

EDUARDO CHUMBINHO DE ANDRADE

**ANÁLISE DE DETERMINANTES VIRAIS ENVOLVIDOS NA INDUÇÃO
DIFERENCIAL DE SINTOMAS POR BEGOMOVÍRUS
EM TOMATEIRO E *Nicotiana benthamiana***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2006

EDUARDO CHUMBINHO DE ANDRADE

ANÁLISE DE DETERMINANTES VIRAIS ENVOLVIDOS NA INDUÇÃO
DIFERENCIAL DE SINTOMAS POR BEGOMOVÍRUS
EM TOMATEIRO E *Nicotiana benthamiana*

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Fitopatologia, para
obtenção do título de “Doctor
Scientiae”

Aprovada: 22 de março de 2006.

Prof^a Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo
(Conselheira)

Prof. Sérgio Hermínio Brommonschenkel
(Conselheiro)

Profa. Elizabeth Pacheco Batista Fontes

Prof. Renato de Oliveira Resende

Prof. Francisco Murilo Zerbini Júnior
(Orientador)

CONTEÚDO

Resumo.....	v
Abstract	vii
Introdução Geral.....	1
Revisão de Literatura	5
Família <i>Geminiviridae</i>	5
Replicação viral	7
Movimento célula-a-célula e a longa distância	8
Outras interações geminivírus-hospedeiro	9
Diversidade genética de begomovírus em tomateiro.....	12
Literatura citada.....	15
Capítulo 1. <i>Tomato yellow spot virus</i> (ToYSV), a novel tomato-infecting begomovirus from Brazil with a recombinant origin, is capable of forming viable pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from <i>Sida</i> sp.	23
Summary.....	25
Introduction	26
Methods	28
Results	29
Discussion.....	32
References	36
Capítulo 2. Influência da taxa de replicação viral e do tropismo de tecido na indução diferencial de sintomas por begomovírus em tomateiro e <i>Nicotiana benthamiana</i>	47
Resumo	48
Abstract.....	49

Introdução.....	50
Material e Métodos.....	51
Resultados.....	54
Discussão.....	62
Literatura Citada.....	66
Capítulo 3. Análise parcial de regiões do genoma de begomovírus responsáveis pela indução diferencial de sintomas em tomateiro e <i>N. benthamiana</i>	69
Resumo.....	70
Abstract.....	71
Introdução.....	72
Material e Métodos.....	74
Resultados.....	78
Discussão.....	83
Literatura Citada.....	85

RESUMO

ANDRADE, Eduardo Chumbinho de, D.S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2006.
Análise de determinantes virais envolvidos na indução diferencial de sintomas por begomovírus em tomateiro e *Nicotiana benthamiana*. Orientador: Francisco Murilo Zerbini Junior. Conselheiros: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo e Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

Os vírus pertencentes à família *Geminiviridae* são caracterizados pelo genoma composto por DNA circular de fita simples, encapsidado em uma partícula icosaédrica geminada. As espécies do gênero *Begomovirus* possuem grande importância econômica. No Brasil, o tomateiro é infectado por um complexo com pelo menos oito espécies de begomovírus. Dentre estas, o *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) é uma espécie que desperta interesse, pois apesar de ter sido isolado do tomateiro, possui características moleculares e filogenéticas mais semelhantes às de begomovírus isolados de *Sida* sp. O ToYSV induz sintomas precoces e severos em tomateiro e em *Nicotiana benthamiana* em comparação a outros begomovírus, como o *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV). As diferenças na precocidade e na severidade dos sintomas podem ser devidas a um maior grau de adaptação do ToYSV a estes hospedeiros. Os objetivos deste trabalho foram estudar a natureza do relacionamento entre o ToYSV e outros begomovírus, e identificar os determinantes genéticos virais responsáveis pela indução diferencial de sintomas entre o ToYSV e o ToRMV. O ToYSV não foi capaz de formar pseudo-recombinantes viáveis com nenhum dos begomovírus isolados de *Sida*. Entre os begomovírus isolados de tomateiro, o ToYSV formou pseudo-recombinantes com o ToCrLYV (com o qual apresenta sequência conservada na origem de replicação) e com o TGMV (com o qual não apresenta sequência conservada). Esses resultados indicam que a proteína Rep do TGMV é capaz de reconhecer componentes

