

ALISON TALIS MARTINS LIMA

**CARACTERIZAÇÃO DE DOIS BEGOMOVÍRUS (*Tomato severe rugose virus* E *Tomato yellow vein streak virus*) QUE INFECTAM TOMATEIRO E
OBTENÇÃO DE CLONES INFECCIOSOS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

ALISON TALIS MARTINS LIMA

**CARACTERIZAÇÃO DE DOIS BEGOMOVÍRUS (*Tomato severe rugose virus* E *Tomato yellow vein streak virus*) QUE INFECTAM TOMATEIRO E
OBTENÇÃO DE CLONES INFECCIOSOS**

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

APROVADA: 30 de julho de 2008.

Prof^a. Claudine Márcia de Carvalho

Dr^a. Danielle Ribeiro de Barros

Prof^a. Márcia Rogéria de Almeida Lamego

Prof. Leandro Grassi de Freitas

Prof. Francisco Murilo Zerbini Junior
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus por direcionar meus caminhos permitindo a plena realização de meus sonhos;

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

Ao Professor Francisco Murilo Zerbini, pela oportunidade de crescimento profissional, pela valiosa orientação, dedicação e amizade durante a realização destes trabalhos;

Aos professores do DFP pela paciência, atenção e amizade;

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

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

Aos meus pais Joaquim e Terezinha, por acreditarem nos meus sonhos e lutarem ao meu lado pela realização de cada um deles e por me ensinarem com muita sabedoria, valores que guardarei por toda a vida;

Aos meus avós, que apesar de ausentes, desejaram e sonharam ao meu lado;

Ao meu irmão, Alexandre, por estar presente ao longo de minha vida e pela confiança;

À minha namorada Gilcimara pela cumplicidade, carinho e atenção;

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

BIOGRAFIA

ALISON TALIS MARTINS LIMA, filho de Joaquim Pereira Lima Filho e Terezinha Emiliana Martins Lima, nasceu em Ponte Nova, Minas Gerais, no dia 28 de dezembro de 1982.

Residiu e conclui o ensino fundamental e médio na cidade de Jequeri, Minas Gerais. Em 2001 iniciou o curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, graduando-se em março de 2007. Ingressou, nesse mesmo mês, no curso de pós-graduação em Fitopatologia em nível de mestrado na mesma universidade, submetendo-se à defesa de dissertação em julho de 2008.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Família Geminiviridae	5
2.2. Replicação viral	8
2.3. Movimento célula-a-célula e à longa distância	9
2.4. Interações geminivírus-hospedeiro	10
2.5. Begomovírus em tomateiro no Brasil.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. Isolados virais	19
3.2. Clonagem e sequenciamento dos genomas virais.....	19
3.3. Caracterização molecular	20
3.4. Construção de clones infecciosos	21
3.5. Determinação da gama de hospedeiros	21
4. RESULTADOS	23
4.1 Clonagem e sequenciamento dos genomas virais.....	23
4.1.1. Amplificação dos genomas virais	23
4.1.2. Clonagem dos fragmentos correspondentes a uma cópia do genoma viral... 25	
4.1.3. Confirmação da clonagem dos componentes genômicos.....	25
4.2. Caracterização molecular	28
4.2.1 Análise das sequências dos componentes genômicos virais dos clones pVIR088, pVIR089 e pVIR091	28
4.3. Construção de clones infecciosos	42
4.3.1 Construção dos clones “meia-cópia”	42
4.3.1 Ligação do fragmento correspondente a uma cópia de cada componente genômico ao clone “meia-cópia”	44
4.3.1 Confirmação da clonagem e análise da orientação	47
4.4. Teste de gama de hospedeiros	49
5. DISCUSSÃO	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS	72

RESUMO

LIMA, Alison Talis Martins, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho 2008. **Caracterização de dois begomovírus (*Tomato severe rugose virus* e *Tomato yellow vein streak virus*) que infectam tomateiro e obtenção de clones infecciosos.** Orientador: Francisco Murilo Zerbini Júnior. Co-orientadores: Poliane Alfenas-Zerbini e Murilo Geraldo de Carvalho

O gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) inclui vírus com genoma composto por uma ou duas moléculas de DNA fita simples, transmitidos a espécies de plantas dicotiledôneas pela mosca-branca *Bemisia tabaci*. No Brasil, após a introdução do biótipo B de *B. tabaci* no início da década de 1990, a incidência de begomovírus em tomateiro tornou-se freqüente, com vários relatos de novas espécies virais. Algumas dessas espécies tornaram-se prevalentes em condições de campo no Brasil, incluindo o *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e o *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV). O objetivo deste trabalho foi caracterizar dois isolados dessas espécies, por meio da clonagem de seus genomas completos seguida de análise molecular, e da obtenção de clones infecciosos para determinação de suas gamas de hospedeiros. Extratos de DNA total de plantas infectadas foram utilizados para a amplificação do genoma viral completo utilizando-se a DNA polimerase do fago ϕ 29. Os produtos da amplificação foram clonados em plasmídeos e completamente

seqüenciados. A análise das seqüências do DNA-A e DNA-B dos isolados ToSRV-[BR:Pir1:05] e ToYVSV-[BR:Pda30:05] indicou valores de identidade acima de 90% com outros isolados de ToSRV e ToYVSV, respectivamente. A análise molecular indica que o DNA-A do isolado BR:Pir1:05 pode ser resultado de um evento de recombinação, no qual o vírus adquiriu a ORF *rep* do *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) e a ORF *cp* de um vírus não identificado. A análise do DNA-B do mesmo isolado indica a existência de relacionamento com vírus que infectam plantas daninhas/silvestres no Brasil, reforçando a hipótese de que vírus presentes em hospedeiros silvestres deram origem aos vírus atualmente encontrados em tomateiro. Adicionalmente, devido à alta identidade observada entre os DNAs-B dos isolados BR:Pir1:05 e do ToRMV, é possível que este componente genômico seja compartilhado pelos dois vírus. Nos testes de gama de hospedeiros, plantas apresentando infecções latentes foram observadas para os dois isolados. Tais plantas podem atuar como reservatórios naturais e servir de fonte de inóculo primário para plantas hospedeiras de importância econômica, como o tomateiro. Os clones infecciosos do isolado BR:Pda30:05 apresentaram baixa infectividade nos testes de gama de hospedeiros. É possível que o método de inoculação não tenha sido eficiente na transmissão deste isolado, ou que os clones apresentem mutações que reduzam a eficiência de sua replicação.

ABSTRACT

LIMA, Alison Talis Martins, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2008.
Characterization of two begomoviruses (*Tomato severe rugose virus* and *Tomato yellow vein streak virus*) that infect tomato and production of infectious clones.
Adviser: Francisco Murilo Zerbini Júnior. Co-Advisers: Poliane Alfenas-Zerbini and Murilo Geraldo de Carvalho

The genus *Begomovirus* (family *Geminiviridae*) includes viruses with a genome comprised of one or two molecules of circular, single-stranded DNA, transmitted to dicot species by the whitefly *Bemisia tabaci*. In Brazil, after the introduction of the B biotype of *B. tabaci* in the early 1990s, the incidence of begomoviruses in tomato has become frequent, with several reports of new viral species. Some of these species have become prevalent under field conditions, including *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) and *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV). The purpose of this study was to characterize two isolates of these species through the cloning of their whole genomes followed by molecular analysis, and the production of infectious clones for determination of their host ranges. Total DNA extracts of infected plants were used for whole genome amplification using the phi29 phage DNA polymerase. The amplification products were cloned into plasmids and completely sequenced. Sequence analysis indicated that the DNA-A and DNA-B of ToSRV-[BR:Pir1:05] and ToYVSV-[BR:Pda30:05] isolates had greater than 90% identities with other isolates of ToSRV

and ToYVSV, respectively. The molecular analysis indicated that the DNA-A of the BR:Pir1:05 isolate may be the result of a recombination event, in which the virus acquired the *rep* ORF of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) and the *cp* ORF of an unidentified virus. Analysis of the DNA-B of the same isolate indicated the existence of a relationship with viruses that infect weed/wild hosts in Brazil, corroborating the hypothesis that viruses present in wild hosts led to the virus currently found in tomatoes. Additionally, because of the high identity observed between the DNA-B of ToSRV-[BR:Pir1:05] and ToRMV, it is possible that this genomic component is shared by the two viruses. In host range assays, plants showing latent infections were observed for both isolates. Such plants can act as natural reservoirs and serve as a primary source of inoculum for host plants of economic importance such as the tomato. The infectious clones of ToYVSV-[BR:Pda30:05] had low infectivity in the host range assays. It is possible that the inoculation method was not effective in the transmission of this isolate, or one or both clones could contain mutations that reduce the efficiency of their replication.

1. INTRODUÇÃO

A família *Geminiviridae* engloba vírus cujo genoma é composto de DNA fita simples circular, encapsidado por uma única proteína estrutural que confere à partícula uma morfologia icosaédrica geminada. A família é composta pelos gêneros *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus*, definidos com base no tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros e organização genômica (Stanley *et al.*, 2005). Os begomovírus possuem um ou dois componentes genômicos, são transmitidos pela mosca-branca *Bemisia tabaci* e infectam plantas dicotiledôneas.

Espécies de begomovírus que ocorrem no “Velho Mundo” (Europa, Ásia e África) possuem apenas um componente genômico e frequentemente estão associadas a um DNA satélite denominado DNA beta (Mansoor *et al.*, 2003). Por outro lado, begomovírus encontrados no “Novo Mundo” (Américas) possuem dois componentes, denominados DNA-A e DNA-B. No DNA-A encontram-se os genes envolvidos na replicação e encapsidação da progênie viral. O DNA-B contém os genes requeridos para o movimento intra- e intercelular na planta (Lazarowitz, 1992). Ambos os componentes genômicos são requeridos para a infecção sistêmica do hospedeiro. Dentre os begomovírus de maior importância econômica estão o *Bean golden mosaic virus*

(BGMV), o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) e o *African cassava mosaic virus* (ACMV).

Logo após a introdução do biótipo B de *B. tabaci* no Brasil (Melo, 1992), relatos sucessivos de doenças causadas por begomovírus ocorreram em tomateiro (*Solanum lycopersicum*), uma das culturas mais afetadas por estes patógenos em todo o mundo (Ribeiro *et al.*, 1994; Resende e Cupertino, 1996; Ribeiro *et al.*, 1996; Faria *et al.*, 1997; Galvão *et al.*, 1998). O biótipo B é capaz de atingir elevados níveis populacionais em um menor espaço de tempo em comparação com o biótipo A, o único anteriormente presente no Brasil, e possui uma ampla gama de plantas hospedeiras, incluindo solanáceas como o tomateiro (Bedford *et al.*, 1994; Santos *et al.*, 2004).

A caracterização preliminar dos begomovírus detectados em tomateiro indicou a presença de diversas novas espécies, sugerindo um grau elevado de diversidade genética (Ambrozevicius *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2003). Trabalhos subsequentes confirmaram a presença de pelo menos cinco novas espécies: *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) (Fernandes *et al.*, 2006), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) (Ribeiro *et al.*, 2007), *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) (Calegario *et al.*, 2007), *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) e *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) (Fernandes *et al.*, 2008). Algumas dessas espécies estão restritas a certas regiões, enquanto outras encontram-se amplamente distribuídas pelo país. Dentre elas, o ToSRV, já foi relatado nos estados de Goiás, Minas Gerais, Pernambuco, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo (Rezende *et al.*, 1997; Lima *et al.*, 2006; Castillo-Urquiza *et al.*, 2007; Cotrim *et al.*, 2007). O ToYVSV foi relatado inicialmente no estado de São Paulo (Faria *et al.*, 1997) e atualmente encontra-se presente também nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e Goiás (Zerbini *et al.*, 2005; Calegario *et al.*, 2007; Castillo-Urquiza *et al.*, 2007).

Além das espécies comumente associadas ao tomateiro, begomovírus que ocorrem em plantas daninhas e silvestres são uma fonte adicional de variabilidade. *Sida rhombifolia* é um exemplo típico de hospedeiro que funciona como reservatório natural de begomovírus no campo. Espécies de begomovírus originalmente encontrados em plantas daninhas, como o *Sida mottle virus* (SiMoV) e o *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV), já foram relatadas infectando naturalmente o tomateiro (Castillo-Urquiza *et al.*, 2007; Cotrim *et al.*, 2007).

A ocorrência de infecções mistas em condições de campo tem sido relatada, com dois ou mais vírus presentes simultaneamente na mesma planta (Castillo-Urquiza *et al.*, 2007). Nessas condições, novas espécies de begomovírus podem emergir como resultado de eventos de recombinação e pseudo-recombinação (Pita *et al.*, 2001; Monci *et al.*, 2002; Andrade *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007).

A caracterização biológica e molecular dos begomovírus que ocorrem em tomateiro no Brasil é uma etapa essencial de um trabalho de longo prazo que pretende determinar a diversidade genética desses patógenos, identificar hospedeiros alternativos que constituem fontes de inóculo, e auxiliar nos programas de melhoramento. A obtenção de clones infecciosos é fundamental para que se possa estudar os diferentes vírus isoladamente, ou em infecções mistas controladas.

Nesse contexto, os objetivos deste trabalho foram caracterizar dois isolados de begomovírus, correspondentes às espécies *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) obtidos de tomateiro na região Sudeste do Brasil. Os objetivos específicos incluíram: (i) a clonagem e o sequenciamento completo dos componentes genômicos (DNA-A e DNA-B) dos isolados de ToSRV e ToYVSV; (ii) a construção de clones infecciosos, na forma de 1,5 cópias de cada componente, incluindo duas cópias da origem de replicação, no vetor pBluescript KS+; e (iii) a

determinação da gama de hospedeiros dos dois vírus, por meio da inoculação de plantas via biobalística com os clones infecciosos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Família *Geminiviridae*

Vírus incluídos na família *Geminiviridae* são caracterizados pela morfologia icosaédrica da partícula e genoma composto de um ou dois componentes genômicos de DNA fita simples. A família é dividida em quatro gêneros de acordo com o inseto vetor, gama de hospedeiros, organização do genoma e relacionamento filogenético (Stanley *et al.*, 2005). O gênero *Mastrevirus* inclui vírus com um componente genômico, transmitidos por cigarrinhas (Homoptera: Cicadellidae) a plantas monocotiledôneas. A espécie-tipo é o *Maize streak virus* (MSV). O gênero *Curtovirus* engloba os geminivírus com um componente, transmitidos por cigarrinhas (Homoptera: Cicadellidae) a espécies dicotiledôneas. A espécie-tipo é o *Beet curly top virus* (BCTV). O gênero *Topocuvirus* contém uma única espécie, o *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV), com um único componente genômico e transmitido pela cigarrinha *Micrutalis malleifera* (Homoptera: Auchenoryncha) a espécies dicotiledôneas. O gênero *Begomovirus* inclui espécies com um ou dois componentes genômicos e que são transmitidos a espécies dicotiledôneas pela mosca-branca *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). A espécie-tipo é o *Bean golden mosaic virus* (BGMV). Espécies de begomovírus que possuem um componente

genômico estão frequentemente associadas a um DNA satélite denominado DNA β . O DNA β codifica uma proteína supressora de silenciamento gênico pós-transcricional (Briddon *et al.*, 2001; Briddon *et al.*, 2003; Bull *et al.*, 2004), induzindo sintomas mais severos quando presente (Briddon, 2003). Patossistemas incluindo begomovírus monossegmentados estão restritos ao “Velho Mundo” (Europa, Ásia e África). Nas Américas, todos os begomovírus relatados até o presente são compostos de dois componentes genômicos e não estão associados a DNAs satélites. Dois componentes cognatos não possuem identidade significativa entre suas sequências, exceto em uma região denominada região comum (RC), onde está localizada a origem de replicação (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). Uma exceção é o *Cabbage leaf curl virus* (CLCV), que apresenta apenas 80% de identidade entre as seqüências das RCs do DNA-A e DNA-B (Hill *et al.*, 1998). Atualmente, mais de 180 espécies de begomovírus já foram descritas, incluindo mais de 50 espécies que podem infectar o tomateiro (Fauquet *et al.*, 2008).

O DNA-A de begomovírus (Figura 1) codifica quatro proteínas: a proteína associada à replicação (Rep, “replication-associated protein”), cuja função é reconhecer e se ligar à origem de replicação e iniciar a síntese de DNA viral via mecanismo de círculo rolante (Fontes *et al.*, 1992; Orozco *et al.*, 1997); uma proteína transativadora da transcrição dos genes *cp* e *nsp* (TrAP, “trans-activating protein”) e que também atua como supressora de silenciamento (Voinnet *et al.*, 1999); uma proteína acessória que aumenta os níveis de acúmulo de DNA viral (Ren, “replication-enhancer protein”) (Sunter *et al.*, 1990; Pedersen e Hanley-Bowdoin, 1994); e a proteína capsidial, responsável pela encapsidação do genoma viral e essencial para transmissão pelo inseto vetor (Briddon *et al.*, 1990; Hofer *et al.*, 1997). Alguns begomovírus codificam a proteína AC4, que também está envolvida na supressão de silenciamento gênico (Vanitharani *et al.*, 2004). Uma ORF adicional denominada AC5 está presente em

poucas espécies de begomovírus. Esta ORF está quase totalmente inserida na sequência do gene *cp*, porém em orientação inversa e em outra fase de leitura. A função do produto da ORF AC5 foi estudada apenas para o *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV) (Kheyr-Pour *et al.*, 2000). Nesse estudo, mutações que inativaram a ORF AC5 não acarretaram nenhuma modificação fenotípica no vírus.

O DNA-B, por sua vez, codifica uma proteína de movimento célula-a-célula (MP, “movement protein”) responsável pelo aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas (Noueiry *et al.*, 1994) e a proteína NSP (nuclear shuttle protein) responsável pelo transporte do DNA viral através dos poros nucleares (Noueiry *et al.*, 1994; Sanderfoot *et al.*, 1996).

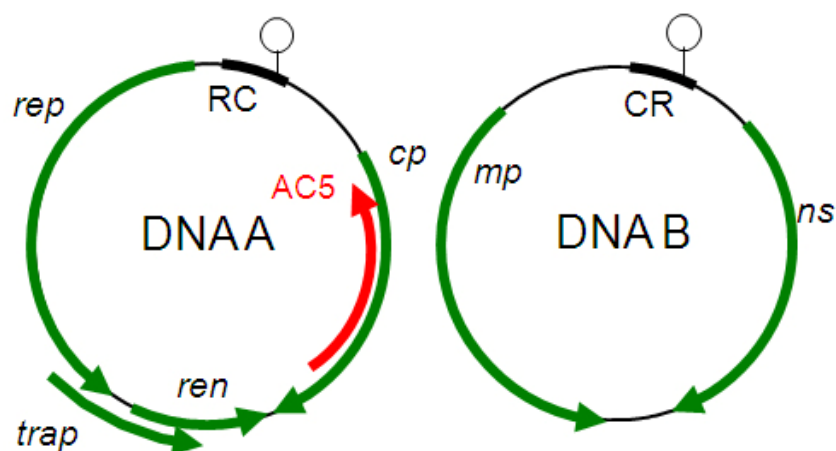


Figura 1. Representação esquemática do genoma de um begomovírus típico. Os círculos representam o genoma viral, constituído de dois componentes (DNA-A e DNA-B) com aproximadamente 2.600 nucleotídeos cada um. As setas indicam os genes virais e a direção em que ocorre a transcrição: *rep*, “replication-associated protein”; *trap*, “trans-activating protein”; *ren*, “replication-enhancer protein”; *cp*, proteína capsial (“coat protein”); *mp*, “movement protein”; *nsp*, “nuclear shuttle protein”. A ORF AC5, que se encontra presente em apenas algumas espécies (ToRMV, por exemplo), também está representada.

2.2. Replicação viral

Ao entrar na célula, o DNA viral é transportado até o núcleo, onde é convertido em uma molécula de DNA fita dupla denominada forma replicativa (RF), que servirá de molde para síntese de fitas de DNA contendo várias cópias do genoma viral (concatâmeros), via mecanismo de círculo rolante. A maneira como esta conversão ocorre não é conhecida, mas evidências indiretas indicam que ela é realizada por fatores do hospedeiro (Stanley, 1995).

A única proteína viral essencial à replicação dos begomovírus é a proteína Rep. Esta proteína de aproximadamente 41 kDa possui várias atividades bioquímicas, incluindo propriedade de ligação a DNA de fita simples e dupla, clivagem e ligação do DNA em seqüências específicas, hidrólise de ATP, e iniciação do mecanismo de replicação por círculo rolante (revisado por Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999).

A origem de replicação está localizada na região intergênica, comum entre os dois componentes genômicos. Nesta região está localizada uma seqüência repetida e invertida composta predominantemente por guanina e citosina, que forma uma estrutura conservada (“structurally-conserved element”, SCE) em forma de grampo, com uma alça contendo a seqüência conservada 5'-TAATATTA[↓]C-3', encontrada em todos os geminivírus (Orozco e Hanley-Bowdoin, 1996). É neste nonanucleotídeo que ocorre a clivagem pela proteína Rep, que inicia o processo de replicação por círculo rolante. A proteína Rep atua como uma endonuclease sítio-específica com requerimento de estrutura e de seqüência (Laufs *et al.*, 1995; Orozco e Hanley-Bowdoin, 1998). Na região comum encontram-se também seqüências específicas para a ligação da proteína Rep (Fontes *et al.*, 1992; Fontes *et al.*, 1994) e regiões promotoras da RNA polimerase tipo II de plantas, responsável pela transcrição dos genes virais.

