, W.D., STEIN, V.E., COUTTS, R.H.A., BUCK, K.W. Complete nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of tomato golden mosaic virus: potencial coding regions and regulatory sequences. **EMBO Journal**, v.3, p.2197-2205, 1984.

- HANLEY-BOWDOIN, L., SETTLAGA, S.B., OROZCO, B.M., NAGAR, S., ROBERTSON, D. Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.1, p.71-106, 1999.
- HAYES, R.J., BUCK, K.W. Replication of tomato golden mosaic virus DNA B in transgenic plants expressing open reading frames (ORFs) of DNA A: requirement of ORF AL2 for production of single-stranded DNA. **Nucleic Acids Research**, v.17, p.10213-10222, 1989.
- HAYES, R.J., MACDONALD, H., COUTTS, R.H.A., BUCK, K.W. Priming of complementary DNA synthesis in vitro by small DNA molecules tightly bound to virion DNA of wheat dwarf virus. **Journal of General Virology**, v.69, p.1345-1350, 1988.
- HEYRAUD-NITSCHKE, F., SCHUMACHER, S., LAUFS, J., SCHAEFER, S., SCHELL, J., GRONENBORN, B. Determination of the origin cleavage and joining domain of geminivirus rep proteins. **Nucleic Acids Research**, v.23, p.910-916, 1995.
- HOFER, J.M., DEKKER, E.L., REYNOLDS, H., WOOLSTON, C.J., COX, B., MULLINEAUX, P.M. Coordinate regulation of DNA replication and virion-sense gene expression in wheat dwarf virus. **The Plant Cell**, v.4, p.213-223, 1992.
- HOFER, P., BEDFORD, I.D., MARKHAM, P.G., JESKE, H., FRISCHMUTH, T. Coat protein gene replacement result in whitefly transmission of na insect nontransmissible geminivirus isolate. **Virology**, v.236, p.288-295, 1997.
- HONG, Y.G., HARRISON, B.D. Nucleotide sequences from tomato leaf curl viruses from different countries: evidence for three geographically separate branches in evolution of the coat protein of whitefly-transmitted geminiviruses. **Journal of General Virology**, v.76, p.2043-2049, 1995.
- HONG, Y., ROBINSON, D.J., HARRISON, B.D. Nucleotide sequence evidence for the occurrence of three distinct whitefly-transmitted geminiviruses in cassava., **Journal of General Virology**, v.74, p.2437-2433, 1993.
- HOWELL, S.H. Physical structure and genetic organization of the genome of maize streak virus (kenyan isolate). **Nucleic Acids Research**, v.12, p.7359-7375, 1984.
- ILYINA, T.V., KOONIN, E.V. Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes and archaebacteria. **Nucleic Acids Research**, v.20, p.3279-3285, 1992.

- INGHAM, D.J., LAZAROWITZ, S.G. A single missense mutation in the BR1 movement protein alters the host range of the squash leaf curl geminivirus. **Virology**, v.196, p.694-702, 1993.
- INGHAM, D.J., PASCAL, E., LAZAROWITZ, S.G. Both bipartite geminivirus movement proteins define viral host range, but only BL1 determines viral pathogenicity. **Virology**, v.207, p.191-204, 1995.
- JIANG, H., HOU, Y.M., GUZMAN, P., GILBERTSON, R.L. Complete nucleotide sequence of the infectious clone of tomato leaf crumple geminivirus. **Phytopathology**, v.88, s.44, 1998.
- JUPIN, I., DE KOUCHKOVSKY, F., JOUANNEAU, F., GRONENBORN, B. Movement of tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV): Involvement of the protein encoded by ORF C4. **Virology**, v.204, p.82-90, 1994.
- JUPIN, I., HERICOURT, F., BENZ, B., GRONENBORN, B. Dna replication specificity of TYLCV geminivirus is mediated by the amino-terminal 116 amino acids of the rep protein. **FEBS Letters**, v.362, p.116-120, 1995.
- KALLENDER, H., PETTY, I.T.D., STEIN, V.E., PANICO, M., BLENCH, I.P., ETIENNE, A.T., MORRIS, H.R., COUTTS, R.H.A., BUCK, K.W. Identification of the coat protein gene of tomato golden mosaic virus. **Journal of General Virology**, v.69, p.1351-1357, 1988.
- KIM, K.S., LEE, K.W. Geminivirus-induced microtubules and their suggested role in cell-to-cell movement. **Phytopathology**, v.82, p.664-669, 1992.
- KLUTE, K.A., NADLER, S.A., STENGER, D.C. Horseradish curly top virus is a distinct subgroup II geminivirus species with rep and C4 genes derived from a subgroup III ancestor. **Journal of General Virology**, v.77, p.1369-1378, 1996.
- LAUFS, J., JUPIN, I., DAVID, C., SCHUMACHER, S., HEYRAUD-NITSHKE, F., GRONENBORN, B. Geminivirus replication: Genetic and biochemical characterization of Rep protein function, a review. **Biochimie**, v.77, p.765-773, 1995a.
- LAUFS, J., TRAUT, W., HEYRAUD, F., MATZEIT, V., ROGERS, S.G., SCHELL, J., GRONENBORN, B. *In vitro* cleavage and joining at the viral origin of replication by the replicator initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.92, p.3879-3883, 1995b.
- LAZAROWITZ, S.G. Geminiviruses: genomes structure and gene function. **Critical Reviews in Plant Science**, v.11, p.327-349, 1992.