heterólogos com sequências distintas na origem de replicação, e demonstram que vírus com origem recombinante podem ser mais próximos, em termos de trans-replicação, de vírus com menor relacionamento filogenético, desde que a recombinação ocorra em uma região do genoma não envolvida na replicação viral. Em tomateiro, o acúmulo do ToYSV é inicialmente superior ao do ToRMV, entretanto o acúmulo de ambos os vírus se torna semelhante ao final do ciclo de infecção. Em *N. benthamiana* o acúmulo do ToYSV é bem superior ao do ToRMV durante toda a infecção. Ensaios de replicação em protoplastos de *Nicotiana tabacum* demonstraram que ambos os vírus replicam na mesma taxa. Em tomateiro, apenas células dos feixes vasculares apresentaram-se infectadas por ambos os vírus. Já em *N. benthamiana* o ToYSV foi detectado em células do mesófilo e dos feixes vasculares, enquanto o ToRMV permaneceu restrito ao floema, indicando que maior severidade dos sintomas induzidos pelo ToYSV nesse hospedeiro pode ser resultado de sua capacidade de invadir diferentes tecidos. Em tomateiro não ocorreu sinergismo entre os dois vírus, enquanto em *N. benthamiana* houve sinergismo, com maior acúmulo de DNA do ToRMV em infecção mista comparada à infecção simples. O sinergismo foi consequência da mudança do tropismo de tecido do ToRMV, que foi capaz de invadir o mesófilo em plantas com infecção mista. Genomas híbridos entre os dois vírus foram construídos e avaliados quanto ao ganho ou perda das características analisadas. Foram construídos dois recombinantes recíprocos, o primeiro baseado no ToRMV contendo os genes *MP* e *NSP* do ToYSV, e o segundo baseado no ToYSV porém contendo os genes *MP* e *NSP* do ToRMV. Em tomateiro, o ToRMV recombinante induziu sintomas e acumulou DNA de forma similar ao ToRMV. Em *N. benthamiana* o recombinante induziu sintomas mais severos e acumulou mais DNA em relação ao ToRMV, porém os sintomas foram menos severos em relação ao ToYSV. O ToRMV recombinante em *N. benthamiana* permaneceu restrito ao floema. O ToYSV recombinante, quando inoculado em tomateiro, induziu sintomas mais atenuados e acumulou menos DNA em comparação ao ToYSV, porém os sintomas foram mais severos em relação ao ToRMV. Similarmente, quando inoculado em *N. benthamiana* induziu sintomas menos severos do que o ToYSV. O ToYSV recombinante foi capaz de invadir e infectar células do mesófilo em *N. benthamiana*. Os resultados sugerem que os genes *MP* e *NSP* estão envolvidos na adaptação do ToYSV ao tomateiro e *N. benthamiana*, porém outros genes e/ou regiões reguladoras também devem estar envolvidos. Além disso a contribuição dos genes *MP* e *NSP* na adaptação de begomovírus é dependente do hospedeiro e do *background* genético do vírus.

ABSTRACT

ANDRADE, Eduardo Chumbinho de, D.S., Universidade Federal de Viçosa, March 2006.
Analysis of the viral genetic determinants of symptom induction by a begomovirus in tomato and *Nicotiana benthamiana*. Advisor: Francisco Murilo Zerbini Junior.
Committee members: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo and Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