O sítio de ligação de Rep ao DNA viral está localizado entre a caixa TATA do gene *rep* e a SCE (Orozco e Hanley-Bowdoin, 1998), sendo constituído por duas repetições diretas e uma repetição invertida de quatro ou cinco nucleotídeos (Gutierrez, 1999). O reconhecimento pela proteína Rep é considerado vírus-específico (Argüello-Astorga *et al.*, 1994; Harrison e Robinson, 1999; Ramos *et al.*, 2003), de modo que Rep só inicia a replicação de DNAs cognatos.

2.3. Movimento célula-a-célula e à longa distância

A infecção sistêmica da planta depende não somente da replicação viral na célula inicialmente infectada, mas também da capacidade do vírus de mover-se célula-a-célula até atingir o sistema vascular, de onde é transportado via floema para tecidos com demanda por fotoassimilados (tecidos dreno).

Inicialmente, o DNA viral presente no núcleo de uma célula infectada deverá ser transportado para o citoplasma, função desempenhada pela proteína NSP. Uma vez no citoplasma, o DNA viral é transportado através dos plasmodesmas até a célula adjacente com auxílio da proteína MP. Dessa forma, para que o transporte de DNA viral célula-a-célula ocorra, as duas proteínas de movimento codificadas pelo DNA-B devem atuar de forma cooperativa (Sanderfoot e Lazarowitz, 1995; 1996).

A proteína MP possui todas as propriedades de uma proteína de movimento “clássica” (Lucas, 2006): aumento do limite de exclusão passivo dos plasmodesmas, movimento célula-a-célula na ausência de DNA ou de qualquer outra proteína viral, ligação a ácidos nucléicos (neste caso, DNA) e transporte do DNA célula-a-célula (Noueiry *et al.*, 1994; Sanderfoot e Lazarowitz, 1995; Rojas *et al.*, 1998). No caso de mastrevírus, curtovírus e begomovírus monossegmentados, a proteína capsidial (CP) é essencial para o movimento a longa distância pelos feixes vasculares. No caso do

Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), um begomovírus monossegmentado, as proteínas V1 e/ou C4 são responsáveis pelo movimento núcleo-citoplasma e célula-a-célula, respectivamente (Rojas *et al.*, 2001). Por outro lado, begomovírus bissegmentados são capazes de infectar plantas sistemicamente sem o auxílio da proteína capsidial (Rojas *et al.*, 2005). Raras exceções, como o begomovírus bissegmentado *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), são capazes de infectar alguns hospedeiros mesmo na ausência do DNA-B cognato (Fontenelle *et al.*, 2007).

2.4. Interações geminivírus-hospedeiro

Além de apresentarem grande importância econômica como fitopatógenos, os geminivírus possuem características que os tornam atraentes para o estudo da interação vírus-hospedeiro: genoma pequeno composto de DNA circular de fita dupla, e replicação no núcleo da célula hospedeira utilizando diversos componentes da maquinaria de replicação da planta. Além disso, o genoma de DNA é facilmente manipulado por métodos de clonagem molecular, e existem métodos eficientes de inoculação independentes do vetor natural (Rojas *et al.*, 2005).

Resultados obtidos por diferentes grupos de pesquisadores demonstram a multiplicidade de interações entre os geminivírus e seus hospedeiros. Essas interações incluem modificações na estrutura e função de plasmodesmas (Noueiry *et al.*, 1994; Gilbertson *et al.*, 2003), respostas a diferentes mecanismos de defesa da planta (Kjemtrup *et al.*, 1998; Fontes *et al.*, 2004; Vanitharani *et al.*, 2004; Trinks *et al.*, 2005), interação com proteínas envolvidas na regulação do desenvolvimento celular (Latham *et al.*, 1997; Xie *et al.*, 1999), e modificações no padrão de expressão gênica do hospedeiro, principalmente no sentido de ativar genes envolvidos na síntese de DNA e

na divisão celular (Arguello-Astorga *et al.*, 2004; revisado por Hanley-Bowdoin *et al.*, 2004).

O sucesso da disseminação do vírus pela planta implica na infecção de novas células hospedeiras e constante replicação viral nessas células. O genoma dos geminivírus não codifica uma DNA polimerase, e diversos fatores acessórios codificados pelo hospedeiro são requeridos para replicação e movimento sistêmico do vírus (Gutierrez, 2000). Como os geminivírus infectam células vegetais diferenciadas, nas quais não ocorre mais divisão celular, o vírus deve ser capaz de ativar a transcrição dos genes do hospedeiro envolvidos no processo de síntese de enzimas e outros fatores necessários para a replicação de DNA. De fato, diversos trabalhos comprovaram que a proteína Rep dos geminivírus é responsável pela ativação da síntese de DNA em células totalmente diferenciadas. Essa ativação se dá pela indução do acúmulo de PCNA (“proliferating cell nuclear antigen”), uma proteína que esta associada à síntese de DNA em plantas (Nagar *et al.*, 1995; Palmer e Rybicki, 1998; Egelkrout *et al.*, 2001; Nagar *et al.*, 2002). Alguns membros da família *Geminiviridae* induzem não somente a expressão e acúmulo de PCNA, mas também interferem com a regulação do ciclo celular. A interação entre Rep e componentes reguladores do ciclo celular de plantas foi revisada por Gutierrez e Sommer (2004).

A outra proteína viral envolvida na replicação, Ren, interage com a proteína SINAC1, pertencente à família de fatores de transcrição que possuem domínio NAC (“no apical meristem, *Arabidopsis thaliana* factor, cup-shaped cotyledon”), o que também está correlacionando com aumento no acúmulo de DNA viral. Ren interage e induz a expressão de SINAC1, um ativador da transcrição de genes em plantas (Selth *et al.*, 2005).

As plantas possuem diferentes mecanismos de defesa em resposta a infecções virais. Algumas respostas, como aquelas mediadas por ácido salicílico ou silenciamento gênico, são objeto de intenso estudo (Baulcombe, 2004; Durrant e Dong, 2004). Em contrapartida, o papel de defesas mediadas por rotas metabólicas primárias tem recebido menor atenção. Os geminivírus interferem em diferentes respostas de defesa (Wang *et al.*, 2003; Fontes *et al.*, 2004; Vanitharani *et al.*, 2004; Trinks *et al.*, 2005), provavelmente como uma forma de maximizar a replicação viral em termos quantitativos (permitindo o acúmulo de maiores quantidades de partículas virais na célula infectada) e temporais (diminuindo o tempo necessário para o estabelecimento da infecção sistêmica). Algumas dessas interações já foram identificadas, embora os mecanismos moleculares ainda não tenham sido totalmente elucidados.

Utilizando-se o sistema duplo-híbrido de levedura foi possível demonstrar que a proteína Trap inativa uma proteína cinase, designada SNF1 (“sucrose non-fermenting 1”). Essa inativação leva a um aumento na suscetibilidade da planta, por ser a cinase SNF1 um regulador chave de respostas a estresses celulares que reduzem a disponibilidade de ATP (Hao *et al.*, 2003). Trap também interage e inativa outra cinase, ADK (“adenosine kinase”), responsável pela síntese de 5'-AMP a partir de adenosina e ATP (Wang *et al.*, 2003). As duas interações provavelmente estão interligadas, pois SNF1 é ativada por 5'-AMP. O fato de Trap interagir com SNF1 e ADK sugere que as respostas metabólicas mediadas por SNF1 são um componente importante da resposta de defesa a vírus, e que os geminivírus desenvolveram uma estratégia de contra-ataque baseada na inativação de dois componentes iniciais dessa via de defesa (SNF1 e ADK). Esses resultados demonstram ainda que genes responsáveis por processos metabólicos primários também podem participar de respostas de defesa a estresses bióticos.

O silenciamento de RNA engloba uma série de processos nucleares e citoplasmáticos envolvidos na regulação da expressão gênica em nível pós-transcricional, por meio da degradação seqüência-específica de mRNAs alvos (Baulcombe, 2004; Voinnet, 2005). O silenciamento de RNA constitui também um mecanismo eficiente de defesa de plantas contra vírus (Vance e Vaucheret, 2001). Proteínas virais com a capacidade de suprimir o silenciamento de RNA em diferentes pontos da via metabólica já foram identificadas em um grande número de vírus de plantas e mesmo em alguns vírus de animais (Roth *et al.*, 2004). No caso dos geminivírus, as proteínas Trap e AC4 já foram identificadas como supressoras de silenciamento (Voinnet *et al.*, 1999; Van Wezel *et al.*, 2001; Vanitharani *et al.*, 2004; Trinks *et al.*, 2005; revisado por Bisaro, 2006). O papel diferenciado de Trap e AC4 na supressão de silenciamento pode conferir características distintas ao desenvolvimento da doença causada por diferentes espécies de geminivírus (Vanitharani *et al.*, 2004). Embora o mecanismo de atuação dessas proteínas ainda não tenha sido elucidado, resultados recentes demonstram uma relação de causa e efeito entre a inativação da cinase ADK e a supressão de silenciamento, ambas mediadas por Trap (Wang *et al.*, 2005). Esses resultados sugerem que a atividade de ADK é necessária para o silenciamento, e que os geminivírus suprimem a resposta de defesa via inibição de ADK. De fato, a proteína Trap pode interagir com ela mesma, formando dímeros com localização nuclear, ou interagir com ADK, formando complexos Trap/ADK e suprimindo o silenciamento gênico local (Yang *et al.*, 2007).

Interações envolvendo as proteínas de movimento MP e NSP também já foram relatadas. McGarry *et al.* (2003) identificaram e caracterizaram funcionalmente uma acetiltransferase de *Arabidopsis*, denominada AtNSI, que interage diretamente com a proteína NSP do *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV). A proteína é altamente conservada

em plantas, possui localização nuclear, pode acetilar as histonas H2A e H3 *in vitro*, e também acetila a proteína capsidial viral, mas não a proteína NSP. Além disso, não atua como um coativador transcricional *in vitro*. Esta acetiltransferase regula o transporte núcleo-citoplasma do genoma viral e outros eventos nucleares não-transcricionais.

A interação de proteínas cinase do tipo serina/treonina, denominadas LeNIK (“*Lycopersicon esculentum* NSP-interacting kinase”) e GmNIK (“*Glycine max* NSP-interacting kinase”) com a proteína NSP foi demonstrada utilizando-se o sistema duplo-híbrido de levedura (Mariano *et al.*, 2004). Esta interação foi associada à hipótese do modelo guarda de resistência em plantas (Van Der Biezen e Jones, 1998), ou seja, NSP seria um fator de virulência que se liga às NIKs para que não ocorra a indução de uma resposta de resistência (Mariano *et al.*, 2004). A interação entre as proteínas NIK e NSP foi alvo de um estudo posterior com o objetivo de elucidar sua função no ciclo de infecção viral (Fontes *et al.*, 2004). Demonstrou-se que as NIKs são proteínas com propriedades de receptores que se localizam em membranas, e que a interação com NSP inibe essa atividade. Dessa forma, a interação entre NSP e NIK seria uma outra maneira de suprimir uma resposta de defesa da planta ao vírus.

Florentino *et al.* (2006) demonstraram que NSP também interage com outra serina/treonina cinase celular, NsAK (“NSP-associated kinase”). Entretanto, ao contrário de NIK, NsAK seria uma proteína que contribui com a infecção viral. De fato, a inibição da atividade de NsAK atenua o desenvolvimento dos sintomas.

2.5. Begomovírus em tomateiro no Brasil

Até a década de 80, danos causados por begomovírus nas Américas restringiam-se principalmente à produção de leguminosas, enquanto apenas alguns casos isolados e pouco significativos eram relatados em lavouras de tomateiro (Polston e Anderson,

1997). O primeiro relato de geminivírus em tomateiro no Brasil ocorreu na década de 1970 (Costa, 1975). O agente etiológico foi posteriormente caracterizado e denominado *Tomato golden mosaic virus* (TGMV). Além do TGMV, cinco outros vírus transmitidos por mosca-branca foram identificados, porém sem causar danos de importância econômica (Matyis *et al.*, 1975). Isso provavelmente ocorreu porque o biótipo A de *B. tabaci*, o único presente no Brasil na época, raramente coloniza o tomateiro (Bedford *et al.*, 1994).

Em 1992, no estado de São Paulo, constatou-se a presença do biótipo B de *B. tabaci*, provavelmente introduzido pela importação de plantas ornamentais da Europa ou dos EUA (Melo, 1992). Comparado ao biótipo A, o biótipo B apresenta maior grau de adaptação e dispersão, com uma gama de hospedeiros muito mais ampla, incluindo solanáceas como o tomateiro, e diversas espécies de plantas silvestres e/ou daninhas (Bedford *et al.*, 1994).

A presença do biótipo B no Distrito Federal foi confirmada em 1993, associada a sintomas de infecção por begomovírus em tomateiros para processamento industrial (Ribeiro *et al.*, 1994; França *et al.*, 1996). A partir de plantas com sintomas típicos, fragmentos de DNA correspondentes aos dois componentes genômicos dos begomovírus foram amplificados via PCR. A sequência de nucleotídeos desses fragmentos indicou tratar-se de nova espécie de begomovírus, distinta do TGMV e denominada *Tomato chlorotic vein virus* (TCIVV) (Bezerra *et al.*, 1996; Ribeiro *et al.*, 2003). Até o presente, a caracterização molecular do TCIVV ainda não foi completada.

Relatos adicionais de begomovírus em tomateiro foram feitos em São Paulo (Faria *et al.*, 1997), no Rio de Janeiro (Galvão *et al.*, 1998) e na região Nordeste, em amostras de tomateiro provenientes da Bahia (Ribeiro *et al.*, 1996) e de Pernambuco (Bezerra *et al.*, 1997). Em 1997 a doença foi relatada no submédio São Francisco, na

época a principal região produtora de tomate para processamento industrial no Brasil, acarretando perdas de até 100% em diversas áreas e levando ao abandono da tomaticultura intensiva na região (Bezerra *et al.*, 1997). Em todos esses casos, o aparecimento do vírus ocorreu logo após a introdução do biótipo B de *B. tabaci*.

Um begomovírus foi identificado em tomateiros em 1996 no Triângulo Mineiro, causando mosaico e deformação foliar (Rezende *et al.*, 1996; Zerbini *et al.*, 1996). O vírus foi caracterizado biologicamente e molecularmente (Fernandes *et al.*, 2006). A comparação da sequência completa de nucleotídeos do DNA-A e DNA-B com as de outros begomovírus comprovou tratar-se de uma nova espécie, denominada *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) (Ribeiro *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2006).

No mesmo ano, outro begomovírus foi isolado de amostras de tomateiro coletados na Zona Metalúrgica de Minas Gerais (Zerbini *et al.*, 1996). A análise das sequências demonstrou tratar-se de nova espécie, designada *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) (Andrade *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2003). Outros isolados do ToCMoV foram identificados na Bahia, Espírito Santo, Pernambuco e Rio de Janeiro (Ribeiro *et al.*, 2003). O isolado da Bahia foi caracterizado biologicamente e molecularmente (Ribeiro *et al.*, 2007).

Um terceiro isolado de begomovírus foi detectado em São João de Bicas, Minas Gerais, causando sintomas severos em tomateiro. O isolado, denominado MG-Bi2, foi caracterizado biologicamente e molecularmente, demonstrando tratar-se de uma nova espécie denominada *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) (Calegario *et al.*, 2007). A análise das sequências dos componentes genômicos do ToYSV indicou um relacionamento filogenético mais próximo com begomovírus isolados de *Sida* sp., como o *Sida mottle virus* (SiMoV), *Sida yellow mosaic virus* (SiYMV) e *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV) (Andrade *et al.*, 2006).

Possivelmente, o biótipo B de *B. tabaci* tem permitido que vírus nativos infectando plantas silvestres e daninhas cheguem ao tomateiro e se adaptem ao novo hospedeiro em um rápido processo evolutivo, culminando com o surgimento de novas espécies. Estudos realizados no México e nos EUA sugerem que esse processo de evolução e adaptação pode ocorrer em períodos de tempo da ordem de 5-10 anos (Hou e Gilbertson, 1996; Torres-Pacheco *et al.*, 1996).

Evidências de recombinação e pseudo-recombinação já foram encontradas em associação ao complexo de begomovírus infectando o tomateiro no Brasil. Galvao *et al.* (2003) e Ribeiro *et al.* (2007), sugeriram que os isolados MG-Bt1 e BA-Se1, respectivamente, do ToCMoV, possuem origem recombinante. A formação de pseudo-recombinantes viáveis entre o TGMV (DNA-A) e ToYSV (DNA-B), e entre o ToYSV (DNA-A) e o *Tomato crinkle leaf yellow virus* (ToCrLYV) (DNA-B), foi demonstrada em experimentos de inoculação com clones infecciosos (Andrade *et al.*, 2006). Além disso, foi sugerida a pseudo-recombinação entre o ToRMV e um novo vírus em condições naturais (planta infectada no campo) (Fernandes *et al.*, 2006).

Levantamentos realizados nos últimos cinco anos (Castillo-Urquiza *et al.*, 2007; Cotrim *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2008) indicam que determinadas espécies tornaram-se prevalentes em diferentes regiões do país. O seqüenciamento direto de fragmentos de PCR amplificados a partir de amostras de tomateiro coletadas na região central do estado de São Paulo nos anos de 2003 e 2004 indicou como espécie predominante o *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), presente em 50% das amostras analisadas. A presença do *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) e do SiMoV também foi detectada (Cotrim *et al.*, 2007). Também mediante o seqüenciamento de fragmentos de PCR obtidos de amostras de tomateiro, coletadas entre 2002 e 2004 no Distrito Federal e nos estados da Bahia, Goiás, Minas Gerais, Pernambuco e São Paulo,

verificou-se a presença do ToSRV em 61% das amostras, além do *Tomato golden vein virus* (TGVV), *Tomato mottle leaf curl virus*, ToYVSV e duas possíveis novas espécies (Fernandes *et al.*, 2008).

A análise de 106 genomas virais clonados a partir de amostras de tomateiro e plantas daninhas coletadas nos estados do Rio de Janeiro em 2005 e Minas Gerais em 2007 indicou a prevalência do ToYVSV e de uma nova espécie denominada *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV) (Castillo-Urquiza *et al.*, 2008). Além disso, mais cinco novas espécies foram identificadas, duas infectando tomateiro e três infectando as plantas daninhas *Sida rhombifolia* e *Blainvillea rhomboidea* (Castillo-Urquiza *et al.*, 2008).

Em conjunto, esses resultados indicam que novas espécies virais continuam a surgir em tomateiros, e que algumas dessas espécies, provavelmente melhor adaptadas ao novo hospedeiro, tendem a predominar em diferentes regiões geográficas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolados virais

Plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) e pimentão (*Capsicum annuum*) apresentando sintomas típicos de infecção viral foram coletadas nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, no ano de 2005. Discos foliares das plantas sintomáticas foram submetidos à extração de DNA (Dellaporta *et al.*, 1983) e o DNA foi utilizado como molde para a amplificação de fragmentos do genoma viral via PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos PAL1v1978 e PAR1c496, universais para o gênero *Begomovirus* (Rojas *et al.*, 1993). Os fragmentos amplificados foram clonados no vetor pGEM-T EASY (Promega), de acordo com as instruções do fabricante, e os clones obtidos foram seqüenciados para identificação viral. Com base nos resultados das comparações das seqüências, as amostras TP308 (pimentão) e C13a (tomateiro), coletadas em SP e RJ, respectivamente, foram selecionadas para clonagem dos genomas virais completos.

3.2. Clonagem e sequenciamento dos genomas virais

Os componentes genômicos presentes nas amostras TP308 e C13a foram amplificados utilizando-se a enzima DNA polimerase do bacteriófago phi29, do kit

TempliPhi (GE Healthcare), de acordo com o método descrito por Inoue-Nagata *et al.* (2004). Aliquotas das amplificações foram submetidas a clivagens com as enzimas de restrição *EcoR* I, *Kpn* I, *BamH* I e *Apa* I. Os produtos das reações foram analisados em gel de agarose 0,7% corado em brometo de etídeo. Aliquotas das reações de clivagem contendo fragmentos de 2600 nucleotídeos (nt), correspondentes a uma cópia de cada componente genômico, foram utilizadas para ligação no vetor pBluescript KS+ (Stratagene) previamente linearizado com a mesma enzima e defosforilado. O produto da reação de ligação foi utilizado para transformação de *Escherichia coli* estirpe DH5 α pelo método de choque térmico (Sambrook *et al.*, 2001). Colônias contendo os possíveis plasmídeos recombinantes foram repicadas para meio LB líquido e incubadas a 37°C durante 12 horas. Após a incubação, as culturas foram submetidas à minipreparação de DNA plasmidial pelo método de lise alcalina (Sambrook *et al.*, 2001) e o DNA resultante foi analisado em gel de agarose 0,7% corado em brometo de etídeo. Amostras de DNA plasmidial cujo comprimento era de aproximadamente 5500 nt, correspondente ao vetor plasmidial ligado ao genoma viral, foram submetidas à clivagem com a mesma enzima utilizada para a clonagem, e o padrão eletroforético foi analisado em gel de agarose 0,7%. Amostras em que o fragmento de 2600 nt foi verificado foram completamente seqüenciadas pela MacroGen, Inc. (Seul, Coréia do Sul).