- LAZAROWITZ, S.G., LAZDINS, I.B. Infectivity and complete nucleotide sequence of the cloned genomic components of a Bipartite squash leaf curl geminivirus with a broad host range phenotype. **Virology**, v.180, p.58-69, 1991.
- LIU, H., 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, 1997a.
- LIU, L., VAN TONDER, T., PIETERSEN, G., DAVIES, J.W., STANLEY, J. Molecular characterization of a subgroup I geminivirus from a legume in South Africa. **Journal of General Virology**, v.78, p.2113-2117, 1997b.
- MACDOWELL, S.W., MACDONALD, H., HAMILTON, W.D.O., COUTTS, R.H.A., BUCK, K.W. The nucleotide sequence of cloned wheat dwarf virus DNA. **EMBO Journal**, v.4, p.2173-2180, 1985.
- MESHI, T., WATANABE, Y., SAITO, T., SUGIMOTO, A., MAEDA, T., OKADA, Y. Function of the 30 kD protein of tobacco mosaic virus: involvement in cell-to-cell movement and dispensability for replication. **EMBO Journal**, v.6, p.2557-2563, 1987.
- MORRIS, B.A.M., RICHARDSON, K.A., HALEY, A., ZHAN, W., THOMAS, J.E. The nucleotide sequence of the infectious cloned DNA component of tobacco yellow dwarf virus reveals features of geminiviruses infecting monocotyledonous plants. **Virology**, v.187, p.633-642, 1992.
- NAGAR, S., PEDERSEN, T.J., CARRICK, K.M., HANLEY-BOWDOIN, L., ROBERTSON, D. A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. **The Plant Cell**, v.7, p.705-719, 1995.
- 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., GLADFELTER, H.J., SETTLAGE, S.B. EAGLE, P.A., GENTRY, R., HANLEY-BOWDOIN, L. Multiple cis elements contribute to geminivirus origin function. **Virology**, v.242, p.346-356, 1998.
- OROZCO, B.M., HANLEY-BOWDOIN, L. A DNA structure is required for geminivirus replication origin function. **Journal of Virology**, v.70, p.148-158, 1996.

- OROZCO, B.M., MILLER, A.B., SETTLAGE, S.B., HANLEY-BOWDOIN, L. Functional domains of a geminivirus replication protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.9840-9846, 1997.
- 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.
- PASCAL, E., GOODLOVE, P.E., WU, L.C., LAZAROWITZ, S.G. Transgenic tobacco plants expressing the geminivirus BL1 protein exhibit symptoms of viral disease. **The Plant Cell**, v.5, p.795-807, 1993.
- 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. **The Plant Cell**, v.6, p.995-1006, 1994.
- PATEL, V.P., ROJAS, M.R., PAPLOMATAS, E.P., GILBERTSON, R.L. Cloning biologically active geminivirus DNA using PCR and overlapping primers. **Nucleic Acid Research**, v.21, p.1325-1326, 1993.
- PEDERSEN, T.J., HANLEY-BOWDOIN, L. Molecular characterization of the AL3 protein encoded by a bipartite geminivirus. **Virology**, v.202, p.1070-1075, 1994.
- PIVEN, N.M., UZCATEGUI, R.C., INFANTE, D.H. Resistance to tomato yellow Mosaic virus in species of *Lycopersicon*. **Plant Disease**, v.79, p.590-594, 1995.
- POLSTON, J.E., ANDERSON, P. The emergence of whitefly-transmitted geminivirus in tomato in the Western Hemisphere. **Plant Disease**, v.1028, 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 systemic movement. **Virology**, v.218, p.264-268, 1996.
- RIBEIRO, S.G. Geminivirus in solanaceous plants. **Journal of the Brazilian Society for Virology**, v.4, p.RT8-2, 1999.
- ROJAS, M.R., GILBERTSON, R.L., RUSSEL, D.R., MAXWELL, D.P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease**, v.77, p.340-347, 1993.