Viruses in the family *Geminiviridae* are characterized by a single-stranded, circular DNA genome encapsidated in twinned icosahedral particles. Species in the genus *Begomovirus* have great economical importance. In Brazil, tomato plants are infected by a viral complex comprised of at least eight begomoviruses. Among them, *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) is particularly interesting since, despite having been isolated from tomato, it is closer in terms of phylogeny to begomoviruses from *Sida* sp. ToYSV induces earlier and more severe symptoms in tomato and *Nicotiana benthamiana* in comparison with other begomoviruses such as *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV). These differences could be due to a better adaptation (fitness) of ToYSV to these hosts. The objectives of this work were to analyze the nature of the relationship between ToYSV and other begomoviruses, and to identify the viral genetic determinants responsible for the differential symptom induction between ToYSV and ToRMV. ToYSV was unable to form viable pseudorecombinants with viruses from *Sida*. Among tomato begomoviruses, ToYSV formed pseudorecombinants with ToCrLYV (which has identical Rep binding sites to ToYSV) and with TGMV (which has different Rep binding sites). These results indicated that the TGMV Rep is versatile in terms of recognizing a heterologous DNA component with distinct Rep binding sites, and demonstrate that viruses with a recombinant origin can be closer in terms of trans-replication to viruses with low sequence identity, as long as the recombination occurred in a region of the genome

not involved in replication. In tomato, ToYSV reached a higher concentration than ToRMV at 14 dpi, but both viruses reached similar concentrations at 28 dpi. In *N. benthamiana*, ToYSV reaches a higher concentration than ToRMV at both time points. Viral replication in protoplasts is similar for both viruses. Both viruses are phloem-restricted in tomato. However, and unlike ToRMV, ToYSV infects mesophyll cells of *N. benthamiana*, which could explain its higher accumulation and symptom severity in this host. Synergism between the two viruses was observed only in *N. benthamiana*, as a result of changes in tissue tropism of ToRMV, which became capable of invading the mesophyll. Hybrid viruses were constructed between ToYSV and ToRMV, and were evaluated in terms of gain or loss of function. Two reciprocal recombinants were constructed, one based on ToRMV with the *MP* and *NSP* genes from ToYSV, and the other based on ToYSV with the *MP* and *NSP* genes from ToRMV. In tomato, the ToRMV-based recombinant behaved similarly to ToRMV in terms of symptom severity and DNA accumulation. In *N. benthamiana* the recombinant induced more severe symptoms and reached a higher concentration in comparison to ToRMV, but symptoms were less severe in relation to ToYSV. The ToRMV-based recombinant remained phloem-restricted in *N. benthamiana*. The ToYSV-based recombinant, when inoculated on tomato, induced attenuated symptoms and accumulated less DNA in comparison to ToYSV, however symptoms were more severe in relation to ToRMV. Similarly, when inoculated on *N. benthamiana* the recombinant induced attenuated symptoms in comparison to ToYSV. The ToYSV-based recombinant was capable of invading mesophyll cells of *N. benthamiana*. Together, the results indicate that the *MP* and *NSP* genes are involved in ToYSV adaptation to tomato and *N. benthamiana*, but other genes and/or regulatory regions must also be involved. Also, the contribution of the *MP* and *NSP* genes in begomovirus host adaptation is host- and virus-specific.

INTRODUÇÃO GERAL

A família *Geminiviridae* engloba vírus com genoma composto por uma fita simples de DNA circular, encapsidado em uma partícula icosaédrica geminada. A família é dividida em quatro gêneros (*Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus* e *Topocuvirus*), de acordo com o tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros, organização do genoma e relacionamento filogenético (Stanley *et al.*, 2005). Os begomovírus possuem grande importância econômica, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, sendo uma das maiores ameaças à agricultura nestas regiões (Briddon, 2003; Monci *et al.*, 2002; Morales & Anderson, 2001; Were *et al.*, 2004). Recentemente, a emergência de novas espécies de begomovírus infectando tomateiros nas Américas (Morales & Jones, 2004; Polston & Anderson, 1997; Ribeiro *et al.*, 2003) veio ressaltar de forma dramática o impacto causado por esses patógenos à agricultura.

O begomovírus são transmitidos naturalmente por *Bemisia tabaci* (Homoptera:Aleyrodidae), vulgarmente denominada “mosca-branca”. A incidência e os danos causados por esse inseto aumentaram exponencialmente no Brasil a partir da década de 70, em associação ao grande aumento da área plantada com soja. A soja é um excelente hospedeiro de *B. tabaci*, e sofre poucos danos com a presença da praga. A não adoção de medidas de controle permite que as populações de insetos atinjam níveis altíssimos, com a posterior migração para outras plantas após a colheita da soja. Esse contexto levou à disseminação do begomovírus *Bean golden mosaic virus* (BGMV), agente causal do mosaico dourado do feijoeiro, nos plantios de feijoeiro cultivados próximos às regiões produtoras de soja (Costa, 1975). O mosaico dourado continua causando grandes prejuízos à cultura do feijoeiro em pelo menos 12 países da América Latina (Faria *et al.*, 2000; Morales & Anderson, 2001).