3.3. Caracterização molecular

As seqüências correspondentes ao DNA-A e DNA-B dos isolados ToYVSV-[BR:Pda30:05] e ToSRV-[BR:Pir1:05] foram analisados a fim de identificar as ORFs presentes no genoma viral, utilizando-se o programa ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>). As seqüências de aminoácidos deduzidas de cada proteína foram comparadas com as das demais espécies de begomovírus

utilizando-se o algoritmo BLASTp (Altschul *et al.*, 1990), e as seqüências de nucleotídeos foram comparadas utilizando-se o algoritmo BLASTn. Com base nas seqüências de nucleotídeos, alinhamentos múltiplos foram obtidos com o programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), e árvores filogenéticas foram obtidas utilizando-se o programa MEGA 4.0 (Kumar *et al.*, 2004). Os alinhamentos e as árvores filogenéticas incluíram todas as espécies de begomovírus já relatadas nas Américas, além de espécies representativas de cada clado presente no “Velho Mundo”.

3.4. Construção de clones infecciosos

As seqüências de nucleotídeos completas de cada componente genômico foram submetidas a análise de restrição utilizando-se o programa DNAMAN versão 6 (Lynnon Corporation). Enzimas que clivaram o DNA viral liberando um fragmento contendo a região comum foram escolhidas, e o produto de clivagem foi clonado no vetor pBluescript KS+ (Stratagene), resultando na construção “meia-cópia”. Os fragmentos correspondentes à cópia completa de cada componente do genoma viral foram inseridos nos respectivos clones “meia-cópia”, gerando construções correspondentes a 1,5 cópias do genoma, contendo duas origens de replicação na mesma orientação.

A infectividade dos clones foi comprovada por meio de inoculação via biobalística (Aragão *et al.*, 1996) em plantas de tomateiro e *Nicotiana benthamiana*. A infecção viral foi comprovada por meio de amplificação de fragmentos do genoma viral via PCR.

3.5. Determinação da gama de hospedeiros

Os clones infecciosos foram inoculados via biobalística em plantas das famílias *Solanaceae* (*Nicotiana rustica*, *N. clevelandii*, *N. debneyi*, *N. glutinosa*, *N. tabacum*

‘Xanthi’, ‘TNN’, ‘Havana’ e ‘White burley’, *Solanum lycopersicum* ‘Santa Clara’ e ‘Rutgers’, *Capsicum annuum* ‘Casca Dura Ikeda’ e *Datura stramonium*), *Fabaceae* (*Glycyne max* ‘Tucunaré’, *Phaseolus vulgaris* ‘Pérola’, *P. vulgaris* ‘Ouro Negro’, e *Vigna unguiculata* ‘Pitiúba’), *Cucurbitaceae* (*Cucurbita pepo* ‘Caserta’) e *Amaranthaceae* (*Chenopodium quinoa* e *Gomphrena globosa*). As plantas inoculadas foram analisadas visualmente para a presença de sintomas, e a infecção viral foi confirmada via hibridização molecular “dot blot” e também via PCR, 21 dias após a inoculação.

Para a confirmação da infecção viral via hibridização utilizou-se o kit DIG DNA Labeling and Detection (Roche), de acordo com as instruções do fabricante. Os clones pVIR096 (ToSRV-[BR:Pir1:05], DNA-A) e pVIR098 (ToYVSV-[BR:Pda30:05], DNA-A) foram marcados com digoxigenina e utilizados como sondas. O DNA total foi extraído das plantas inoculadas (Dellaporta *et al.*, 1983) e aplicado diretamente sobre membrana de náilon (Hybond-N+). A hibridização foi realizada a 50°C por 16 horas, seguida de duas lavagens à temperatura ambiente em SSC 0,5x e SDS 0,1% por 5 minutos cada, e duas lavagens a 50°C em SSC 0,1x e SDS 0,1% por 15 minutos cada.

A confirmação via PCR foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos universais para o gênero *Begomovirus*, PAL1v1978 e PAR1c496 (Rojas *et al.*, 1993). A reação foi realizada em um volume de 25 µl, contendo 2,5 µl de tampão (Tris-HCl 100mM, pH 8,3 e KCl 500 mM), 2,5 µl de MgCl₂ 2,5 mM, 2,0 µl da mistura de dNTPs a 0,2 mM, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo, e uma unidade de *Taq* DNA polimerase, completando-se o volume com água. A reação consistiu em 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, seguido de uma extensão final a 72°C por 10 minutos. O produto amplificado foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose 0,7% .

4. RESULTADOS

4.1 Clonagem e seqüenciamento dos genomas virais

4.1.1. Amplificação dos genomas virais

O DNA-A do isolado ToYVSV-[BR:Pda30:05] (Castillo-Urquiza, 2008), presente na amostra C13a (coletada em Paty do Alferes, RJ, em maio de 2005) foi previamente amplificado via DNA polimerase do bacteriófago phi29 e clonado em vetor plasmidial pBluescript KS+. O clone genômico foi utilizado para a caracterização molecular e construção do clone infeccioso correspondente. Os demais componentes genômicos presentes nas amostras C13a e TP308 (coletada em Piraju, SP, em julho de 2005), foram amplificados utilizando-se a mesma enzima. Um fragmento de comprimento superior a 12000 nt, correspondente ao multímero linear contendo várias unidades do genoma viral, foi observado para cada reação (dados não mostrados).

Alíquotas da reação de amplificação obtida a partir da amostra TP308 foram submetidas a clivagem com as enzimas *Bam*H I, *Eco*R I, *Hind* III, *Pst* I e *Kpn* I, e a reação de amplificação obtida a partir da amostra C13a foi submetida à clivagem com a enzima *Apa* I (Figura 2). Fragmentos de 2600 nt, correspondentes a uma cópia dos

componentes genômicos virais, foram observados para todas as reações de clivagem (Figura 2).

Para a clonagem dos componentes genômicos virais a partir da amostra TP308 foram escolhidas as enzimas *EcoR* I e *Kpn* I, e para a clonagem do DNA-B do isolado ToYVSV-[BR:Pda30:05], presente na amostra C13a, foi utilizada a enzima *Apa* I.

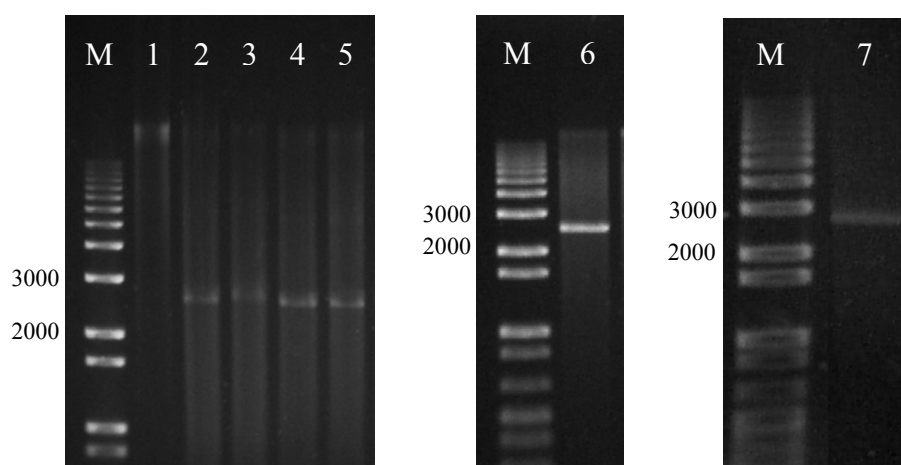


Figura 2. Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) da clivagem dos amplicons obtidos a partir de DNA total das amostras TP308 e C13a. **M**, marcador de comprimento (“1 kb plus DNA ladder”, em nt); **1**, amplicon não submetido a clivagem; **2-6**, clivagem do amplicon obtido a partir de DNA total da amostra TP308 com as enzimas *BamH* I, *EcoR* I, *Hind* III, *Pst* I, e *Kpn* I, respectivamente; **7**, clivagem do amplicon do isolado BR:Pda30:05 com a enzima *Apa* I.

4.1.2. Clonagem dos fragmentos correspondentes a uma cópia do genoma viral

Os fragmentos de 2600 nt correspondentes a uma cópia de cada componente genômico foram utilizadas para ligação no vetor pKS+ previamente linearizado com a mesma enzima e defosforilado. O produto da reação de ligação foi utilizado para transformação de *E. coli* DH5 α e as colônias contendo os plasmídeos recombinantes foram submetidas à minipreparação de DNA plasmidial. Plasmídeos com comprimento de aproximadamente 5500 nt foram observados em todos os casos (Figura 3).

4.1.3. Confirmação da clonagem dos componentes genômicos

Amostras de DNA plasmidial com comprimento de aproximadamente 5500 nucleotídeos, correspondente ao vetor plasmidial contendo o componente genômico, foram submetidas à clivagem com a mesma enzima utilizada para a clonagem. O fragmento de 2600 nucleotídeos, correspondente ao comprimento dos componentes genômicos virais, foi observado em 24 amostras de DNA plasmidial obtidas a partir da amostra TP308 (Figura 4). Da mesma forma, a presença do fragmento de 2600 nucleotídeos foi confirmada em todas as amostras de DNA plasmidial obtidas a partir da amostra C13a (Figura 4). Os clones denominados pVIR088, pVIR089 e pVIR091, correspondentes às amostras 6, 21 e 39, respectivamente (Figura 4), foram selecionados para o sequenciamento.

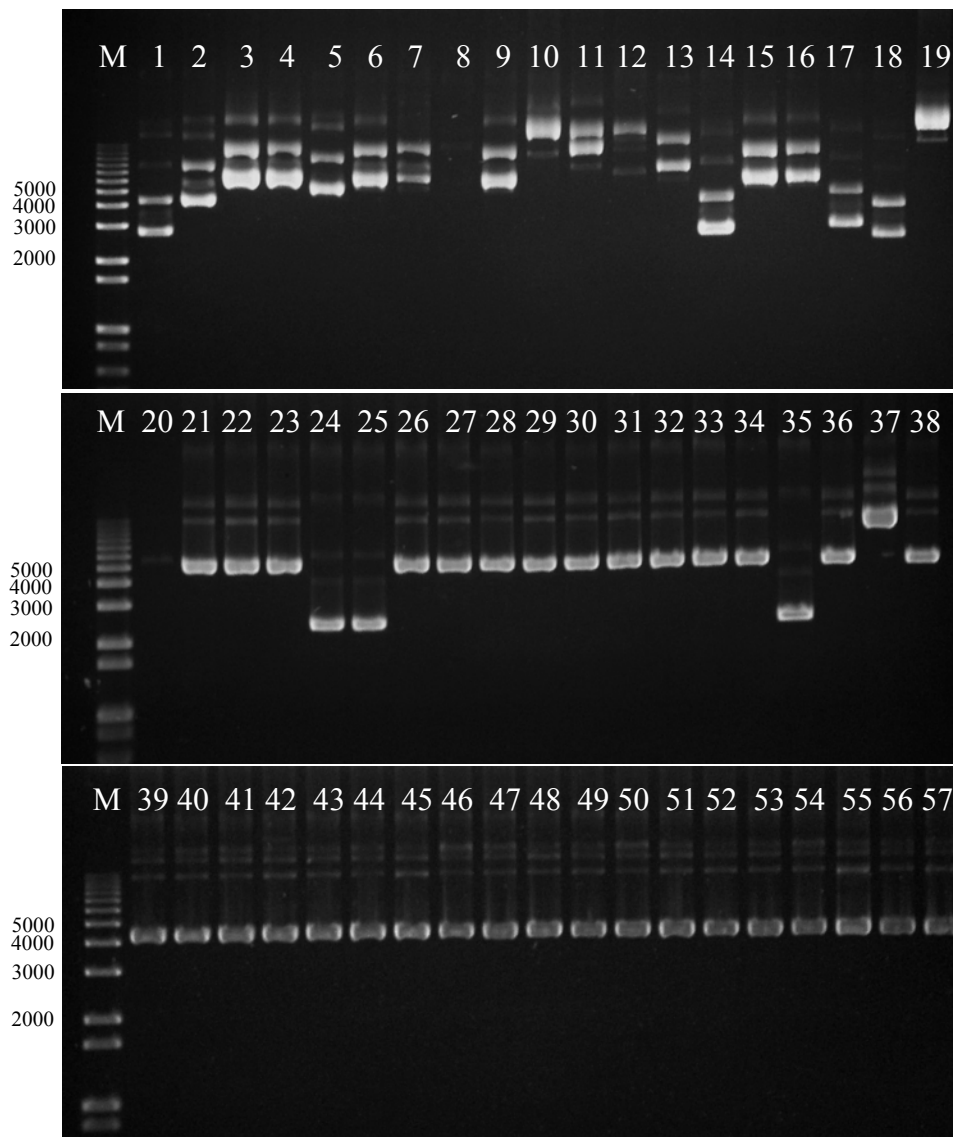


Figura 3. Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) das minipreparações de DNA plasmidial obtidas a partir de colônias contendo possíveis plasmídeos recombinantes. **M**, marcador de comprimento (“1 kb plus DNA ladder”, em nt); **1-19**, plasmídeos obtidos a partir da clonagem dos fragmentos de 2600 nt provenientes da clivagem de amplicons da amostra TP308 com a enzima *EcoR* I; **20-38**, plasmídeos obtidos a partir da clonagem dos fragmentos de 2600 nt provenientes da clivagem de amplicons da amostra TP308 com a enzima *Kpn* I; **39-57**, plasmídeos obtidos a partir da clonagem dos fragmentos de 2600 nt provenientes da clivagem de amplicons do isolado BR:Pda30:05 presente na amostra C13a com a enzima *Apa* I.

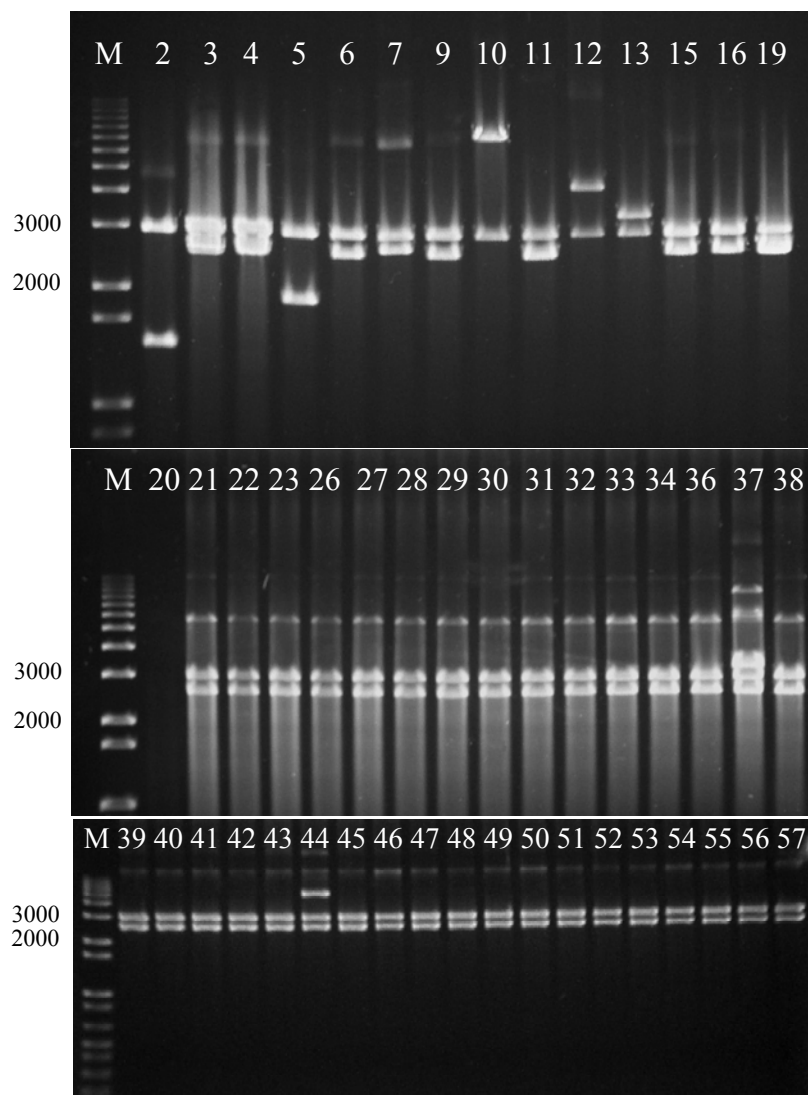


Figura 4. Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) da clivagem de DNA plasmidial proveniente da clonagem dos componentes genômicos presentes nas amostras TP308 e C13a. **M**, marcador de comprimento (“1 kb plus DNA ladder”, em nt); **2-19**, clivagem com a enzima *EcoR* I de DNA plasmidial obtido a partir da clonagem dos componentes genômicos presentes na amostra TP308; **20-38**, clivagem com a enzima *Kpn* I de DNA plasmidial obtido a partir da clonagem dos componentes genômicos presentes na amostra TP308; **39-57**, clivagem com a enzima *Apa* I de DNA plasmidial obtido a partir da clonagem dos componentes genômicos do isolado BR:Pda30:05 presente na amostra C13a.

4.2. Caracterização molecular

4.2.1 Análise das seqüências dos componentes genômicos virais dos clones pVIR088, pVIR089 e pVIR091

A análise das seqüências dos clones pVIR088 e pVIR089 indicou tratarem-se de componentes genômicos correspondentes ao DNA-A e DNA-B, respectivamente, de begomovírus. No DNA-A foram identificadas as ORFs *cp* (251 aa), *rep* (352 aa), *ren* (132 aa) e *trap* (129 aa). No DNA-B foram identificadas as ORFs *nsp* (294 aa) e *mp* (293 aa). A comparação das seqüências de nucleotídeos da região comum dos dois componentes indicou identidade de 95%, comprovando tratarem-se de DNA-A e DNA-B cognatos. O isolado viral correspondente foi denominado BR:Pir1:05.

A análise da seqüência do clone pVIR091 indicou tratar-se de um componente genômico correspondente ao DNA-B de begomovírus, identificando-se as ORFs *nsp* (256 aa) e *mp* (293 aa). A comparação das seqüências de nucleotídeos da região comum desse componente com o DNA-A do isolado BR:Pda30:05 (Castillo-Urquiza, 2008) indicou identidade de 91%, comprovando tratarem-se de DNA-A e DNA-B cognatos.

As seqüências de nucleotídeos do DNA-A e DNA-B completos, e as seqüências de nucleotídeos e aminoácidos de todas as ORFs dos dois isolados foram comparadas com outros begomovírus das Américas e do “Velho Mundo” (Tabelas 1 a 9). A comparação da seqüência de nucleotídeos do DNA-A do isolado BR:Pir1:05 indicou identidades de 96 e 98% com os isolados BR:Ub2:00 e BR:PG1:Pep:03 da espécie *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), respectivamente. Portanto, de acordo com os critérios de taxonomia definidos pelo Grupo de Estudos de *Geminiviridae* do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) (Fauquet *et al.*, 2008), o isolado BR:Pir1:05 pertence a essa espécie. A comparação da seqüência de nucleotídeos do DNA-A do isolado BR:Pda30:05 indicou identidade de 95 e 89% com os isolados G22

e Ba3 da espécie *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV), respectivamente. Portanto, o isolado BR:Pda30:05 pertence a essa espécie.

Árvores filogenéticas foram construídas com base nas seqüências de nucleotídeos do DNA-A e do DNA-B de begomovírus, incluindo-se os isolados BR:Pir1:05 e BR:Pda30:05 (Figuras 5 e 6). Na árvore baseada na seqüência do DNA-A, os isolados BR:Pir1:05 e BR:Pda30:05 se agruparam em um mesmo ramo com outros begomovírus que infectam tomateiro no Brasil (Figura 5). Na árvore baseada na seqüência do DNA-B, os dois componentes se agruparam em ramos diferentes, mas foram altamente relacionados com outros begomovírus que infectam tomateiro no Brasil (Figura 6). Em ambas as árvores, o isolado BR:Pir1:05 agrupou-se em um ramo monofilético, com 100% de valor “bootstrap”, contendo os dois isolados de ToSRV. Da mesma forma, em ambas as árvores, o isolado BR:Pda30:05 agrupou-se em um ramo monofilético, com 100% do valor de “bootstrap”, contendo os outros dois isolados de ToYVSV.