- ROJAS, M.R., NOUEIRY, A.O., LUCAS, W.J., GILBERTSON, R.L. Bean dwarf mosaic geminivirus movement protein recognize DNA in a form- and size-specific manner. **Cell**, v.9, 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.
- SAMBROOK, J., FRISTSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning – a laboratory manual**. 2^a ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 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. **The Plant Cell**, v.7, p.1185-1194, 1995.
- SANDERFOOT, A.A., LAZAROWITZ, S.G. Getting it together in plant virus movement: cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. **Cell Biology**, v.6, p.353-358, 1996.
- SAUNDERS, K., LUCY, A., STANLEY, J. DNA forms of the geminivirus African cassava mosaic virus consistent with a rolling circle mechanism of replication. **Nucleic Acid Research**, v.19, p.2325-2330, 1991.
- SETTLAGE, S.B., MILLER, B., HANLEY-BOWDOIN, L. Interactions between geminivirus replication proteins. **Journal of Virology**, v.70, p.6790-6795, 1996.
- STANLEY, J. Analysis of *African cassava mosaic virus* recombinants suggests strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. **Virology**, v.206, p.707-712, 1995.
- STANLEY, J., GAY, M.R. Nucleotide sequence of cassava latent virus DNA. **Nature**, v.301, p.260-262, 1983.
- STANLEY, J. Geminivirus: plant viral vectors. **Current Opinion in Genetics Development**, v.3, p.91-96, 1993.
- STANLEY, J., MARKHAM, P.G., CALLIS, R.J., PINNER, M.S. The nucleotide sequence of an infectious clone of the geminivirus beet curly top virus. **EMBO Journal**, v.5, p.1761-1767, 1986.

- STENGER, D.C., OSTROW, K.M. Genetic Complexity of a beet curly top virus population used to assess sugar beet cultivar response to infection. **Molecular Plant Pathology**, v.86, p.929-933, 1996.
- STORM, M.M.H., KORMELINK, R., PETERS, D., VAN LENT, J.W.M., GOLDBACH, R.W. The nonstructural NSn protein of tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and insect cells. **Virology**, v.214, p.485-493, 1995.
- SUNTER, G., BISARO, D.M. Transactivation in a geminivirus: AL2 gene product is needed for coat protein expression. **Virology**, v.180, p.416-419, 1991.
- SUNTER, G., BISARO, D.M. Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. **The Plant Cell**, v.4, p.1321-1331, 1992.
- SUNTER, G., BISARO, D.M. Transcription map of the B genome of tomato golden mosaic virus and comparison with A component transcripts. **Virology**, v.173, p.647-655, 1989.
- SUNTER, G., HARTITZ, M.D., BISARO, D.M. Tomato golden mosaic virus leftward gene expression: autoregulation of geminivirus replication protein. **Virology**, v.195, p.275-280, 1993.
- SUNTER, G., HARTITZ, M.D., HORMUDZI, S.G., BROUGH, C.L., BISARO, D.M. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required for coat protein accumulation while ORF AL3 is necessary for efficient DNA replication. **Virology**, v.179, p.69-77, 1990.
- SUNTER, G., STENGER, D.C., BISARO, D.M. Heterologous complementation by geminivirus AL2 and AL3 genes. **Virology**, v.203, p.203-210, 1994.
- WARD, B.M., LAZAROWITZ, S.G. Nuclear export in plants: use of geminivirus movement proteins for a cell-based export assay. **The Plant Cell**, v.11, p.11267-1276, 1999.
- WARD, B. M., MEDVILLE, R., LAZAROWITK, S. G., TORGEON, R. The geminivirus BL1 movement protein is associated with endoplasmic reticulum-delivered tubules in developing phloem cells. **Journal of Virology**, v.71, p.3726-3733, 1997.
- WARTIG, L., KHEYR-POUR, A., NORIS, E., KOUCHKOVSKY, F. DE, JOUANNEAU, F., GRONENBORN, B., JUPIN, I. Genetic analysis of the monopartite tomato yellow leaf curl geminivirus: roles of V1, V2, and C2 ORFs in viral pathogenesis. **Virology**, v.228, p.132-140, 1997.