Curiosamente, o aumento populacional de *B. tabaci* observado no Brasil durante as décadas de 1970 e 1980 não levou à disseminação de begomovírus na cultura do tomateiro, provavelmente porque o biótipo predominante naquela época (biótipo A) é pouco adaptado ao tomateiro. Na América Central e no Caribe predominava então o biótipo B (Brown & Bird, 1992). Ao contrário do biótipo A, o biótipo B possui maior gama de hospedeiros e é altamente adaptado para alimentação e oviposição em plantas de tomateiro, aumentando a probabilidade de transmissão de begomovírus para essa cultura (Schuster *et al.*, 1990). De fato, a partir do final da década de 1980 perdas consideráveis foram relatadas na cultura do tomateiro na Flórida e em países da América Central, do Caribe e México devido à infecção por begomovírus (Brown & Bird, 1992).

O biótipo B de *B. tabaci* foi relatado pela primeira vez no Brasil no início da década de 1990 (Melo, 1992), e devido a suas características de maior adaptabilidade se disseminou rapidamente pelas regiões quentes e secas do Brasil (Lourenção & Nagai, 1994). Concomitantemente, sintomas típicos de infecção por begomovírus em tomateiros foram relatados no Distrito Federal (Ribeiro *et al.*, 1994), Triângulo Mineiro (Rezende *et al.*, 1996; Zerbini *et al.*, 1996), São Paulo (Faria *et al.*, 1997), Rio de Janeiro (Galvão *et al.*, 1998) e na região Nordeste, incluindo o estado da Bahia (Ribeiro *et al.*, 1996) e a região do Sub-Médio São Francisco, então a principal região produtora de tomate para processamento industrial no Brasil (Bezerra *et al.*, 1997). A explicação mais provável para o rápido surgimento e disseminação de begomovírus na cultura do tomateiro é a colonização de plantas silvestres e daninhas pelo biótipo B de *B. tabaci*, possibilitando que vírus nativos presentes nestas plantas sejam transferidos para o tomateiro. A presença de diferentes begomovírus em um mesmo hospedeiro em infecções mistas aumenta a probabilidade de eventos de recombinação e/ou pseudo-recombinação entre componentes do genoma viral, o que pode levar ao surgimento de novas espécies mais adaptadas ao novo hospedeiro (no caso, o tomateiro).

A caracterização inicial das espécies de begomovírus associadas às epidemias em tomateiro nas regiões produtoras brasileiras revelou uma grande diversidade genética (Ambrozevicius *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2003), com a descrição de novas espécies como o *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) (Fernandes *et al.*, 2006), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) (Andrade *et al.*, 2002) e *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) (Calegario *et al.*, 2006), todas identificadas no estado de Minas Gerais.

O ToYSV é uma espécie que desperta interesse, pois apesar de ter sido isolado de tomateiro, suas características moleculares e filogenéticas são mais semelhantes às de begomovírus isolados de *Sida* sp., como o *Sida mottle virus* (SiMoV), *Sida yellow mosaic virus* (SiYMV) e *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV) (Calegario *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 1998; Jovel *et al.*, 2004). Essa relação é especialmente evidente ao se compararem as sequências de aminoácidos das proteínas responsáveis pelo movimento viral na planta, NSP (*nuclear shuttle protein*) e MP (*movement protein*), do ToYSV e do isolado B3 do SiMoV: o nível de identidade é superior a 90%. Além do seu papel direto no movimento viral, essas proteínas estão envolvidas na adaptação de begomovírus ao hospedeiro e na indução de sintomas (Petty *et al.*, 2000; Petty *et al.*, 1995; Schaffer *et al.*, 1995). Essas observações sugerem que o ToYSV pode ser originalmente um vírus que infectava *Sida*, transferido para o tomateiro pelo inseto vetor. Diversos levantamentos de campo realizados nos últimos anos demonstram que o ToYSV é uma espécie de ocorrência menos frequente do que o ToRMV e

ToCMoV em tomateiro (Ambrozevicius *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2005a; F.M. Zerbini *et al.*, *dados não publicados*).