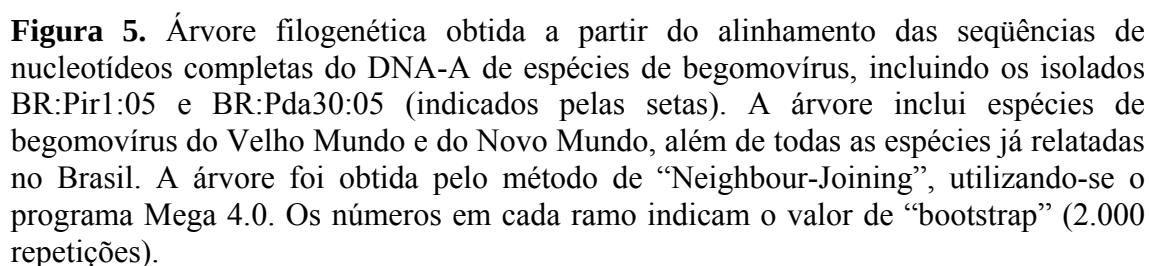
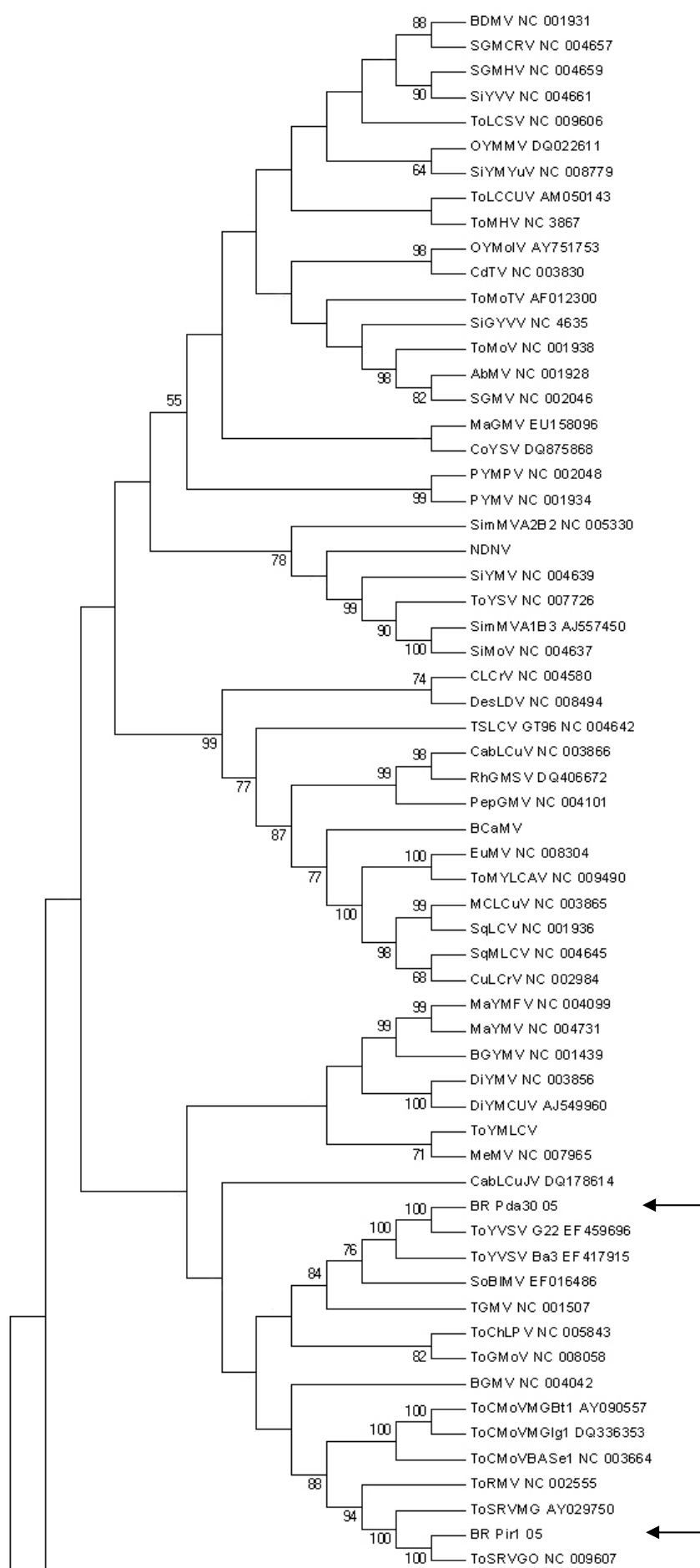


Figura 5 (cont.)



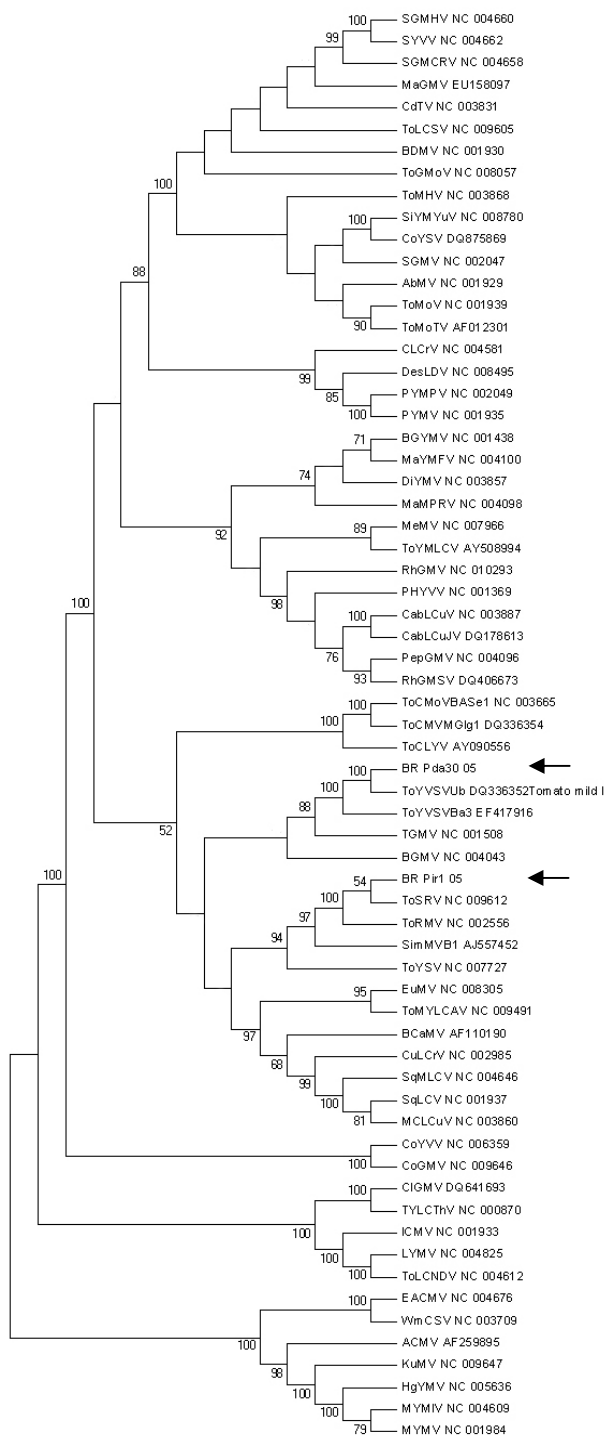


Figura 6. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento das seqüências de nucleotídeos completas do DNA-B de espécies de begomovírus, incluindo os isolados BR:Pir1:05 e BR:Pda30:05 (indicados pelas setas). A árvore inclui espécies de begomovírus do Velho Mundo e do Novo Mundo, além de todas as espécies já relatadas no Brasil. A árvore foi obtida pelo método de “Neighbour-Joining”, utilizando-se o programa Mega 4.0. Os números em cada ramo indicam o valor de “bootstrap” (2.000 repetições).

Tabela 1. Espécies de begomovírus utilizadas para as comparações de seqüências

Espécie - isolado ¹	Sigla	N° de acesso no GenBank	
		DNA-A	DNA-B
<i>Abutilon mosaic virus</i> - [USA:Hawaii]	AbMV- [US:Haw]	NC_001928	NC_001929
<i>African cassava mosaic virus</i> - [Kenya:844:1982]	ACMV- [KE:844:82]	NC_001467	NC_001468
<i>Bean golden mosaic virus</i> - [Brazil:Campinas1:1978]	BGMV- [BR:Cam1:78]	NC_004042	NC_004043
<i>Bean golden yellow mosaic virus</i> - [Puerto Rico]	BGYMV-[PR]	NC_001438	NC_001439
<i>Sida golden mosaic virus</i> - [USA:Florida]	SGMV - [US:Flo]	NC_002046	NC_002047
<i>Sida micrantha mosaic virus</i> - [Brazil:A2B2]	SimMV - [BR:A2B2]	NC_005330	NC_005331
<i>Squash leaf curl virus</i> - (USA:Imperial Valley:1979]	SqLCV - [US:Imp:79]	NC_001936	NC_001937
<i>Tomato golden mosaic virus</i> - [Brazil:Common:1984]	TGMV - [BR:com:84]	NC_001507	NC_001508
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i> - [Brasil:Seabra1:1996]	ToCMoV- [BR:Se1:96]	NC_003664	NC_003665
Tomato mild leaf curl virus	ToMLCV	n.d. ²	DQ336352
<i>Tomato mottle virus</i> - [USA:Florida:1989]	ToMoV - [US:Flo:89]	NC_001938	NC_001939
<i>Tomato rugose mosaic virus</i> - [Brazil:Uberlandia 1:1996]	ToRMV - [BR:Ub1:96]	NC_002555	NC_002556
<i>Tomato severe rugose virus</i> - [Brazil:Uberlandia 2:2000]	ToSRV- [Br:Ub2:00]	AY029750	n.d.
<i>Tomato severe rugose virus</i> - [Brazil:Petrolina de Goias1:Pepper:2003]	ToSRV- [BR:PG1:Pep:03]	NC_009607	NC_009612
<i>Tomato yellow spot virus</i> - [Brazil:Bicas2:1999]	ToYSV- [BR:Bi2:99]	NC_007726	NC_007727
<i>Tomato yellow vein streak virus</i> - [Ba3]	ToYVSV-[Ba3]	NC_010949	NC_010950
<i>Tomato yellow vein streak virus</i> - [G22]	ToYVSV-[G22]	EF459696	n.d.
<i>Watermelon chlorotic stunt virus</i> - [Yemen]	WmCSV-[YE]	NC_003708	NC_003709

¹Denominação dos isolados de acordo com Fauquet *et al.* (2008)²n.d.: não disponível

Tabela 2. Porcentagem de identidade entre as seqüências de nucleotídeos completas do DNA-A dos isolados BR:Pir1:05 e BR:Pda30:05 e de outras espécies de begomovírus.

	BR:Pda30:05	BR:Pir1:05	AbMV	ACMV	BGMV	BGYMV	SGMV	SimMV	SqLCV	TGMV	ToCMoV	ToMoV	ToRMV	ToSRV- [BR:Ub2:00]	ToSRV- [BR:PG1: Pep03]	ToYSV	ToYVSV- [Ba3]	ToYVSV- [G22]	WmCSV
BR:Pda30:05	--	76	74	55	75	74	74	74	68	78	77	76	75	76	76	75	89	95	58
BR:Pir1:05		--	76	55	78	74	76	78	69	81	78	77	86	96	98	78	77	76	55
AbMV			--	55	75	76	89	77	69	73	76	85	77	77	76	77	74	74	55
ACMV				--	55	55	55	54	53	56	56	56	55	56	55	54	56	56	67
BGMV					--	75	74	75	71	71	77	73	80	79	78	76	74	75	57
BGYMV						--	75	70	67	71	75	74	73	74	73	73	74	74	54
SGMV							--	76	69	72	75	88	75	77	76	77	75	75	54
SimMV								--	67	76	74	72	78	79	78	81	74	74	56
SqLCV									--	69	70	69	70	69	70	69	68	68	53
TGMV										--	75	74	78	80	79	76	79	78	55
ToCMoV											--	76	85	78	78	75	77	76	55
ToMoV												--	76	77	77	76	75	75	55
ToRMV													--	87	97	77	74	75	55
ToSRV- [BR:Ub2:00]														--	100	78	77	76	55
ToSRV- [BR:PG1:Pep:03]															--	78	77	76	55
ToYSV																--	74	75	53
ToYVSV-[Ba3]																	--	89	55
ToYVSV-[G22]																		--	55
WmCSV																			--

Tabela 3. Porcentagem de identidade entre as seqüências de nucleotídeos completas do DNA-B dos isolados BR:Pir1:05 e BR:Pda30:05 e de outras espécies de begomovírus.

	BR:Pda30:05	BR:PIR1:05	AbMV	ACMV	BGMV	BGYMV	SGMV	SimMV	SqLCV	TGMV	ToCMoV	ToMLCV	ToMoV	ToRMV	ToSRV- [BR:PG1: Pep:03]	ToYSV	ToYVSV- [Ba3]	WmCSV
BR:Pda30:05	--	70	49	14	64	49	49	59	52	55	62	92	49	69	69	58	82	9
BR:PIR1:05		--	50	10	61	49	52	73	48	62	59	70	56	98	97	68	70	11
AbMV			--	9	48	59	75	50	46	59	48	48	77	50	50	48	47	10
ACMV				--	14	14	9	10	12	9	9	14	10	10	10	12	8	32
BGMV					--	60	58	57	45	64	62	62	50	61	61	59	69	14
BGYMV						--	59	47	45	50	48	50	62	49	49	46	55	11
SGMV							--	50	46	49	58	49	73	52	52	51	58	11
SimMV								--	46	59	56	67	50	71	71	71	57	13
SqLCV									--	49	47	51	46	48	48	46	49	13
TGMV										--	49	55	59	62	63	52	57	10
ToCMoV											--	67	60	58	60	58	61	10
ToMLCV												--	48	69	68	59	82	9
ToMoV													--	56	56	51	50	10
ToRMV														--	98	68	69	11
ToSRV- [BR:PG1:Pep:03]															--	68	69	11
ToYSV																--	67	13
ToYVSV-[Ba3]																	--	8
WmCSV																		--

Tabela 4. Porcentagem de identidade entre as seqüências de nucleotídeos da ORF *cp* (valores acima da diagonal) e as seqüências de aminoácidos da proteína capsidial (valores abaixo da diagonal) dos isolados BR:Pir1:05 e BR:Pda30:05 e de outras espécies de begomovírus.

	BR:Pda30:05	BR:PIR1:05	AbMV	ACMV	BGMV	BGYMV	SGMV	SimMV	SqLCV	TGMV	ToCMoV	ToMoV	ToRMV	ToSRV- [BR:Ub2:00]	ToSRV- [BR:PG1: Pep03]	ToYSV	ToYVSV- [Ba3]	ToYVSV- [G22]	WmCSV
BR:Pda30:05	--	81	79	61	82	82	80	81	82	84	82	79	81	82	81	80	91	96	60
BR:PIR1:05	88	--	80	60	81	79	82	82	83	85	81	81	81	97	99	92	93	92	60
AbMV	87	86	--	58	80	77	91	83	80	80	82	87	83	81	80	85	80	79	60
ACMV	67	68	64	--	60	60	60	60	60	61	62	59	59	61	60	58	61	61	75
BGMV	89	93	89	66	--	83	80	81	81	80	83	80	82	82	81	81	81	81	60
BGYMV	92	87	85	68	88	--	79	80	82	81	80	78	81	80	79	80	81	81	61
SGMV	89	88	94	65	90	88	--	85	80	83	83	89	84	82	82	85	81	81	61
SimMV	91	91	90	66	93	90	92	--	82	84	83	83	83	83	82	87	82	81	60
SqLCV	92	90	87	66	91	91	89	92	--	85	79	81	79	84	83	82	83	83	60
TGMV	94	90	87	66	91	91	89	90	92	--	82	82	81	86	85	83	85	84	62
ToCMoV	87	90	87	68	92	89	90	90	90	88	--	82	92	82	82	82	81	81	62
ToMoV	88	88	92	64	90	86	93	90	89	87	89	--	84	81	81	83	79	80	61
ToRMV	87	89	87	68	91	88	90	90	89	88	99	89	--	81	81	82	82	81	61
ToSRV- [BR:Ub2:00]	89	97	87	65	94	88	89	91	91	91	90	89	89	--	98	83	84	83	61
ToSRV- [BR:PG1:Pep:03]	89	99	87	68	93	87	89	91	90	90	90	88	90	98	--	82	83	83	60
ToYSV	89	90	89	65	92	88	90	95	90	89	90	89	90	90	90	--	82	81	60
ToYVSV-[Ba3]	98	87	87	67	89	91	88	91	93	93	87	87	87	89	88	89	--	92	61
ToYVSV-[G22]	96	88	86	66	89	92	88	90	92	93	88	87	88	88	89	90	96	--	60
WmCSV	67	66	64	78	67	66	66	66	66	68	68	64	68	66	66	66	67	67	--

Tabela 5. Porcentagem de identidade entre as seqüências de nucleotídeos da ORF *trap* (valores acima da diagonal) e as seqüências de aminoácidos da proteína Trap (valores abaixo da diagonal) dos isolados BR:Pir1:05 e BR:Pda30:05 e de outras espécies de begomovírus.

	BR:Pda30:05	BR:PIR1:05	AbMV	ACMV	BGMV	BGYMV	SGMV	SimMV	SqLCV	TGMV	ToCMoV	ToMoV	ToRMV	ToSRV- [BR:Ub2:00]	ToSRV- [BR:PG1: Pep03]	ToYSV	ToYVSV- [Ba3]	ToYVSV- [G22]	WmCSV
BR:Pda30:05	--	77	74	62	77	75	75	78	75	82	77	73	77	77	78	80	90	95	64
BR:PIR1:05	63	--	78	57	82	74	77	78	75	81	83	78	83	97	98	80	76	76	64
AbMV	62	68	--	64	76	75	93	79	74	78	77	90	78	78	79	76	75	76	65
ACMV	42	46	47	--	61	61	64	61	60	61	58	63	61	57	58	58	58	61	73
BGMV	70	74	68	50	--	77	74	81	75	78	84	76	85	82	82	79	78	77	62
BGYMV	62	62	66	42	67	--	75	71	82	77	74	73	74	73	74	73	76	74	62
SGMV	63	65	91	46	67	68	--	79	74	78	76	91	77	77	78	75	76	74	63
SimMV	68	71	72	45	73	58	71	--	75	77	82	78	82	78	79	82	78	78	61
SqLCV	63	63	65	44	68	71	65	63	--	79	76	71	76	75	76	75	76	74	60
TGMV	75	72	71	46	70	66	71	68	68	--	79	75	79	81	81	78	83	81	63
ToCMoV	66	75	67	51	76	67	68	72	68	70	--	77	95	82	83	78	78	75	62
ToMoV	59	67	84	48	67	63	86	71	63	65	69	--	76	78	79	75	75	74	64
ToRMV	69	78	70	50	80	68	68	72	67	73	91	68	--	83	83	78	79	76	62
ToSRV- [BR:Ub2:00]	64	96	68	46	73	62	66	70	63	72	75	67	78	--	97	80	76	76	63
ToSRV- [BR:PG1:Pep:03]	64	97	68	46	72	62	66	71	64	71	74	67	77	96	--	80	76	76	64
ToYSV	72	71	65	42	74	65	65	76	60	69	68	63	71	71	71	--	78	77	63
ToYVSV-[Ba3]	87	62	62	46	70	61	64	68	62	76	67	61	70	63	62	68	--	90	65
ToYVSV-[G22]	93	63	60	38	68	61	61	65	63	73	65	59	68	64	64	68	86	--	64
WmCSV	48	44	51	60	48	42	48	46	42	46	44	48	44	44	44	49	49	49	--

Tabela 6. Porcentagem de identidade entre as seqüências de nucleotídeos da ORF *ren* (valores acima da diagonal) e as seqüências de aminoácidos da proteína Ren (valores abaixo da diagonal) dos isolados BR:Pir1:05 e BR:Pda30:05 e de outras espécies de begomovírus.

	BR:Pda30:05	BR:PIR1:05	AbMV	ACMV	BGMV	BGYMV	SGMV	SimMV	SqLCV	TGMV	ToCMoV	ToMoV	ToRMV	ToSRV- [BR:Ub2:00]	ToSRV- [BR:PG1: Pep03]	ToYSV	ToYVSV- [Ba3]	ToYVSV- [G22]	WmCSV
BR:Pda30:05	--	84	80	66	81	77	79	79	76	83	82	80	82	83	84	81	91	93	65
BR:PIR1:05	79	--	83	66	83	79	82	80	77	84	85	83	86	97	99	84	84	82	64
AbMV	78	78	--	68	79	77	92	82	78	82	81	89	82	83	83	82	80	79	68
ACMV	48	52	50	--	66	65	66	68	62	56	70	68	69	66	66	66	66	65	72
BGMV	77	82	74	46	--	81	78	81	78	80	83	79	84	83	83	81	82	82	64
BGYMV	76	78	77	50	77	--	76	76	82	79	77	76	77	78	79	78	77	77	63
SGMV	78	81	90	49	76	75	--	82	76	82	80	90	80	81	82	82	80	77	66
SimMV	75	77	80	47	81	75	81	--	75	78	82	80	82	80	80	84	80	78	67
SqLCV	74	72	75	45	75	79	75	73	--	79	77	75	78	77	77	77	77	75	65
TGMV	80	80	80	47	78	77	81	74	75	--	82	81	81	84	83	81	83	82	65
ToCMoV	78	82	79	46	81	72	79	81	72	78	--	81	94	84	85	82	82	80	63
ToMoV	78	81	88	51	74	77	87	79	71	78	80	--	81	82	83	82	79	79	66
ToRMV	75	81	78	47	80	70	78	80	73	77	94	78	--	85	85	82	82	81	64
ToSRV- [BR:Ub2:00]	78	95	77	50	83	77	78	75	72	78	81	79	79	--	98	83	83	82	64
ToSRV- [BR:PG1:Pep:03]	80	98	78	52	83	78	81	77	72	80	82	81	81	96	--	84	84	82	64
ToYSV	78	82	77	49	78	75	79	76	77	81	78	77	78	81	82	--	80	79	66
ToYVSV-[Ba3]	88	82	76	47	81	78	78	77	74	83	80	78	79	80	81	78	--	91	66
ToYVSV-[G22]	90	77	76	48	77	75	75	75	72	79	75	74	74	75	78	75	87	--	65
WmCSV	54	53	53	69	50	52	54	51	49	52	52	53	51	52	53	50	55	53	--

Tabela 7. Porcentagem de identidade entre as seqüências de nucleotídeos da ORF *rep* (valores acima da diagonal) e as seqüências de aminoácidos da proteína Rep (valores abaixo da diagonal) dos isolados BR:Pir1:05 e BR:Pda30:05 e de outras espécies de begomovírus.