- WOLF, S., DEOM, C.M., BEACHY, R.N., LUCAS, W.J. Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. **Science**, v.246, p.377-379, 1989.
- XIE, Q., SUAREZ-LOPES, P., GUTIERREZ, C. Identification and analysis of a retinoblastoma binding motif in the replication of a plant DNA virus: requirement for efficient viral DNA replicatio. **The EMBO Journal**, v.14, p.4073-4082, 1995.
- XIE, W.S., HU, J.S. Molecular cloning, sequence analysis, and detection of banana bunchy top virus in Hawaii. **Phytopathology**, v.85, p.339-347, 1995.
- ZHOU, X., LIU, Y., CALVERT, L., MUNOZ, C, OTIM-NAPE, G.W., ROBINSON, D.J., HARRISON, B.D. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. **Journal of General Virology**, v.78, p.2101-2111, 1997.

APÊNDICE

APÊNDICE

>TYhMV (seqüência parcial do componente A)

```
AACGACGGCA GTGCAAGCTT GCATGCTGAA GGCCACATCG TCTTCCCTGT CCTTGAGTCA
CCCTCGATTA TTATACTGAT AGGCCTCTCC GGCCGCGCAG AGGCATCCCT TCCGAAATAG
TTGTCTGCCC AAGCTTTCAT CTCGTCTGGG ACGTTAGTAA ATGACGAGAG GGGAAACGGA
GGAACCCACG GTTCTGGAGC CTTTGCGAAA ATACGTTCCA AATTTGAACG AATATTATGA
TGTTGAAGGA CGTAATCTTT CGGTTGTTCC TCCTTTAATA TATTGAGGGC CTCCATGACT
GATCCTGCGT TAAGGACCTT GGCATACGTG TCGTTTGCAG ATTGCTGACC TCCTCTAGCT
GATCTTCCAT CGATTTGGAA AACTCCATGA CCAATGAAGT CTCCGTCTTT CTCCACGTAT
GCCTTGACAT CTGACGAGCT CTTAGCTCCC TGAATGTTTCG GATGGAAATG TGCTGACCTT
GTTGGGGATA CAAGGTCGAA TAATCTGTTG TTTGTGCAGA CGAATTTTCC TTCGAACTGT
ATGAGGACGT GCAAATGAGG TTGCCCATCT TCATGTAATT CTCTGGCAAC ACGAATGAAC
AACTTATTAA CAGGTATTTG TATGGCTAAT AATTGGGAAA GTGTTTCGTC TTTGGTTAAA
GAACAGTGGG GATAAGTGAG GAAATAATTC TTGGCACTTA AACGAAAGCG TTTGGGTGGG
GGCATTCTCG TAAATAAAGG GGTGTCACCA ATTGGGGTCT CGCTCAAACCT CCGCTAGTCA
ATTGGTGACT GGTGTACAAT ATATAGTAGA AGCCTCTATA GAACTTTCCA ATCTCGTTTCG
AACACGTGGG CGGCCATCCG TATAATATTA CCGGATGGCC GCGAAAAAAT TTTGGACTTG
GGCCGCTTTA ACTGGGCCGG TTCTCTTTAT TGAATGAAAG TAATGTGTGG CCCAACCATG
TTAAGTCTGA CGAGCTTAGA TATTTTTAAC AACTTACCGC CCAAGTTGTA TAACGGCTAT
AAATTGAACG TGCATGTGAT AATAGCTTTA ATTCAAAATG CCTAAGCGCG ATGCCCCATG
GCGCCACATG GCAGGGACGT CTAAGATTAG CCGTTCCACT AATTATTCTC CTCGTGCAGG
ATTTGGGCCA CGACCTAACA AGGCCTCTGA ATGGGTTAAC AGGCCTATGT ACAGAAAGCC
CTGCAG
```

Figura 1A - Seqüência completa do clone pUFV70 que corresponde a um fragmento de 1,2 Kb do componente A de TYhMV. Em negrito está destacado o sítio de clivagem de Rep, conservado em todos os geminivírus.