Além das diferenças moleculares, o ToYSV possui características biológicas distintas em comparação ao ToRMV e ToCMoV. Porém, de forma aparentemente paradoxal em vista da baixa incidência desse vírus no campo, a principal distinção em termos de características biológicas é o fato do ToYSV induzir sintomas mais precoces e severos em tomateiro e em *Nicotiana benthamiana*, em comparação ao ToRMV e ToCMoV. A variação na precocidade e na severidade dos sintomas pode ser devida a diferenças nas características moleculares relatadas acima, conferindo um maior grau de adaptação do vírus ao hospedeiro. Uma maior adaptação ao hospedeiro pode ser consequência de uma interação mais eficiente entre fatores virais e do hospedeiro, podendo levar a uma maior taxa de replicação na célula, movimento célula-a-célula e a longa distância mais rápidos e eficientes, capacidade de invadir diferentes tecidos além do floema, no qual o vírus é inicialmente introduzido pelo inseto vetor (uma propriedade conhecida como tropismo de tecido) (Morra & Petty, 2000; Tyler & Fields, 1996), maior eficiência na transmissão pelo vetor e melhor supressão dos mecanismos de defesa da planta (Andrade *et al.*, 2004; Fontes *et al.*, 2004; Zerbini *et al.*, 2005). Caso um ou mais desses parâmetros sejam confirmados experimentalmente, pode-se sugerir que a baixa incidência do ToYSV no campo realmente seja devida à baixa eficiência de transmissão pelo inseto vetor.

Estudos realizados utilizando quimeras entre o *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) e o *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) em um hospedeiro comum, *Nicotiana benthamiana*, na qual o TGMV é mais adaptado (induz sintomas severos e infecta as células do mesófilo) e o BGYMV menos adaptado (não induz sintomas e permanece limitado às células do floema) (Morra & Petty, 2000) identificaram regiões do genoma do TGMV que, uma vez inseridas no genoma do BGYMV, tornam este capaz de invadir outros tecidos além do floema, ou seja, modificam seu tropismo de tecido. As regiões identificadas correspondem às regiões codificadoras das proteínas TrAP (*transactivation protein*, ou AC2) e NSP e à região não codificadora localizada entre a região comum e a ORF NSP, denominada BRi. Entretanto, o tropismo viral depende do hospedeiro, pois embora o TGMV infecte o mesófilo foliar em *N. benthamiana*, esse vírus é restrito ao floema em *Phaseolus vulgaris* (Morra & Petty, 2000). Estudos semelhantes realizados com duas estirpes de TGMV que induzem sintomas distintos identificaram uma região compreendendo a região 3' do gene codificador da proteína MP e a região intergênica do DNA-B (que não inclui a região BRi) como responsável pela diferença nos sintomas induzidos pelas duas estirpes (Saunders *et al.*, 2001).

Além da adaptação ao hospedeiro das proteínas virais necessárias para replicação e movimento viral, a capacidade do vírus em suprimir os mecanismos de defesa que serão ativados pela sua presença se torna imprescindível para o sucesso no processo de infecção. Trabalhos realizados por diferentes grupos de pesquisadores utilizando patossistemas distintos demonstraram que as proteínas TrAP, NS e AC4 são capazes de interagir e afetar mecanismos primários e específicos de defesa contra vírus invasores (Fontes *et al.*, 2004; Vanitharani *et al.*, 2004; Voinnet *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2005).