	BR:Pda30:05	BR:PIR1:05	AbMV	ACMV	BGMV	BGYMV	SGMV	SimMV	SqLCV	TGMV	ToCMoV	ToMoV	ToRMV	ToSRV- [BR:Ub2:00]	ToSRV- [BR:PG1: Pep03]	ToYSV	ToYVSV- [Ba3]	ToYVSV- [G22]	WmCSV
BR:Pda30:05	--	73	74	63	72	72	73	73	58	76	78	73	73	73	73	74	88	95	61
BR:PIR1:05	73	--	73	63	79	72	74	80	65	81	76	75	95	96	99	79	73	73	61
AbMV	75	76	--	65	74	77	91	76	65	73	74	87	73	74	73	77	73	75	65
ACMV	57	63	64	--	65	63	66	64	60	64	63	66	64	64	64	63	61	63	73
BGMV	70	79	73	61	--	71	72	74	61	74	73	74	79	78	78	75	71	72	62
BGYMV	72	73	80	63	72	--	77	70	65	72	74	77	73	73	72	74	73	73	63
SGMV	73	76	92	63	71	79	--	76	64	74	74	89	73	74	74	76	72	73	64
SimMV	72	80	78	61	78	72	78	--	64	77	72	73	80	80	80	79	73	73	62
SqLCV	59	59	61	52	61	61	59	59	--	69	66	63	66	66	66	67	64	66	60
TGMV	74	82	74	62	76	71	75	78	60	--	75	72	81	81	80	79	76	77	60
ToCMoV	78	76	77	63	72	76	77	72	62	73	--	75	77	75	76	76	79	77	62
ToMoV	72	76	89	64	73	79	90	75	59	75	79	--	73	75	75	76	73	72	62
ToRMV	72	93	75	63	78	73	75	79	60	82	79	75	--	95	95	79	73	73	61
ToSRV- [BR:Ub2:00]	72	96	74	62	76	72	74	78	57	81	74	75	92	--	96	79	74	74	60
ToSRV- [BR:PG1:Pep:03]	73	99	76	63	79	72	76	80	59	82	75	76	93	96	--	79	74	73	63
ToYSV	73	91	78	62	76	75	76	82	61	80	73	75	80	79	81	--	75	76	59
ToYVSV-[Ba3]	89	73	76	57	70	74	75	72	59	75	79	75	73	72	73	74	--	88	63
ToYVSV-[G22]	95	73	75	58	71	73	74	73	59	75	78	73	72	71	73	73	90	--	61
WmCSV	56	60	62	74	58	60	61	59	54	61	60	61	60	60	60	61	56	57	--

Tabela 8. Porcentagem de identidade entre as seqüências de nucleotídeos da ORF *mp* (valores acima da diagonal) e as seqüências de aminoácidos da proteína MP (valores abaixo da diagonal) dos isolados BR:Pir1:05 e BR:Pda30:05 e de outras espécies de begomovírus.

	BR:Pda30:05	BR:PIR1:05	AbMV	ACMV	BGMV	BGYMV	SGMV	SimMV	SqLCV	TGMV	ToCMoV	ToMLCV	ToMoV	ToRMV	ToSRV- [BR:PG1: Pep:03]	ToYSV	ToYVSV- [Ba3]	WmCSV
BR:Pda30:05	--	75	74	40	75	75	72	73	73	78	72	96	72	76	76	73	89	26
BR:PIR1:05	80	--	74	29	74	75	76	81	72	78	72	76	74	98	98	76	76	33
AbMV	79	80	--	28	74	74	86	76	71	78	72	74	86	75	74	74	74	30
ACMV	41	40	41	--	41	41	29	30	37	41	28	40	29	29	29	38	24	58
BGMV	78	81	79	42	--	75	73	72	71	79	73	75	75	75	75	76	76	41
BGYMV	83	81	81	42	79	--	75	72	71	80	73	75	75	75	75	72	75	33
SGMV	78	82	91	42	79	83	--	78	72	78	72	73	85	76	75	75	73	32
SimMV	80	89	81	42	81	83	84	--	70	78	71	73	75	81	80	75	73	40
SqLCV	79	77	78	42	75	78	79	78	--	78	70	75	71	73	73	70	75	40
TGMV	85	85	87	48	80	88	87	86	83	--	75	80	79	78	78	81	81	49
ToCMoV	78	78	79	39	78	80	81	78	78	84	--	73	74	72	73	71	73	30
ToMLCV	97	80	79	42	78	83	79	80	79	85	79	--	73	77	77	74	90	26
ToMoV	79	82	91	43	79	82	93	83	80	88	81	79	--	74	74	74	74	31
ToRMV	81	99	80	40	80	81	82	89	77	85	78	81	83	--	99	77	76	33
ToSRV- [BR:PG1:Pep:03]	81	98	80	41	81	82	82	90	77	85	78	81	83	98	--	77	76	33
ToYSV	78	78	78	45	79	77	78	80	74	82	77	78	78	78	79	--	76	39
ToYVSV-[Ba3]	94	81	80	42	77	82	80	80	80	85	79	95	81	82	82	78	--	24
WmCSV	43	44	42	55	42	43	42	42	45	48	43	43	42	44	44	43	43	--

Tabela 9. Porcentagem de identidade entre as seqüências de nucleotídeos da ORF *nsp* (valores acima da diagonal) e as seqüências de aminoácidos da proteína NSP (valores abaixo da diagonal) dos isolados BR:Pir1:05 e BR:Pda30:05 e de outras espécies de begomovírus.

	BR:Pda30:05	BR:PIR1:05	AbMV	ACMV	BGMV	BGYMV	SGMV	SimMV	SqLCV	TGMV	ToCMoV	ToMLCV	ToMoV	ToRMV	ToSRV- [BR:PG1: Pep:03]	ToYSV	ToYVSV- [Ba3]	WmCSV
BR:Pda30:05	--	76	69	10	73	72	70	73	68	76	71	94	71	76	76	73	84	14
BR:PIR1:05	73	--	69	10	70	69	71	78	61	74	72	75	70	98	98	73	75	11
AbMV	66	69	--	21	70	70	75	72	65	69	67	69	77	69	69	72	67	4
ACMV	27	25	31	--	26	38	15	9	25	13	13	9	11	8	10	8	10	38
BGMV	71	71	71	26	--	72	70	71	63	69	70	73	71	70	70	72	73	11
BGYMV	70	68	67	26	70	--	69	67	64	73	67	72	71	70	70	69	72	11
SGMV	69	69	76	30	71	69	--	72	64	64	68	70	79	71	71	73	70	16
SimMV	73	75	71	31	72	67	71	--	66	71	70	72	72	77	78	77	71	5
SqLCV	60	54	61	28	61	60	60	60	--	68	67	61	65	68	68	67	70	4
TGMV	73	71	66	28	70	69	66	69	60	--	66	64	64	73	74	71	76	15
ToCMoV	66	67	67	26	72	68	69	70	61	67	--	70	68	71	71	69	72	16
ToMLCV	92	73	66	28	72	70	69	74	60	73	67	--	71	75	75	73	84	7
ToMoV	69	69	77	26	70	69	78	70	58	67	68	68	--	71	70	73	70	8
ToRMV	73	98	69	25	70	67	68	75	58	71	67	72	69	--	98	73	76	13
ToSRV- [BR:PG1:Pep:03]	73	98	69	25	70	68	69	75	59	71	67	73	69	97	--	73	75	11
ToYSV	73	74	70	29	75	70	72	78	62	73	70	73	71	73	74	--	72	2
ToYVSV-[Ba3]	82	71	67	26	70	71	67	71	61	75	69	83	67	71	71	72	--	11
WmCSV	28	27	28	35	28	27	28	27	29	27	26	29	25	27	28	25	29	--

4.3. Construção de clones infecciosos

4.3.1 Construção dos clones “meia-cópia”

Os clones pVIR088 e pVIR089 (contendo o DNA-A e DNA-B completos, respectivamente, do isolado BR:Pir1:05), e pVIR090 e pVIR 091 (contendo o DNA-A e DNA-B completos, respectivamente, do isolado BR:Pda30:05) foram clivados com as enzimas *Bam*H I, *Apa* I, *Sal* I e *Sac* I, respectivamente, e os fragmentos contendo a região comum de cada clone foram religados ao vetor pKS⁺. As construções resultantes foram utilizadas para transformação de *E. coli* DH5 α e as colônias contendo os plasmídeos recombinantes foram submetidas a minipreparação de DNA plasmidial. Os plasmídeos recombinantes foram submetidos a clivagens com as mesmas enzimas utilizadas para a clonagem. A análise eletroforética dos produtos da clivagem confirmou a obtenção dos clones “meia-cópia” dos componentes genômicos dos dois isolados (Figura 7).

As construções contendo a “meia-cópia” do DNA-A e DNA-B do isolado ToSRV-[BR:Pir1:05] foram identificados como pVIR092 e pVIR093 e do isolado ToYVSV-[BR:Pda30:05] foram identificados como pVIR094 e pVIR095, respectivamente.

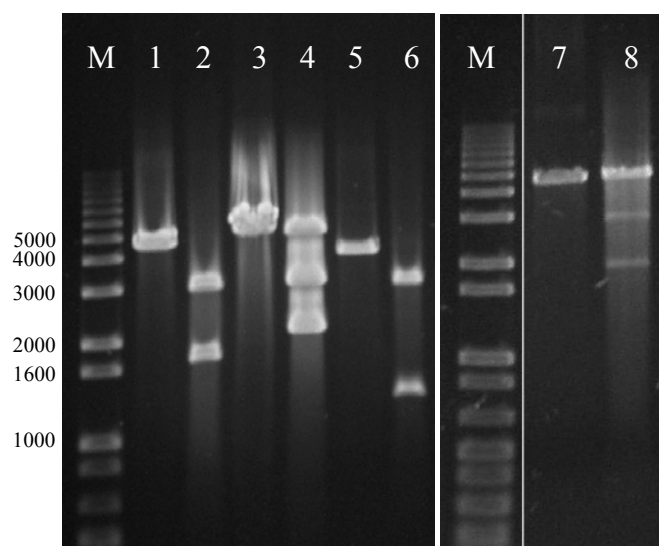


Figura 7. Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) da clivagem de DNA plasmidial para confirmação da obtenção dos clones “meia-cópia”. **M**, marcador de comprimento (“1 kb plus DNA ladder”, em nt); **1**, pVIR092 (“meia-cópia” do DNA-A do isolado ToSRV-[BR:Pir1:05]) clivado com a enzima *EcoR* I; **2**, pVIR092 clivado simultaneamente com as enzimas *EcoR* I e *BamH* I; **3**, pVIR093 (“meia-cópia” do DNA-B do isolado ToSRV-[BR:Pir1:05]) clivado com a enzima *Kpn*I; **4**, pVIR093 clivado simultaneamente com as enzimas *Kpn* I e *Apa* I; **5**, pVIR094 (“meia-cópia” do DNA-A do isolado ToYVSV-[BR:Pda30:05]) clivado com a enzima *BamH* I; **6**, pVIR094 clivado simultaneamente com as enzimas *BamH* I e *Sal* I. **7**, pVIR095 (“meia-cópia” do DNA-B do isolado ToYVSV-[BR:Pda30:05]) clivado com a enzima *Apa* I; **8**, pVIR095 clivado simultaneamente com as enzimas *Apa* I e *Sac* I.

4.3.1 Ligação do fragmento correspondente a uma cópia de cada componente genômico ao clone “meia-cópia”

Os fragmentos de 2600 nucleotídeos correspondentes a uma cópia de cada componente genômico dos isolados ToSRV-[BR:Pir1:05] e ToYVSV-[BR:Pda30:05] foram liberados dos clones pVIR088, pVIR089, pVIR090 e pVIR091 por meio da clivagem com a mesma enzima utilizada para clonagem. Os fragmentos foram purificados após separação em gel de agarose (Figura 8) e ligados aos clones “meia-cópia” correspondentes. Os produtos das reações de ligação foram utilizados para transformação de *E. coli* DH5 α pelo método de choque térmico. As culturas contendo os possíveis plasmídeos recombinantes foram submetidas à minipreparação de DNA plasmidial (Figuras 9).

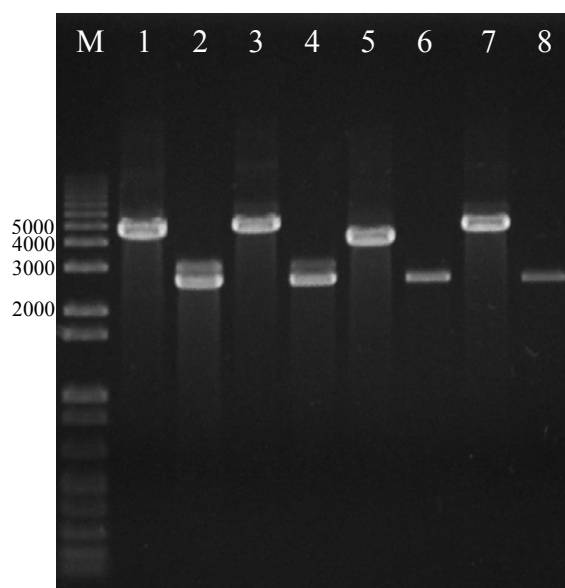


Figura 8. Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) dos clones “meia-cópia” linearizados e dos fragmentos de 2600 nt correspondentes a uma cópia de cada componente genômico. **M**, marcador de comprimento (“1 kb plus DNA ladder”, em nt); **1**, pVIR092 (“meia-cópia” do DNA-A do isolado ToSRV-[BR:Pir1:05]) linearizado por meio de clivagem com a enzima *EcoR* I; **2**, fragmento liberado a partir do clone pVIR088 (uma cópia do DNA-A do isolado ToSRV-[BR:Pir1:05]); **3**, pVIR093 (“meia-cópia” do DNA-B do isolado ToSRV-[BR:Pir1:05]) linearizado por meio de clivagem com a enzima *Kpn* I; **4**, fragmento liberado a partir do clone pVIR089 (uma cópia do DNA-B do isolado ToSRV-[BR:Pir1:05]); **5**, pVIR094 (“meia-cópia” do DNA-A do isolado ToYVSV-[BR:Pda30:05]) linearizado por meio de clivagem com a enzima *BamH* I; **6**, fragmento liberado a partir do clone pVIR090 (uma cópia do DNA-A do isolado ToYVSV-[BR:Pda30:05]); **7**, pVIR095 (“meia-cópia” do DNA-B do isolado ToYVSV-[BR:Pda30:05]) linearizado por meio de clivagem com a enzima *ApaI* I; **8**, fragmento liberado a partir do clone pVIR091 (uma cópia do DNA-B do isolado ToYVSV-[BR:Pda30:05]).

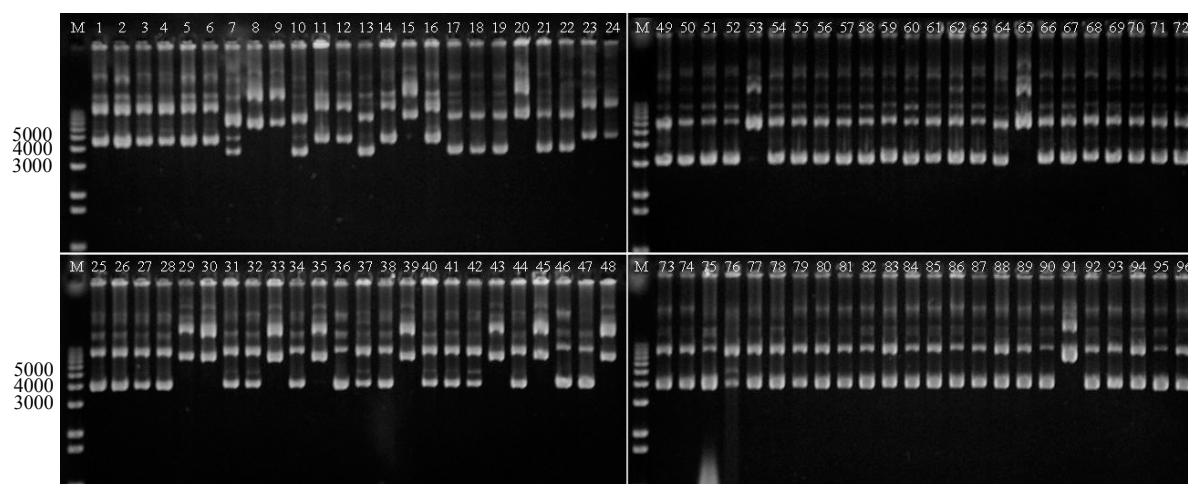


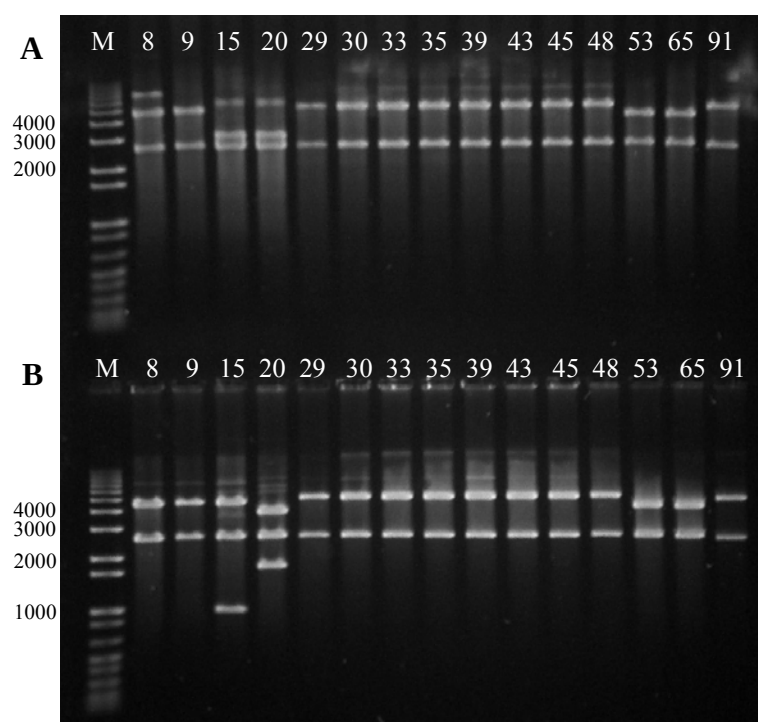
Figura 9. Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) das minipreparações de DNA plasmidial obtidas a partir de colônias contendo os possíveis clones infecciosos dos isolados ToSRV-[BR:Pir1:05] e ToYVSV-[BR:Pda30:05]. **M**, marcador de comprimento (“1 kb plus DNA ladder”, em nt); **1-24**, ligação do fragmento de 2600 nt liberado do clone pVIR088 (uma cópia do DNA-A do isolado ToSRV-[BR:Pir1:05]) ao clone pVIR092 (“meia-cópia” do DNA-A do mesmo isolado); **25-48**, ligação do fragmento de 2600 nt liberado do clone pVIR089 (uma cópia do DNA-B do isolado ToSRV-[BR:Pir1:05]) ao clone pVIR093 (“meia-cópia” do DNA-B do mesmo isolado); **49-72**, ligação do fragmento de 2600 nt liberado do clone pVIR090 (uma cópia do DNA-A do isolado ToYVSV-[BR:Pda30:05]) ao clone pVIR094 (“meia-cópia” do DNA-A do mesmo isolado); **73-96**, ligação do fragmento de 2600 nt liberado do clone pVIR091 (uma cópia do DNA-B do isolado ToYVSV-[BR:Pda30:05]) ao clone pVIR095 (“meia-cópia” do DNA-B do mesmo isolado).

4.3.1 Confirmação da clonagem e análise da orientação

A confirmação da ligação dos fragmentos de 2600 nt em seus respectivos clones “meia-cópia” foi realizada através da clivagem das amostras de DNA plasmidial com a mesma enzima utilizada para clonagem (Figura 10A). O fragmento esperado foi observado em 12 das 15 amostras de DNA plasmidial testadas, confirmando a obtenção dos clones “cópia e meia”.

A orientação dos fragmentos de 2600 nt, em seus clones “cópia e meia” correspondentes, também foi verificada via clivagem enzimática utilizando-se as enzimas *Bam*H I, *Apa* I, *Sal* I e *Sac* I, que clivam os clones em dois pontos, liberando um fragmento de 2600 nt quando a cópia e a meia cópia se encontram na mesma orientação (Figura 10B). Com base nos resultados obtidos, 13 amostras de DNA plasmidial apresentaram o fragmento na orientação desejada.

Os clones 9, 30, 65 e 91, identificadas respectivamente como pVIR096 (ToSRV-[BR:Pir1:05], DNA-A), pVIR097 (ToSRV-[BR:Pir1:05], DNA-B), pVIR098 (ToYVSV-[BR:Pda30:05], DNA-A) e pVIR099 (ToYVSV-[BR:Pda30:05], DNA-B), foram selecionados para os testes de infectividade/gama de hospedeiros.