Se a transferência do ToYSV para o tomateiro é relativamente recente e sua incidência no campo é baixa, é importante determinar a natureza de seu relacionamento com outros begomovírus mais prevalentes em tomateiro, pois certamente em algum momento existirá uma infecção mista entre o ToYSV e um ou mais destes begomovírus no campo. Além disso, é importante saber se o maior relacionamento filogenético observado entre o ToYSV e os begomovírus que infectam *Sida* pode indicar uma origem em comum. Uma forma de analisar a natureza do relacionamento entre begomovírus é por meio de estudos de pseudo-recombinação entre componentes genômicos. Normalmente, apenas estirpes da mesma espécie viral são capazes de formar pseudo-recombinantes viáveis (Harrison, 1999), no entanto algumas exceções já foram relatadas (Frischmuth *et al.*, 1997b; Galvão *et al.*, 2003; Gilbertson *et al.*, 1993; Hofer *et al.*, 1997b), incluindo a formação de pseudo-recombinantes entre espécies de begomovírus originalmente isoladas de tomateiro e *Sida* sp. (Andrade *et al.*, 2004). Estudos de pseudo-recombinação poderão indicar o nível de relacionamento entre o ToYSV e outros begomovírus, além de sugerir possíveis eventos que poderão ocorrer em termos evolutivos.

A análise dos determinantes virais responsáveis pelas diferenças sintomatológicas observadas em tomateiro e *N. benthamiana* entre o ToYSV e outras espécies virais contribuirá para um melhor entendimento das interações responsáveis pela adaptação de begomovírus a seus hospedeiros. Após a identificação dos determinantes virais, estes poderão ser utilizados na busca e identificação de seus alvos potenciais no hospedeiro, contribuindo para a elucidação dos mecanismos bioquímicos e/ou moleculares envolvidos na indução de sintomas por begomovírus.

REVISÃO DE LITERATURA

Família *Geminiviridae*

A família *Geminiviridae* é caracterizada pela morfologia de partículas icosaédricas geminadas e genoma composto por DNA de fita simples circular (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). A família é subdividida em quatro gêneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus* e *Topocuvirus* (Stanley *et al.*, 2005). O gênero *Mastrevirus* inclui os geminivírus com um componente genômico transmitidos por cigarrinhas (Homoptera:Cicadellidae) a plantas monocotiledôneas. Este gênero inclui alguns patógenos importantes de culturas como o milho (*Maize streak virus*, MSV) e o trigo (*Wheat dwarf virus*, WDV). O gênero *Curtovirus* engloba geminivírus com um componente genômico transmitidos por cigarrinhas a espécies dicotiledôneas. O *Beet curly top virus* (BCTV) é a principal espécie de importância econômica. O gênero *Topocuvirus* possui apenas uma espécie (*Tomato pseudo-curly top virus*, TPCTV), com um componente genômico e transmitida por cigarrinhas (Homoptera: Auchenorrhyncha) a espécies dicotiledôneas. O gênero *Begomovirus* inclui espécies com um ou dois componentes genômicos transmitidas por mosca-branca (*Bemisia tabaci*) a espécies dicotiledôneas. Entre os begomovírus de maior importância econômica pode-se citar o BGMV, o *African cassava mosaic virus* (ACMV) e o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Moriones & Navas-Castillo, 2000; Were *et al.*, 2004). Atualmente mais de 130 espécies de begomovirus já foram descritas, incluindo mais de 40 espécies que podem infectar o tomateiro (Fauquet *et al.*, 2003).

Os begomovírus, em sua maioria, possuem genoma dividido em dois componentes, denominados DNA-A e DNA-B. No DNA-A encontram-se os genes que codificam as proteínas necessárias para a replicação viral e encapsidação. O DNA-B possui os genes codificadores das proteínas responsáveis pelo movimento do vírus na planta (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). Os componentes genômicos de uma mesma espécie viral não possuem identidade de seqüência, exceto por uma região intergênica com aproximadamente 200 nucleotídeos denominada região comum (RC), que é altamente conservada (acima de 90% de identidade para o DNA-A e DNA-B de uma determinada espécie). A partir da região intergênica divergem os genes virais, nos sentidos viral e complementar (Howarth *et al.*, 1985; Stanley, 1983) (Figura 1).