Figuras 10. Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) da clonagem e orientação dos fragmentos de 2600 nt nos clones infecciosos dos isolados BR:Pir1:05 e BR:Pda30:05. **M**, marcador de comprimento (“1 kb plus DNA ladder”, em nt); **A**, clones **8-20**, ToSRV-[BR:Pir1:05], DNA-A, clivados com a enzima *EcoR* I; clones **29-48**, ToSRV-[BR:Pir1:05], DNA-B, clivados com a enzima *Kpn* I; clones **53 e 65**, ToYVSV-[BR:Pda30:05], DNA-A, clivados com a enzima *BamH* I; clone **91**, ToYVSV-[BR:Pda30:05], DNA-B, clivado com a enzima *Apa* I. **B**, clones **8-20**, clivados com a enzima *BamH* I; clones 29-48, clivados com a enzima *Apa* I, clones **53 e 65**, clivados com a enzima *Sal* I; clone **91**, clivado com a enzima *Sac* I.

4.4. Teste de gama de hospedeiros

Os resultados do teste de gama de hospedeiros são apresentados na Tabela 10. A infecção foi confirmada por meio de PCR utilizando-se oligonucleotídeos universais para o gênero *Begomovirus*, que amplificam um fragmento com aproximadamente 1100 nt (Figura 11), e também por meio de hibridização molecular utilizando-se os clones pVIR096 (ToSRV-[BR:Pir1:05], DNA-A) e pVIR098 (ToYVSV-[BR:Pda30:05], DNA-A) como sondas (Figura 12).

A gama de hospedeiros do isolado ToSRV-[BR:Pir1:05] foi restrita a plantas da família *Solanaceae*, incluindo *Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. debney*, *N. glutinosa* e *N. tabacum*, além das duas variedades de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) testadas. Por outro lado, o isolado ToYVSV-[BR:Pda30:05] foi capaz de infectar apenas *Nicotiana benthamiana* e as variedades TNN e Xanthi de *N. tabacum*.

Sintomas de infecção pelo isolado ToSRV-[BR:Pir1:05] foram observados apenas em plantas de *Nicotiana benthamiana* e em seu hospedeiro natural, o tomateiro. Neste último, os sintomas foram severos, consistindo em mosaico, deformação foliar intensa e clorose. Os sintomas induzidos na variedade Santa Clara foram mais severos do que aqueles observados na variedade Rutgers. Em *N. glutinosa*, lesões cloróticas foram observadas nas folhas inoculadas (Figura 13). Nas demais espécies indicadoras cuja infecção sistêmica pelo vírus foi confirmada via PCR e hibridização, as plantas não apresentaram quaisquer sintomas mesmo aos 28 dias após a inoculação (Figura 14). Da mesma forma, plantas infectadas sistemicamente pelo isolado ToYVSV-[BR:Pda30:05] não apresentaram sintomas da infecção viral durante o período avaliado (Figura 15).

Tabela 10. Espécies de plantas infectadas pelos isolados ToSRV-[BR:Pir1:05] e ToYVSV-[BR:Pda30:05].

Espécie, ‘cultivar’	Isolado ToSRV-[BR:Pir1:05]		Isolado ToYVSV-[BR:Pda30:05]	
	Plantas infectadas/inoculadas	Sintomas	Plantas infectadas/inoculadas	Sintomas
<i>Capsicum annuum</i>	0/6		0/6	-
<i>Chenopodium quinoa</i>	0/6	-	0/6	-
<i>Cucurbita pepo</i> ‘Caserta’	0/6	-	0/6	-
<i>Datura stramonium</i>	0/6	-	0/6	-
<i>Glycine max</i>	0/6	-	0/6	-
<i>Gomphrena globosa</i>	0/6	-	0/6	-
<i>Nicotiana benthamiana</i>	6/6	df, mo, rc	1/6	-
<i>N. clevelandii</i>	6/6	-	0/6	-
<i>N. debney</i>	6/6	-	0/6	-
<i>N. glutinosa</i>	6/6	llc	0/6	-
<i>N. rustica</i>	2/6	-	0/6	-
<i>N. tabacum</i> ‘Havana’	6/6	-	0/6	-
<i>N. tabacum</i> ‘TNN’	6/6	-	2/6	-
<i>N. tabacum</i> ‘Xanthi’	6/6	-	1/6	-
<i>N. tabacum</i> ‘White Burley’	6/6	-	0/6	-
<i>Solanum lycopersicum</i> ‘Rutgers’	6/6	mo, cl	0/6	-
<i>Solanum lycopersicum</i> ‘Santa Clara’	4/6	df, mo, rf, cl	0/6	-
<i>Phaseolus vulgaris</i> ‘Ouro Negro’	0/6	-	0/6	-
<i>Phaseolus vulgaris</i> ‘Pérola’	0/6	-	0/6	-
<i>Vigna unguiculata</i> ‘Pitiúba’	0/6	-	0/6	-

Os sintomas são representados por: **cl**, clorose; **df**, deformação foliar; **llc**, lesão local clorótica; **mo**, mosaico; **rc**, redução de crescimento; **rf**, rugosidade foliar.

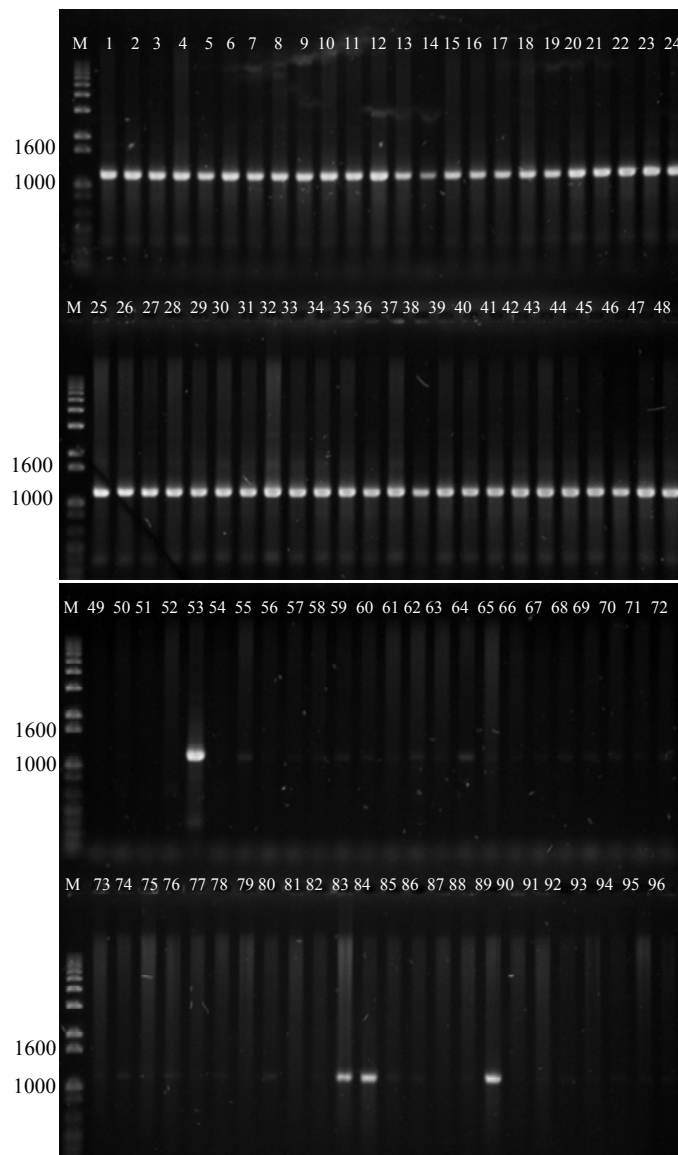


Figura 11. Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) da confirmação da infecção viral pelos isolados ToSRV-[BR:Pir1:05] (amostras 1-48) e ToYVSV-[BR:Pda30:05] (amostras 49-96) via PCR. **M**, marcador de comprimento (“1 kb plus DNA ladder”, em nt); **1-6** e **49-55**, *N. benthamiana*; **7-13** e **55-60**, *N. clevelandii*; **14-18** e **61-66**, *N. debney*; **19-24** e **67-72**, *N. glutinosa*; **25-30** e **73-78**, *N. tabacum* ‘Havana’; **31-37** e **79-84**, *N. tabacum* ‘TNN’; **38-42** e **85-90**, *N. tabacum* ‘Xanthi’; **43-48** e **91-96**, *N. tabacum* ‘White burley’. Um fragmento de aproximadamente 1100 nt foi observado para o controle positivo (DNA total de planta inoculada com o begomovírus *Tomato golden mosaic virus*). Nenhum fragmento foi observado para o controle negativo (DNA total de plantas inoculadas com partículas de tungstênio sem DNA viral).

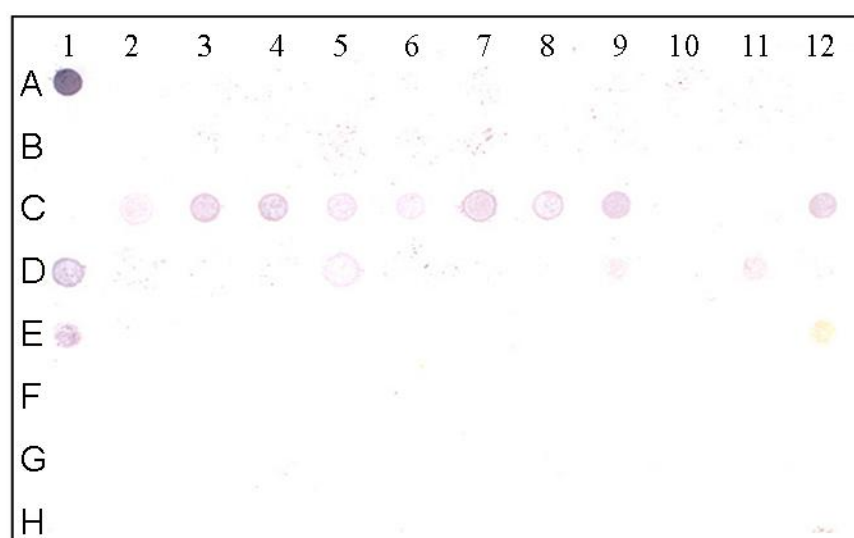


Figura 12. Confirmação da infecção viral pelo isolado ToSRV-[BR:Pir1:05] via hibridização molecular. **A1**, DNA plasmidial do clone pVIR096 (ToSRV-[BR:Pir1:05], DNA-A); **A2-B1**, plantas de *Capsicum annuum*, *Gomphrena globosa*, *Solanum lycopersicum* ‘Rutgers’, *Solanum lycopersicum* ‘Santa Clara’, *Nicotiana rustica*, *Datura stramonium*, *Phaseolus vulgaris* ‘Pérola’, *Phaseolus vulgaris* ‘Ouro Negro’, *Vigna unguiculata* ‘Pitiúba’, *Chenopodium quinoa*, *Glycine max* e *Cucurbita pepo* ‘Caserta’ inoculadas via biobalística com partículas de tungstênio sem DNA viral. **B2-G8**, DNA total de plantas de inoculadas com o isolado ToSRV-[BR:Pir1:05]: **B2-B7**, *C. annuum*; **B8-C1**, *G. globosa*; **C2-C7**, *S. lycopersicum* ‘Rutgers’; **C8-D1**, *S. lycopersicum* ‘Santa Clara’; **D2-D7**, *N. rustica*; **D8-E1**, *D. stramonium*; **E2-E6**, *P. vulgaris* ‘Pérola’; **E7-E11**, *P. vulgaris* ‘Ouro Negro’; **E12-F4**, *V. unguiculata* ‘Pitiúba’; **F5-F9**, *C. quinoa*; **F10-G2**, *G. max*; **G3-G8**, *C. pepo* ‘Caserta’. Plantas das mesmas espécies foram inoculadas com o isolado ToYVSV-[BR:Pda30:05] e apenas a marcação correspondente ao clone pVIR098 (ToYVSV-[BR:Pda30:05], DNA-A; controle positivo) foi observada.

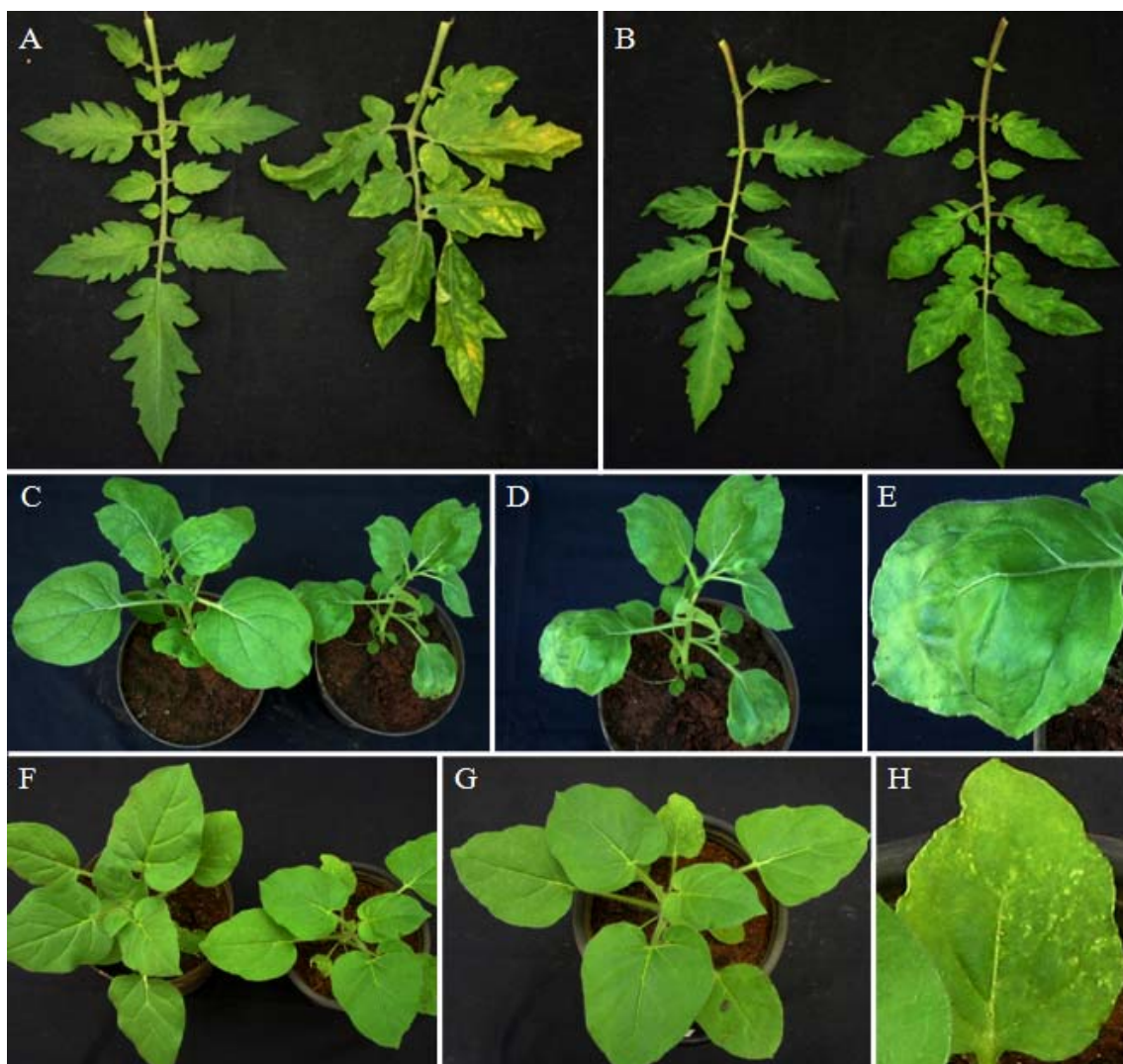


Figura 13. Sintomas observados em plantas de *Solanum lycopersicum*, *N. benthamiana* e *N. glutinosa* inoculadas via biobalística com os clones infecciosos do isolado ToSRV-[BR:Pir1:05]. **A**, *Solanum lycopersicum* ‘Santa Clara’ (28 dias após a inoculação); **B**, *Solanum lycopersicum* ‘Rutgers’ (28 dias após a inoculação); **C**, **D** e **E**, *N. benthamiana* (21 dias após a inoculação); **F**, **G** e **H**, *N. glutinosa*. Em **A**, **B** e **C** a planta sadia se encontra à esquerda.



Figura 14. Plantas nas quais a infecção pelo isolado ToSRV-[BR:Pir1:05] foi confirmada via PCR e hibridização, porém sem sintomas macroscópicos. **A**, *N. clevelandii*; **B**, *N. debney*; **C**, *N. tabacum* 'Havana'; **D**, *N. tabacum* 'TNN'; **E**, *N. tabacum* 'Xanthi'; **F**, *N. tabacum* 'White Burley'. Em A, B, C, E e F a planta sadia se encontra à esquerda. Todas as imagens obtidas aos 28 dias após a inoculação.



Figura 15. Plantas nas quais a infecção pelo isolado ToYVSV-[BR:Pda30:05] foi confirmada via PCR e hibridização, porém sem sintomas macroscópicos. **A**, *N. tabacum* 'TNN'; **B**, *N. tabacum* 'Xanthi'; **C**, *N. benthamiana*. A planta sadia se encontra à esquerda. Todas as imagens obtidas aos 28 dias após a inoculação.

5. DISCUSSÃO

A incidência de begomovírus em tomateiro tornou-se freqüente no Brasil a partir de meados da década de 1990, devido à introdução do biótipo B do inseto vetor, a mosca branca *B. tabaci* (Melo, 1992). O biótipo B é capaz de colonizar eficientemente o tomateiro e diversas espécies de plantas silvestres e/ou daninhas (Bedford *et al.*, 1994). Conseqüentemente, begomovírus antes restritos a essas plantas passaram a ter acesso ao tomateiro e outras espécies de plantas cultivadas. A rápida evolução desses vírus (Duffy e Holmes, 2008) levou à emergência de diversas novas espécies melhor adaptadas aos novos hospedeiros (Ribeiro *et al.*, 2003; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008).

Resultados de trabalhos anteriores têm indicado grande variabilidade genética destes patógenos em tomateiro no Brasil (Ambrozevicius *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2003; Inoue-Nagata *et al.*, 2006; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008). Entretanto, poucas espécies têm prevalecido em condições de campo, dentre elas o *Tomato severe rugose virus* e o *Tomato yellow vein streak virus* (Castillo-Urquiza, 2008; Cotrim *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2008). O ToSRV já foi relatado nos estados de Goiás, Minas Gerais, Pernambuco, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo (Rezende *et al.*, 1997; Lima *et al.*, 2006; Castillo-Urquiza *et al.*, 2007; Cotrim *et al.*, 2007). O ToYVSV foi relatado

primeiramente no estado de São Paulo (Faria *et al.*, 1997), e atualmente encontra-se presente também nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e Goiás (Zerbini *et al.*, 2005; Calegario *et al.*, 2007; Castillo-Urquiza *et al.*, 2007).

Neste trabalho, dois isolados de begomovírus pertencentes às espécies *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) foram clonados, as seqüências de seus componentes genômicos foram analisadas e cada uma de suas ORFs foram comparadas com as ORFs correspondentes de outros begomovírus. Além disso, clones infecciosos foram construídos e inoculados em diversas espécies de plantas indicadoras, a fim de determinar a gama parcial de hospedeiros e identificar espécies de plantas que podem atuar como reservatório natural e como fonte de inóculo primário no campo.

A análise da seqüência do DNA-A do isolado BR:Pir1:05 indicou valores de identidade de 98% com outros isolados de ToSRV. Quando a seqüência da ORF *rep* deste isolado é comparada com as seqüências correspondentes de outros begomovírus, um valor elevado de identidade (95% nt e 93% aa) foi observado com a seqüência da ORF *rep* do *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV). Por outro lado, a identidade entre as seqüências da ORF *cp* destes dois vírus é de apenas 81% (nt) e 89% (aa), sugerindo que o DNA-A do isolado BR:Pir1:05 pode ser resultado de um evento de recombinação, no qual o vírus adquiriu a ORF *rep* do ToRMV e a ORF *cp* de um vírus não identificado. Existem diversos relatos de eventos de recombinação em begomovírus monossegmentados associados ao complexo que infecta tomateiro na Espanha, e novas espécies mais adaptadas têm prevalecido em condições de campo neste país (Monci *et al.*, 2002; Garcia-Andres *et al.*, 2006; Garcia-Andres *et al.*, 2007). Evidências da ocorrência de recombinação já foram obtidas para o complexo de begomovírus infectando o tomateiro no Brasil. Galvão *et al.* (2003) e Ribeiro *et al.* (2007) sugeriram

que os isolados MG-Bt1 e BA-Se1 do ToCMoV possuem origem recombinante. A análise da sequência do DNA-A do isolado BR:Pir1:05 em “softwares” específicos para detecção de recombinação permitirá a confirmação dessa hipótese.

A sequência completa de nucleotídeos do DNA-B do isolado BR:Pir1:05 apresentou identidade de 97% com o DNA-B do ToSRV. Curiosamente, as sequências de aminoácidos das proteínas MP e NSP do isolado BR:Pir1:05 apresentam identidades de 99 e 98%, respectivamente, com as proteínas correspondentes do ToRMV, indicando estreito relacionamento entre os componentes genômicos desses dois vírus. De fato, a sequência completa do DNA-B do isolado BR:Pir1:05 apresenta maior valor de identidade com o DNA-B do ToRMV (98%) do que com seu DNA-A cognato (97%). Esses resultados sugerem a possibilidade de que o ToSRV e o ToRMV compartilhem o mesmo DNA-B. A identidade elevada (97%) verificada entre as sequências das regiões comuns desses dois vírus reforça essa hipótese. Experimentos que confirmem a formação de pseudorecombinantes entre o DNA-A do ToRMV e o DNA-B do isolado BR:Pda30:05, quando inoculados em plantas hospedeiras, poderiam fornecer forte indício de que o compartilhamento do mesmo DNA-B pelos dois vírus de fato ocorre em condições de campo.

Na análise filogenética, o DNA-A do isolado BR:Pir1:05 agrupou-se somente com vírus que infectam tomateiro no Brasil. Por outro lado, o DNA-B desse isolado agrupou-se no mesmo ramo com um begomovírus que infecta *Sida* sp., o *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV), além de begomovírus que infectam tomateiro. Esses resultados indicam a existência de relacionamento entre os begomovírus que infectam o tomateiro e plantas daninhas/silvestres no Brasil, reforçando a hipótese de que vírus presentes em hospedeiros silvestres deram origem aos vírus atualmente encontrados em tomateiro.

A sequência completa de nucleotídeos do DNA-A do isolado BR:Pda30:05 apresentou identidade de 95% com o DNA-A do isolado G22 do ToYVSV. A análise de sua sequência indicou a presença de duas ORFs na fita complementar, cujas sequência de aminoácidos deduzidas apresentam alta identidade com a proteína potencialmente expressa a partir da ORF AC5, presente no DNA-A de alguns begomovírus (como o ToRMV). Essa ORF possui sua sequência de nucleotídeos quase totalmente inserida na sequência codificadora da ORF *cp*, porém em outra fase de leitura. No DNA-A do isolado BR:Pda30:05, a primeira ORF inicia-se na posição 794, estendendo-se até a posição 543. A segunda ORF, presente na mesma fase de leitura, inicia-se na posição 521 do genoma viral, estendendo-se até a posição 225. Somadas essas duas ORFs correspondem aproximadamente à ORF AC5 “típica”, como por exemplo a que está presente no DNA-A do ToRMV (posições 992 a 240). Portanto, descartando-se a possibilidade de erro no sequenciamento, o DNA-A do ToYVSV-[BR:Pda30:05] provavelmente sofreu mutações na sequência da ORF AC5 que levaram à sua inativação, restando as duas ORFs parciais. Alternativamente, é possível que as duas ORFs sejam expressas, e as proteínas resultantes atuem na forma de um heterodímero.

A possível função da proteína potencialmente expressa pela ORF AC5 de begomovírus permanece desconhecida. Experimentos visando a inativação dessa ORF e análise fenotípica dos componentes genômicos mutados foram conduzidos apenas para a ORF AC5 do *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV), não sendo encontrado nenhum indício de sua funcionalidade no ciclo de infecção viral (Kheyr-Pour *et al.*, 2000).

A sequência do DNA-B do isolado BR:Pda30:05 apresentou maior valor de identidade com o Tomato mild leaf curl virus - [Uberlandia] (ToMLCV) (número de acesso no GenBank DQ336352), proposto como pertencente a uma nova espécie viral

(Fernandes *et al.*, 2006). Na época, a sequência do DNA-A completo do ToYVSV não estava disponível, o que impossibilitou a identificação do ToMLCV como seu DNA-B cognato. Neste trabalho, a comparação das sequências completas do DNA-B do ToYVSV e do ToMLCV comprova tratarem-se de dois componentes genômicos da mesma espécie, ToYVSV.

Nos estudos filogenéticos, ambos os componentes do isolado BR:Pda30:05 agruparam-se apenas com begomovírus que infectam tomateiro no Brasil.

Os clones “cópia e meia” obtidos para os isolados BR:Pir1:05 e BR:Pda30:05 foram infecciosos quando inoculados em diversas espécies de plantas. A gama de hospedeiros do isolado BR:Pir1:05 foi restrita a plantas da família Solanaceae. O vírus induziu sintomas severos em seu hospedeiro natural (tomateiro), principalmente na cultivar Santa Clara. As espécies *N. clevelandii*, *N. debney*, *N. glutinosa* e *N. tabacum*, apesar de hospedeiras do isolado BR:Pir1:05, não apresentaram sintomas da infecção viral. O método de inoculação foi bastante eficiente para este isolado, já que na maioria das espécies em que a infecção foi confirmada, todas as repetições de uma mesma espécie/cultivar estavam infectadas.

A existência de hospedeiros nos quais o vírus induz infecção latente (sem sintomas macroscópicos) tem implicações práticas importantes, pois tais plantas dificilmente são percebidas em condições de campo, e conseqüentemente podem atuar como eficientes reservatórios desses patógenos e servir de fonte de inóculo primário para plantas hospedeiras de importância econômica, como o tomateiro.

A gama de hospedeiros parcial determinada para o isolado BR:Pir1:05 é similar a de outros begomovírus que infectam o tomateiro no Brasil. A gama de hospedeiros do ToRMV, por exemplo, também está restrita a plantas da família Solanaceae (Fernandes *et al.*, 2006). O *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) infecta plantas das famílias

Solanaceae e Fabaceae (Ribeiro *et al.*, 2007). O *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), por sua vez, é capaz de infectar plantas das famílias Solanaceae e Amaranthaceae (Calegario *et al.*, 2007).

O isolado BR:Pda30:05 foi capaz de infectar somente *N. benthamiana* e as variedades TNN e Xanthi de *N. tabacum*. A infecção viral não foi confirmada em tomateiro. Uma das possíveis explicações é que o método de inoculação pode não ter sido eficiente para sua transmissão. Uma alternativa seria a inoculação via extrato vegetal tamponado, no qual se utilizaria uma planta da espécie *N. benthamiana* ou das variedades TNN e Xanthi de *N. tabacum* (comprovadamente hospedeiras) como fonte de inóculo. A agroinoculação também poderia ser testada, entretanto clones “cópia e meia” devem ser inseridos em vetor plasmidial binário para utilização desta técnica.

Uma outra explicação para a baixa infectividade dos clones do isolado BR:Pda30:05 é que estes poderiam conter mutações que, apesar de não abolirem a capacidade de replicação, reduziram fortemente sua eficiência. Componentes genômicos contendo mutações dessa natureza poderiam se replicar na planta hospedeira utilizando as proteínas necessárias à replicação codificadas por genomas que não contenham essas mutações. Dessa forma, genomas mutados se manteriam em meio à população viral ‘tipo selvagem’, atingindo alto título na planta.

Neste trabalho, isolados virais correspondentes às espécies ToSRV e ToYVSV foram clonados e completamente seqüenciados, e clones infecciosos foram produzidos. A análise das seqüência indica relacionamento com outros vírus de tomateiro e de plantas silvestres, e também a ocorrência de eventos de recombinação. As suas gamas de hospedeiros incluem espécies que podem atuar como reservatório natural e/ou fonte de inóculo primário no campo. A disponibilidade dos clones infecciosos deverá facilitar a condução de programas de melhoramento genético do tomateiro visando resistência a

begomovírus (pois será possível testar materiais para cada vírus isoladamente), e permitirá a realização de estudos de interação vírus-hospedeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. e Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v.215, p.403-410. 1990.
- Ambrozevicius, L.P., Calegario, R.F., Fontes, E.P.B., Carvalho, M.G. e Zerbini, F.M. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v.27, p.372-377. 2002.
- Andrade, E.C., Ambrozevicius, L.P., Calegario, R.F., Fontes, E.P.B. e Zerbini, F.M. Molecular cloning and characterization of *Tomato chlorotic mottle virus* (TCMV), a new tomato-infecting begomovirus. *Virus Reviews and Research*, v.7, p.153. 2002.
- Andrade, E.C., Manhani, G.G., Alfenas, P.F., Calegario, R.F., Fontes, E.P. e Zerbini, F.M. *Tomato yellow spot virus*, a tomato-infecting begomovirus from Brazil with a closer relationship to viruses from *Sida* sp., forms pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from *Sida*. *Journal of General Virology*, v.87, p.3687-3696. 2006.
- Aragão, F.J.L., Barros, L.M.G., Brasileiro, A.C.M., Ribeiro, S.G., Smith, F.D., Sanford, J.C., Faria, J.C. e Rech, E.L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theoretical and Applied Genetics*, v.93, p.142-150. 1996.
- Argüello-Astorga, G., Herrera-Estrella, L. e Rivera-Bustamante, R. Experimental and theoretical definition of geminivirus origin of replication. *Plant Molecular Biology*, v.26, p.553-556. 1994.
- Argüello-Astorga, G., Lopez-Ochoa, L., Kong, L.J., Orozco, B.M., Settlege, S.B. e Hanley-Bowdoin, L. A novel motif in geminivirus replication proteins interacts with the plant retinoblastoma-related protein. *Journal of Virology*, v.78, p.4817-4826. 2004.
- Baulcombe, D. RNA silencing in plants. *Nature*, v.431, p.356-363. 2004.
- Bedford, I.D., Briddon, R.W., Brown, J.K., Rosell, R.C. e Markham, P.G. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes

- from different geographical regions. *Annals of Applied Biology*, v.125, p.311-325. 1994.
- Bezerra, I.C., Lima, M.F., Ribeiro, S.G., Giordano, L.B., Zerbini, F.M. e Ávila, A.C. Occurrence of geminivirus in tomato-producing areas in Submédio São Francisco. *Fitopatologia Brasileira*, v.22, p.331. 1997.
- Bezerra, I.C., Ribeiro, S.G., Ávila, A.C. e Giordano, L.B. Survey of geminivirus infection in tomato producing areas in Federal District. VIII Encontro Nacional de Virologia. São Lourenço, MG, 1996. 289 p.
- Bisaro, D.M. Silencing suppression by geminivirus proteins. *Virology*, v.344, p.158-168. 2006.
- Briddon, R.W. Cotton leaf curl disease, a multicomponent begomovirus complex. *Molecular Plant Pathology*, v.4, p.427-434. 2003.
- Briddon, R.W., Bull, S.E., Amin, I., Idris, A.M., Mansoor, S., Bedford, I.D., Dhawan, P., Rishi, N., Siwatch, S.S., Abdel-Salam, A.M., Brown, J.K., Zafar, Y. e Markham, P.G. Diversity of DNA beta, a satellite molecule associated with some monopartite begomoviruses. *Virology*, v.312, p.106-121. 2003.
- Briddon, R.W., Mansoor, S., Bedford, I.D., Pinner, M.S., Saunders, K., Stanley, J., Zafar, Y., Malik, K.A. e Markham, P.G. Identification of dna components required for induction of cotton leaf curl disease. *Virology*, v.285, p.234-243. 2001.
- Briddon, R.W., Pinner, M.S., Stanley, J. e Markham, P.G. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology*, v.177, p.85-94. 1990.
- Bull, S.E., Tsai, W.S., Briddon, R.W., Markham, P.G., Stanley, J. e Green, S.K. Diversity of begomovirus DNA beta satellites of non-malvaceous plants in east and south east Asia. *Archives of Virology*, v.149, p.1193-1200. 2004.
- Calegario, R.F., Ferreira, S.S., Andrade, E.C. e Zerbini, F.M. Characterization of *Tomato yellow spot virus*, (ToYSV), a novel tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.42, p.1335-1343. 2007.
- Castillo-Urquiza, G.P. Diversidade e estrutura genética de populações de begomovírus em duas regiões produtoras de tomate do Sudeste do Brasil. Tese MS, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa. 2008.
- Castillo-Urquiza, G.P., Beserra Jr., J.E.A., Bruckner, F.P., Lima, A.T.M., Varsani, A., Alfenas-Zerbini, P. e Zerbini, F.M. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Archives of Virology*, *no prelo*. 2008.
- Castillo-Urquiza, G.P., Beserra Junior, J.E.A., Alfenas-Zerbini, P., Varsani, A., Lima, A.T.M., Barros, D.R. e Zerbini, F.M. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato in Paty do Alferes, Rio de Janeiro state, Brazil. *Virus Reviews and Research*, v.12, p.233. 2007.
- Costa, A.S. Increase in the populational density of *Bemisia tabaci*, a threat to widespread virus infection of legume crops in Brazil. In: Bird, J. e Maramorosch, K. (Ed.). *Tropical Diseases of Legumes*. New York: Academic Press, 1975. p.171.
- Cotrim, M.A., Krause-Sakate, R., Narita, N., Zerbini, F.M. e Pavan, M.A. Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. *Summa Phytopathologica*, v.33, p.300-303. 2007.

- Dellaporta, S.L., Wood, J. e Hicks, J.B. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.1, p.19-21. 1983.
- Duffy, S. e Holmes, E.C. Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus tomato yellow leaf curl virus. *Journal of Virology*, v.82, p.957-965. 2008.
- Durrant, W.E. e Dong, X. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, v.42, p.185-209. 2004.
- Egelkrout, E.M., Robertson, D. e Hanley-Bowdoin, L. Proliferating cell nuclear antigen transcription is repressed through an E2F consensus element and activated by geminivirus infection in mature leaves. *Plant Cell*, v.13, p.1437-1452. 2001.
- Faria, J.C., Souza-Dias, J.A.C., Slack, S. e Maxwell, D.P. A new geminivirus associated with tomato in the State of São Paulo, Brazil. *Plant Disease*, v.81, p.423. 1997.
- Fauquet, C.M., Briddon, R.W., Brown, J.K., Moriones, E., Stanley, J., Zerbini, M. e Zhou, X. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology*, v.153, p.783-821. 2008.
- Fernandes, F.R., De Albuquerque, L.C., De Britto Giordano, L., Boiteux, L.S., De Avila, A.C. e Inoue-Nagata, A.K. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes*, v.36, p.251-258. 2008.
- Fernandes, J.J., Carvalho, M.G., Andrade, E.C., Brommonschenkel, S.H., Fontes, E.P. e Zerbini, F.M. Biological and molecular properties of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Plant Pathology*, v.55, p.513-522. 2006.
- Florentino, L.H., Santos, A.A., Fontenelle, M.R., Pinheiro, G.L., Zerbini, F.M., Baracat-Pereira, M.C. e Fontes, E.P. A PERK-like receptor kinase interacts with the geminivirus nuclear shuttle protein and potentiates viral infection. *Journal of Virology*, v.80, p.6648-6656. 2006.
- Fontenelle, M.R., Luz, D.F., Gomes, A.P., Florentino, L.H., Zerbini, F.M. e Fontes, E.P. Functional analysis of the naturally recombinant DNA-A of the bipartite begomovirus Tomato chlorotic mottle virus. *Virus Research*, v.126, p.262-267. 2007.
- Fontes, E.P.B., Eagle, P.A., Sipe, P.S., Luckow, V.A. e Hanley-Bowdoin, L. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. *Journal of Biological Chemistry*, v.269, p.8459-8465. 1994.
- Fontes, E.P.B., Luckow, V.A. e Hanley-Bowdoin, L. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. *Plant Cell*, v.4, p.597-608. 1992.
- Fontes, E.P.B., Santos, A.A., Luz, D.F., Waclawovsky, A.J. e Chory, J. The geminivirus nuclear shuttle protein is a virulence factor that suppresses transmembrane receptor kinase activity. *Genes & Development*, v.18, p.2545-2556. 2004.
- França, F.H., Villas-Boas, G.L. e Castelo-Branco, M. Ocorrência de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera:Aleyrodidae) no Distrito Federal. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v.25, p.369-372. 1996.
- Galvão, R.M., Fernandes, A.V., Almeida, J.D., Alfenas, P.F., Andrade, E.C. e Fontes, E.P.B. Molecular characterization of two new tomato-infecting geminiviruses and the *Sida*-infecting geminiviruses complex from Brazil. *International Workshop on Bemisia and Geminiviral diseases*. San Juan - Puerto Rico, 1998. p. L-93.

- Galvao, R.M., Mariano, A.C., Luz, D.F., Alfenas, P.F., Andrade, E.C., Zerbini, F.M., Almeida, M.R. e Fontes, E.P. A naturally occurring recombinant DNA-A of a typical bipartite begomovirus does not require the cognate DNA-B to infect *Nicotiana benthamiana* systemically. *Journal of General Virology*, v.84, p.715-726. 2003.
- Garcia-Andres, S., Monci, F., Navas-Castillo, J. e Moriones, E. Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: Evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature. *Virology*, v.350, p.433-442. 2006.
- Garcia-Andres, S., Tomas, D.M., Sanchez-Campos, S., Navas-Castillo, J. e Moriones, E. Frequent occurrence of recombinants in mixed infections of tomato yellow leaf curl disease-associated begomoviruses. *Virology*, v.365, p.210-219. 2007.
- Gilbertson, R.L., Sudarshana, M., Jiang, H., Rojas, M.R. e Lucas, W.J. Limitations on geminivirus genome size imposed by plasmodesmata and virus-encoded movement protein: insights into DNA trafficking. *Plant Cell*, v.15, p.2578-2591. 2003.
- Gutierrez, A. e Sommer, R.J. Evolution of dnmt-2 and mbd-2-like genes in the free-living nematodes *Pristionchus pacificus*, *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*. *Nucleic Acids Research*, v.32, p.6388-6396. 2004.
- Gutierrez, C. Geminivirus DNA replication. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.56, p.313-329. 1999.
- Gutierrez, C. DNA replication and cell cycle in plants: Learning from geminiviruses. *EMBO Journal*, v.19, p.792-799. 2000.
- Hanley-Bowdoin, L., Settlage, S.B., Orozco, B.M., Nagar, S. e Robertson, D. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.18, p.71-106. 1999.
- Hanley-Bowdoin, L., Settlage, S.B. e Robertson, D. Reprogramming plant gene expression: A prerequisite to geminivirus DNA replication. *Molecular Plant Pathology*, v.5, p.149-156. 2004.
- Hao, L., Wang, H., Sunter, G. e Bisaro, D.M. Geminivirus AL2 and L2 proteins interact with and inactivate SNF1 kinase. *Plant Cell*, v.15, p.1034-1048. 2003.
- Harrison, B. e Robinson, D. Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted geminiviruses (begomoviruses). *Annual Review of Phytopathology*, v.37, p.369-398. 1999.
- Hill, J.E., Strandberg, J.O., Hiebert, E. e Lazarowitz, S.G. Asymmetric infectivity of pseudorecombinants of cabbage leaf curl virus and squash leaf curl virus: Implications for bipartite geminivirus evolution and movement. *Virology*, v.250, p.283-292. 1998.
- Hofer, P., Bedford, I.D., Markham, P.G., Jeske, H. e Frischmuth, T. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. *Virology*, v.236, p.288-295. 1997.
- Hou, Y.M. e Gilbertson, R.L. Increased pathogenicity in a pseudorecombinant bipartite geminivirus correlates with intermolecular recombination. *Journal of Virology*, v.70, p.5430-5436. 1996.
- Inoue-Nagata, A.K., Albuquerque, L.C., Rocha, W.B. e Nagata, T. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi 29 DNA polymerase. *Journal of Virological Methods*, v.116, p.209-211. 2004.

- Inoue-Nagata, A.K., Martin, D.P., Bouteux, L.S., Giordano, L.B., Bezerra, I.C. e Ávila, A.C. New species emergence via recombination among isolates of the Brazilian tomato infecting Begomovirus complex. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, v.41, p.1329-1332. 2006.
- Kheyr-Pour, A., Bananej, K., Dafalla, G.A., Caciagli, P., Noris, E., Ahoonmanesh, A., Lecoq, H. e Gronenborn, B. *Watermelon chlorotic stunt virus* from the Sudan and Iran: Sequence comparisons and identification of a whitefly-transmission determinant. *Phytopathology*, v.90, p.629-635. 2000.
- Kjemtrup, S., Sampson, K.S., Peele, C., Nguyen, L., Conkling, M., Thompson, W. e Roberson, D. Gene silencing from DNA carried by a geminivirus. *Plant Journal*, v.14, p.91-100. 1998.
- Kumar, S., Tamura, K. e Nei, M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, v.5, p.150-163. 2004.
- Latham, J.R., Saunders, K., Pinner, M.S. e Stanley, J. Induction of plant cell division by beet curly top virus gene C4. *Plant Journal*, v.11, p.1273-1283. 1997.
- Laufs, J., Schumacher, S., Geisler, N., Jupin, I. e Gronenborn, B. Identification of the nicking tyrosine of geminivirus Rep protein. *FEBS Letters*, v.377, p.258-262. 1995.
- Lazarowitz, S.G. Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.11, p.327-349. 1992.
- Lima, A.T.M., Pereira, C.O., Alfenas, P.F., Paula, M.B., Mello, R.N. e Zerbini, F.M. Primeiro relato de infecção pelo geminivírus *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) em tomateiro no estado de Santa Catarina. *Fitopatologia Brasileira*, v.31 (Suplemento), p.S224. 2006.
- Lucas, W.J. Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology*, v.344, p.169-184. 2006.
- Mansoor, S., Briddon, R.W., Zafar, Y. e Stanley, J. Geminivirus disease complexes: An emerging threat. *Trends in Plant Sciences*, v.8, p.128-134. 2003.
- Mariano, A.C., Andrade, M.O., Santos, A.A., Carolino, S.M.B., Oliveira, M.L., Baracat-Pereira, M.C., Brommonshenkel, S.H. e Fontes, E.P.B. Identification of a novel receptor-like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein. *Virology*, v.318, p.24-31. 2004.
- Matyis, J.C., Silva, D.M., Oliveira, A.R. e Costa, A.S. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. *Summa Phytopathologica*, v.1, p.267-275. 1975.
- McGarry, R.C., Barron, Y.D., Carvalho, M.F., Hill, J.E., Gold, D., Cheung, E., Kraus, W.L. e Lazarowitz, S.G. A novel *Arabidopsis* acetyltransferase interacts with the geminivirus movement protein NSP. *Plant Cell*, v.15, p.1605-1618. 2003.
- Melo, P.C.T. Mosca branca ameaça produção de hortaliças. Campinas, SP, Brazil: Asgrow do Brasil Sementes Ltda., Technical Bulletin 1992.
- Monci, F., Sanchez-Campos, S., Navas-Castillo, J. e Moriones, E. A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Virology*, v.303, p.317-326. 2002.