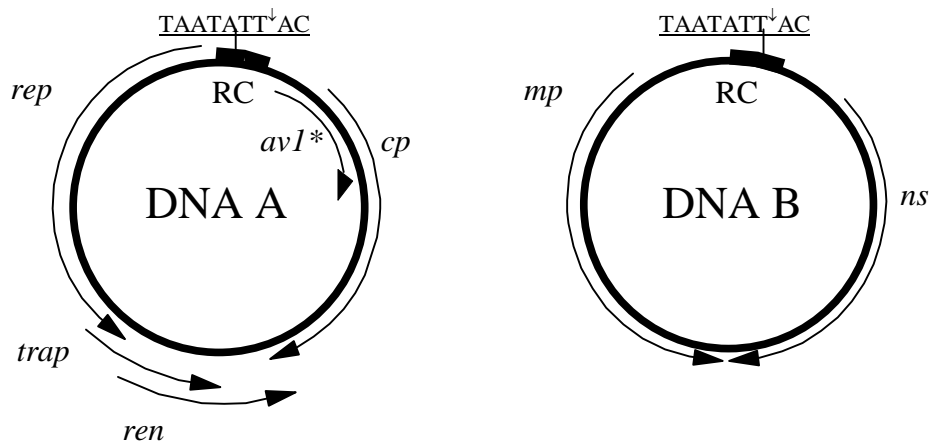


Figura 1. Representação esquemática do genoma de um begomovírus. As linhas grossas representam o genoma viral, dividido em dois componentes, cada um com aproximadamente 2.600 nucleotídeos. As setas indicam os genes virais e a direção em que ocorre a transcrição. A região comum (RC) também está indicada. A seqüência sublinhada, conservada em todos os membros da família *Geminiviridae*, constitui a origem de replicação do genoma viral. * Gene presente apenas nos begomovírus originários da Europa, Ásia e África (“Velho Mundo”).

O DNA-A dos begomovírus tem o potencial de codificar de quatro a seis proteínas: uma proteína associada à replicação (Rep, *Replication-Associated Protein*, anteriormente denominada AC1 ou AL1); uma proteína transativadora (TrAP, *Trans-Activating Protein*, anteriormente AC2 ou AL2) que ativa a transcrição dos genes *cp* e *ns* e está envolvida na supressão do silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) (Voinnet *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2005); a proteína Ren (*Replication-Enhancer Protein*, anteriormente AC3 ou AL3), fator de amplificação da replicação viral; e a proteína capsial (CP, *Coat Protein*, anteriormente AV1 ou AR1), essencial para a transmissão do vírus pelo inseto vetor (Bridson *et al.*, 1990; Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999; Hofer *et al.*, 1997a). O DNA-B codifica as proteínas MP (*Movement Protein*, anteriormente BC1 ou BL1) e NSP (*Nuclear Shuttle Protein*, anteriormente BV1 ou BR1), a primeira envolvida no movimento célula-a-célula do vírus por meio do aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas (Noueiry *et al.*, 1994), e a segunda responsável pelo transporte do DNA através do envelope nuclear (Sanderfoot *et al.*, 1996; Sanderfoot & Lazarowitz, 1995). Estudos recentes atribuíram à proteína codificada pela ORF AC4 de begomovírus que infectam mandioca a capacidade de suprimir PTGS (Vanitharani *et*

al., 2004). Nessas espécies, a supressão do PTGS pela proteína AC2 não seria eficiente (Vanitharani *et al.*, 2004).

Replicação viral

A replicação dos geminivírus ocorre no núcleo das células infectadas, e depende em grande parte da maquinaria celular do hospedeiro. O genoma circular de DNA fita simples é replicado por meio de um intermediário de fita dupla (conhecido como forma replicativa, RF), utilizando o mecanismo de círculo rolante, semelhante ao utilizado pelos bacteriófagos ϕ X174 e M13 (Stanley, 1995). Este intermediário de fita dupla serve como molde para a síntese dos novos componentes genômicos e também para a transcrição dos genes virais.