- Nagar, S., Hanley-Bowdoin, L. e Robertson, D. Host DNA replication is induced by geminivirus infection of differentiated plant cells. *Plant Cell*, v.14, p.2995-3007. 2002.
- Nagar, S., Pedersen, T.J., Carrick, K.M., Hanley-Bowdoin, L. e Robertson, D. A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. *Plant Cell*, v.7, p.705-719. 1995.
- Noueiry, A.O., Lucas, W.J. e Gilbertson, R.L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell*, v.76, p.925-932. 1994.
- Orozco, B.M. e 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. e Hanley-Bowdoin, L. Conserved sequence and structural motifs contribute to the DNA binding and cleavage activities of a geminivirus replication protein. *Journal of Biological Chemistry*, v.273, p.24448-24456. 1998.
- Orozco, B.M., Miller, A.B., Settlege, S.B. e Hanley-Bowdoin, L. Functional domains of a geminivirus replication protein. *Journal of Biological Chemistry*, v.272, p.9840-9846. 1997.
- Palmer, K.E. e Rybicki, E.P. The molecular biology of mastreviruses. *Advances in Virus Research*, v.50, p.183-234. 1998.
- Pedersen, T.J. e Hanley-Bowdoin. Molecular characterization of the AL3 protein encoded by a bipartite geminivirus. *Virology*, v.202, p.1070-1075. 1994.
- Pita, J.S., Fondong, V.N., Sangare, A., Otim-Nape, G.W., Ogwal, S. e Fauquet, C.M. Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. *Journal of General Virology*, v.82, p.655-665. 2001.
- Polston, J.E. e Anderson, P.K. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Disease*, v.81, p.1358-1369. 1997.
- Ramos, P.L., Guevara-Gonzalez, R.G., Peral, R., Ascencio-Ibanez, J.T., Polston, J.E., Arguello-Astorga, G.R., Vega-Arreguin, J.C. e Rivera-Bustamante, R.F. Tomato mottle Taino virus pseudorecombines with PYMV but not with ToMoV: Implications for the delimitation of cis- and trans-acting replication specificity determinants. *Archives of Virology*, v.148, p.1697-1712. 2003.
- Resende, R.O. e Cupertino, F.P. Doenças causadas por vírus em tomateiro. *Informe Agropecuário*, v.18, p.19-27. 1996.
- Rezende, E.A., Filgueira, F.A.R., Zerbini, F.M., Maciel-Zambolim, E., Fernandes, J.J. e Gilbertson, R.L. Tomato infected with geminivirus in greenhouse conditions at Uberlândia-MG, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v.21, p.424. 1996.
- Rezende, W.L., Militão Neto, V., Goulart, L.R., Giovanini, M.P., Juliatti, F.C. e Fernandes, J.J. Infecção mista em plantas de tomate infectadas por geminivírus, detectada por meio de LIS-SSCP-PCR. *Fitopatologia Brasileira*, v.22, p.338. 1997.
- Ribeiro, S.G., Ambrozevicius, L.P., Ávila, A.C., Bezerra, I.C., Calegario, R.F., Fernandes, J.J., Lima, M.F., Mello, R.N., Rocha, H. e Zerbini, F.M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology*, v.148, p.281-295. 2003.

- Ribeiro, S.G., Bezerra, I.C., Lima, M.F., Ávila, A.C. e Giordano, L.B. Occurrence of geminivirus in tomato plants in Bahia. VIII Encontro Nacional de Virologia (Resumos). São Lourenço, MG: SBV, 1996. 290 p.
- Ribeiro, S.G., Martin, D.P., Lacorte, C., Simões, I.C., Orlandini, D.R.S. e Inoue-Nagata, A.K. Molecular and biological characterization of *Tomato chlorotic mottle virus* suggests that recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses. *Phytopathology*, v.97, p.702-711. 2007.
- Ribeiro, S.G., Mello, L.V., Boiteux, L.S., Kitajima, E.W. e Faria, J.C. Tomato infection by a geminivirus in the Federal District, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v.19, p.330. 1994.
- Rojas, M.R., Gilbertson, R.L., Russell, D.R. e Maxwell, D.P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease*, v.77, p.340-347. 1993.
- Rojas, M.R., Hagen, C., Lucas, W.J. e Gilbertson, R.L. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology*, v.43, p.361-394. 2005.
- Rojas, M.R., Jiang, H., Salati, R., Xoconostle-Cazares, B., Sudarshana, M.R., Lucas, W.J. e Gilbertson, R.L. Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, tomato yellow leaf curl virus. *Virology*, v.291, p.110-125. 2001.
- Rojas, M.R., Noueir, A.O., Lucas, W.J. e Gilbertson, R.L. Bean dwarf mosaic geminivirus movement proteins recognize DNA in a form- and size-specific manner. *Cell*, v.95, p.105-113. 1998.
- Roth, B.M., Pruss, G.J. e Vance, V.B. Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Research*, v.102, p.97-108. 2004.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. e Maniatis, T. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001
- Sanderfoot, A.A., Ingham, D.J. e Lazarowitz, S.G. A viral movement protein as a nuclear shuttle. The geminivirus BR1 movement protein contains domains essential for interaction with BL1 and nuclear localization. *Plant Physiology*, v.110, p.23-33. 1996.
- Sanderfoot, A.A. e Lazarowitz, S.G. Cooperation in viral movement: The geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery. *Plant Cell*, v.7, p.1185-1194. 1995.
- Sanderfoot, A.A. e Lazarowitz, S.G. Getting it together in plant virus movement: Cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. *Trends in Cell Biology*, v.6, p.353-358. 1996.
- Santos, C.D.G., Ávila, A.C., Inoue-Nagata, A.K. e Resende, R.O. Espécies vegetais hospedeiras de begomovírus isolados de tomateiro em Goiás e no Distrito Federal. *Fitopatologia Brasileira*, v.29, p.450-455. 2004.
- Selth, L.A., Dogra, S.C., Rasheed, M.S., Healy, H., Randles, J.W. e Rezaian, M.A. A NAC domain protein interacts with *Tomato leaf curl virus* replication accessory protein and enhances viral replication. *Plant Cell*, v.17, p.311-325. 2005.

- Stanley, J. Analysis of African cassava mosaic virus recombinants suggest strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. *Virology*, v.206, p.707-712. 1995.
- Stanley, J., Bisaro, D.M., Briddon, R.W., Brown, J.K., Fauquet, C.M., Harrison, B.D., Rybicki, E.P. e Stenger, D.C. Family *Geminiviridae*. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. e Ball, L.A. (Ed.). *Virus Taxonomy*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p.301-326.
- Sunter, G., Hartitz, M.D., Hormuzdi, S.G., Brough, C.L. e Bisaro, D.M. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required for coat protein accumulation while ORF AL3 is necessary for efficient DNA replication. *Virology*, v.179, p.69-77. 1990.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. e Gibson, T.J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, v.22, p.4673-4680. 1994.
- Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, J.A., Brown, J.K., Becerra-Flora, A. e Rivera-Bustamante, R. Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the Southern United States. *Phytopathology*, v.86, p.1186-1192. 1996.
- Trinks, D., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P.V., Akbergenov, R., Oakeley, E.J., Veluthambi, K., Hohn, T. e Pooggin, M.A. Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. *Journal of Virology*, v.79, p.2517-2527. 2005.
- Van Der Biezen, E.A. e Jones, J.D. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Biochemical Sciences*, v.23, p.454-456. 1998.
- Van Wezel, R., Liu, H., Tien, P., Stanley, J. e Hong, Y. Gene C2 of the monopartite geminivirus *Tomato yellow leaf curl virus-China* encodes a pathogenicity determinant that is localized in the nucleus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.14, p.1125-1128. 2001.
- Vance, V. e Vaucheret, H. RNA silencing in plants - Defense and counterdefense. *Science*, v.292, p.2277-2280. 2001.
- Vanitharani, R., Chellappan, P., Pita, J.S. e Fauquet, C.M. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology*, v.78, p.9487-9498. 2004.
- Voinnet, O. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nature Reviews Genetics*, v.6, p.206-220. 2005.
- Voinnet, O., Pinto, Y.M. e Baulcombe, D.C. Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v.96, p.14147-14152. 1999.
- Wang, H., Buckley, K.J., Yang, X., Buchmann, R.C. e Bisaro, D.M. Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Journal of Virology*, v.79, p.7410-7418. 2005.
- Wang, H., Hao, L.H., Shung, C.Y., Sunter, G. e Bisaro, D.M. Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Plant Cell*, v.15, p.3020-3032. 2003.

- Xie, Q., Sanz-Burgos, A.P., Guo, H., Garcia, J.A. e Gutierrez, C. GRAB proteins, novel members of the NAC domain family, isolated by their interaction with a geminivirus protein. *Plant Molecular Biology*, v.39, p.647-656. 1999.
- Yang, X., Baliji, S., Buchmann, R.C., Wang, H., Lindbo, J.A., Sunter, G. e Bisaro, D.M. Functional modulation of the geminivirus AL2 transcription factor and silencing suppressor by self-interaction. *Journal of Virology*, v.81, p.11972-11981. 2007.
- Zerbini, F.M., Andrade, E.C., Barros, D.R., Ferreira, S.S., Lima, A.T.M., Alfenas, P.F. e Mello, R.N. Traditional and novel strategies for geminivirus management in Brazil. *Australasian Plant Pathology*, v.34, p.475-480. 2005.
- Zerbini, F.M., Zambolim, E.M., Carrijo, I.V. e Gilbertson, R.L. A new bipartite geminivirus infecting tomatoes in Minas Gerais, Brazil. *Phytopathology*, v.86, p.S1. 1996.

ANEXOS

Tabela A1. Lista de abreviaturas e números de acesso dos genomas virais utilizados para a comparação de sequências e análise filogenética.

Espécie	Sigla	No. de acesso no GenBank	
		DNA-A	DNA-B
<i>Abutilon mosaic virus</i>	AbMV	NC_001928	NC_001929
<i>African cassava mosaic virus</i>	ACMV	NC_001467	NC_001468
<i>Bean calico mosaic virus</i>	BCaMV	AF110189	AF110190
<i>Bean dwarf mosaic virus</i>	BDMV	NC_001931	NC_001930
<i>Bean golden mosaic virus</i>	BGMV	NC_004042	NC_004043
<i>Bean golden yellow mosaic virus</i>	BGYMV	NC_001439	NC_001438
<i>Beet curly top virus</i>	BCTV	NC_001412	n.d. ^a
<i>Beet mild curly top virus</i>	BMCTV	NC_004753	n.d.
<i>Beet severe curly top virus</i>	BSTCV	NC_004754	n.d.
<i>Bhendi yellow vein mosaic virus</i>	BYVMV	NC_003418	n.d.
<i>Cabbage leaf curl Jamaica virus</i>	CabLCuJV	DQ178614	n.d.
<i>Cabbage leaf curl virus</i>	CabLCuV	NC_003866	NC_003887
<i>Chino del tomate virus</i>	CdTV	NC_003830	NC_003831
<i>Clerodendrum golden mosaic virus</i>	CIGMV	DQ641692	DQ641693
<i>Cotton leaf crumple virus</i>	CLCrV	NC_004580	NC_004581
<i>Corchorus yellow spot virus</i>	CoYSV	DQ875868	DQ875869
<i>Corchorus yellow vein virus</i>	CoYVV	NC_006358	NC_006359
<i>Corchorus golden mosaic virus</i>	CoGMV	NC_009644	NC_009646
<i>Croton yellow vein mosaic virus</i>	CYVMV	NC_004300	n.d.
<i>Cucurbit leaf curl virus</i>	CuLCrV	NC_002984	NC_002985
<i>Desmodium leaf distortion virus</i>	DesLDV	NC_008494	NC_008495
<i>Dicliptera yellow mosaic Cuba virus</i>	DiYMCUV	AJ549960	n.d.
<i>Dicliptera yellow mosaic virus</i>	DiYMV	NC_003856	NC_003857
<i>Dolichos yellow mosaic virus</i>	DoYMV	AJ968370	n.d.
<i>Euphorbia mosaic virus</i>	EuMV	NC_008304	NC_008305
<i>Horseradish curly top virus</i>	HrCTV	NC_002543	n.d.
<i>Horsegram yellow mosaic virus</i>	HgYMV	NC_005635	NC_005636
<i>Indian cassava mosaic virus</i>	ICMV	NC_001932	NC_001933
<i>Ipomoea yellow vein virus</i>	IYVV	AJ132548	n.d.
<i>East African cassava mosaic virus</i>	EACMV	NC_004674	NC_004676
<i>Kudzu mosaic virus</i>	KuMV	NC_009645	NC_009647
<i>Loofa yellow mosaic virus</i>	LYMV	NC_004824	NC_004825
<i>Ludwigia yellow vein Vietnam virus</i>	LuYVVNV	DQ641699	n.d.
<i>Macroptilium golden mosaic virus</i>	MaGMV	EU158096	EU158097
<i>Macroptilium mosaic Puerto Rico virus</i>	MaMPRV	NC_004097	NC_004098
<i>Macroptilium yellow mosaic Florida virus</i>	MaYMFV	NC_004099	NC_004100
<i>Macroptilium yellow mosaic virus</i>	MaYMV	NC_010647	NC_010648
<i>Mungbean yellow mosaic India virus</i>	MYMIV	NC_004608	NC_004609
<i>Mungbean yellow mosaic virus</i>	MYMV	NC_001983	NC_001984
<i>Melon chlorotic leaf curl virus</i>	MCLCuV	NC_003865	NC_003860
<i>Merremia mosaic virus</i>	MeMV	NC_007965	NC_007966

Nicandra deforming necrosis virus	NDNV	n.d.	n.d.
Okra yellow mosaic Mexico virus	OYMMV	DQ022611	n.d.
Okra yellow mottle Iguala virus	OYMoIV	AY751753	n.d.
Papaya leaf curl virus	PLCV	NC_004147	n.d.
Pepper curly top virus	PepCTV	NC_009518	n.d.
Pepper golden mosaic virus	PepGMV	NC_004101	NC_004096
Pepper huasteco yellow vein virus	PHYVV	NC_001359	NC_001369
Potato yellow mosaic Panama virus	PYMPV	NC_002048	NC_002049
Potato yellow mosaic virus	PYMV	NC_001934	NC_001935
Rhynchosia mosaic Sinaloa virus	RhGMSV	DQ406672	DQ406673
Rhynchosia golden mosaic virus	RhGMV	NC_010294	NC_010293
Sida golden mosaic Costa Rica virus	SGMCRV	NC_004657	NC_004658
Sida golden mosaic virus	SGMV	NC_002046	NC_002047
Sida golden mosaic virus	SGMV	NC_002046	NC_002047
Sida golden yellow vein virus	SiGYVV	NC_004635	n.d.
Sida micrantha mosaic virus	SimMV-[A2B2]	NC_005330	NC_005331
	SimMV-[A3B1]	n.d.	AJ557452
Sida mottle virus	SiMoV-[A1B3]	AJ557450	AJ557454
	SiMoV	NC_004637	n.d.
Sida yellow mosaic virus	SiYMV	NC_004639	n.d.
Sida yellow mosaic Yucatan virus	SiYMYuV	NC_008779	NC_008780
Sida yellow vein virus	SiYVV	NC_004661	NC_004662
Soybean blistering mosaic virus	SoBIMV	EF016486	n.d.
Soybean crinkle leaf virus	SoCLV	NC_003357	n.d.
Spinach curly top virus	SpCTV	NC_005860	n.d.
Sweet potato leaf curl Georgia virus	SPLCGV	NC_004640	n.d.
Sweet potato leaf curl virus	SPLV	NC_004650	n.d.
Squash leaf curl virus	SqLCV	NC_001936	NC_001937
Squash mild leaf curl virus	SqMLCV	NC_004645	NC_004646
Tomato golden mosaic virus	TGMV	NC_001507	NC_001508
Tomato golden mottle virus	TGMoV	NC_008058	NC_008057
Tomato chino La Paz virus	ToChLPV	NC_005843	n.d.
Tomato chlorotic mottle virus	ToCMoV-[BA-Se1]	NC_003664	NC_003665
	ToCMoV-[MG-Bt1]	AY090557	n.d.
	ToCMoV-[MG-Ig1]	DQ336353	DQ336354
Tomato crinkle leaf yellows virus	ToCLYV	n.d.	AY090556
Tomato golden mottle virus	ToGMoV	NC_008058	NC_008057
Tomato leaf curl Cuba virus	ToLCCUV	AM050143	n.d.
Tomato leaf curl New Delhi virus	ToLCNDV	NC_004611	NC_004612
Tomato leaf curl Sinaloa virus	ToLCSV	NC_009606	NC_009605
Tomato mosaic Havana virus	ToMHV	NC_003867	NC_003868
Tomato mild leaf curl virus	ToMIMV	EU710752	EU710753
Tomato mottle Taino virus	ToMoTV	AF012300	AF012301
Tomato mottle virus	ToMoV	NC_001938	NC_001939
Tomato mild yellow leaf curl Aragua virus	ToMYLCAV	NC_009490	NC_009491
Tomato rugose mosaic virus	ToRMV	NC_002555	NC_002556
Tomato chlorotic mottle virus	ToCMoV-[BA-Se1]	NC_003664	NC_003665
Tomato severe leaf curl virus	TSLCV-[GT96]	NC_004642	n.d.

<i>Tomato pseudo-curly top virus</i>	TPCTV	NC_003825	n.d.
<i>Tomato severe rugose virus</i>	ToSRV-[GO]	NC_009607	NC_009612
	ToSRV-[MG]	AY029750	n.d.
<i>Tomato yellow leaf curl Thailand virus</i>	TYLCThV	NC_000869	NC_000870
<i>Tomato yellow margin leaf curl virus</i>	ToYMLCV	NC_005852	AY508994
<i>Tomato yellow spot virus</i>	ToYSV	NC_007726	NC_007727
<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	ToYVSV-[Ba3]	EF417915	EF417916
	ToYVSV-[G22]	EF459696	n.d.
	ToYVSV-[Ub]	n.d.	DQ336352
<i>Watermelon chlorotic stunt virus</i>	WmCSV	NC_003708	NC_003709

^an.d.: não disponível

Lista de figuras

Figura	Página	Descrição
1	7	Representação esquemática do genoma de um begomovírus típico. Os círculos representam o genoma viral, constituído de dois componentes (DNA-A e DNA-B) com aproximadamente 2.600 nucleotídeos cada um.
2	24	Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) da clivagem dos amplicons obtidos a partir de DNA total das amostras TP308 e C13a.
3	26	Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) das minipreparações de DNA plasmidial obtidas a partir de colônias contendo possíveis plasmídeos recombinantes.
4	27	Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) da clivagem de DNA plasmidial proveniente da clonagem dos componentes genômicos presentes nas amostras TP308 e C13a.
5	30	Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento das seqüências de nucleotídeos completas do DNA-A de espécies de begomovírus, incluindo os isolados BR:Pir1:05 e BR:Pda30:05.
6	32	Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento das seqüências de nucleotídeos completas do DNA-B de espécies de begomovírus, incluindo os isolados BR:Pir1:05 e BR:Pda30:05.
7	43	Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) da clivagem de DNA plasmidial para confirmação da obtenção dos clones “meia-cópia”.
8	45	Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) dos clones “meia-cópia” linearizados e dos fragmentos de 2600 nt correspondentes a uma cópia de cada componente genômico.
9	46	Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) das minipreparações de DNA plasmidial obtidas a partir de colônias contendo os possíveis clones infecciosos dos isolados ToSRV-[BR:Pir1:05] e ToYVSV-[BR:Pda30:05].
10	48	Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) da clonagem e orientação dos fragmentos de 2600 nt nos clones infecciosos dos isolados BR:Pir1:05 e BR:Pda30:05.
11	51	Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) da confirmação da infecção viral pelos isolados ToSRV-[BR:Pir1:05] (amostras 1-48) e ToYVSV-[BR:Pda30:05] (amostras 49-96) via PCR.

12	52	Confirmação da infecção viral pelo isolado ToSRV-[BR:Pir1:05] via hibridização molecular.
13	53	Sintomas observados em plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>N. benthamiana</i> e <i>N. glutinosa</i> inoculadas via biobalística com os clones infecciosos do isolado ToSRV-[BR:Pir1:05].
14	54	Plantas nas quais a infecção pelo isolado ToSRV-[BR:Pir1:05] foi confirmada via PCR e hibridização, porém sem sintomas macroscópicos.
15	55	Plantas nas quais a infecção pelo isolado ToYVSV-[BR:Pda30:05] foi confirmada via PCR e hibridização, porém sem sintomas macroscópicos.