A origem de replicação (*ori*) está localizada na região intergênica comum entre os dois componentes genômicos. A *ori* possui uma organização modular, com pelo menos três módulos funcionais (Fontes *et al.*, 1994b). A sequência da *ori* é conservada entre componentes de um mesmo vírus, porém variável entre espécies, com exceção de uma região (módulo do início da replicação) de aproximadamente 30 nt que é essencial para a replicação (Davies *et al.*, 1987; Lazarowitz, 1992). Nesta região se localiza uma sequência repetida e invertida composta predominantemente por guanina e citosina, formando uma estrutura conservada (“structurally-conserved element”, SCE) em forma de grampo, com uma sequência invariável (5'-TAATATTAC-3') encontrada em todos os geminivírus (Lazarowitz, 1992) que constitui o domínio funcional da origem de replicação (Orozco *et al.*, 1998). É neste nonanucleotídeo que ocorre a clivagem (TAATATT↓AC) para início do processo de replicação por círculo rolante (Gutierrez, 1999; Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). Esta clivagem é realizada pela proteína Rep, que atua como uma endonuclease sítio-específica com requerimento de estrutura e de sequência (Laufs *et al.*, 1995; Orozco & Hanley-Bowdoin, 1998). Na RC encontram-se também sequências específicas para a ligação da proteína Rep (Fontes *et al.*, 1994b; Fontes *et al.*, 1992) e regiões promotoras da RNA polimerase tipo II, responsável pela transcrição dos genes virais (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999).

O sítio de ligação de Rep ao DNA está localizado entre a caixa TATA do gene *rep* e a SCE (Orozco *et al.*, 1998), e é constituído de duas sequências idênticas repetidas (denominados “iterons”). A ligação de Rep aos iterons é essencial para o início da replicação. Após a ligação de Rep ao DNA viral e estabilização do complexo formado por Rep, Ren e fatores do hospedeiro, a proteína Rep cliva o nonanucleotídeo localizado na SCE, dando início à replicação por círculo rolante (Gutierrez, 1999). O reconhecimento dos iterons por Rep é considerado vírus-específico (Argüello-Astorga *et al.*, 1994a; Harrison, 1999), de modo que Rep só inicia a replicação de seu DNA cognato. O domínio funcional da proteína Rep

responsável pelo reconhecimento foi mapeado em sua região N-terminal (Chatterji *et al.*, 1999; Gladfelter *et al.*, 1997; Jupin, 1995), e inclui o domínio de ligação a DNA, conservado entre todas as proteínas Rep. Arguello-Astorga & Ruiz-Medrano (2001), partindo da premissa de que o reconhecimento e ligação aos iterons por Rep é específico, propuseram que certos aminoácidos do domínio de ligação a DNA de Rep determinam a especificidade pela sequência dos iterons. Estes aminoácidos foram denominados determinantes de especificidade (*specific determinants*, SPDs). Através de análises comparativas entre Repls de mais de 120 geminivírus utilizando a sequência dos iterons como parâmetro, foi possível identificar uma região de aproximadamente 8-10 aminoácidos localizada acima do domínio de ligação a DNA, que apresenta uma correlação consistente entre sua sequência de aminoácidos e a sequência de nucleotídeos do iteron, ao nível de pareamento nucleotídeo-aminoácido. Estes resultados sugerem a existência de um código molecular regendo a especificidade de Rep pela sequência dos iterons (Arguello-Astorga & Ruiz-Medrano, 2001). No entanto, a formação de pseudo-recombinantes (vírus híbridos compostos pelo DNA-A de um vírus e o DNA-B de outro) viáveis entre componentes genômicos com diferentes iterons indica que a interação Rep-iterons não é a única forma de reconhecimento da proteína Rep pela origem de replicação. A descoberta dos agente sub-virais associados a begomovírus, que de modo geral não possuem iterons conservados com o vírus auxiliar, veio evidenciar esta versatilidade de Rep no reconhecimento e ligação à origem de replicação (Lin *et al.*, 2003; Stanley, 2004).

Movimento célula-a-célula e a longa distância

Para o estabelecimento de uma infecção sistêmica na planta é necessário que, após replicar na célula inicialmente infectada, o vírus mova para outras células e se espalhe por toda planta. O movimento no interior do hospedeiro pode ser dividido em dois processos: movimento célula-a-célula via plasmodesmas e movimento a longa distância, no qual o vírus atinge o sistema vascular e é transportado sistemicamente para toda a planta hospedeira. Para isto, os begomovírus codificam uma proteína não estrutural denominada MP. Essa proteína associa-se à membrana celular e possivelmente altera a arquitetura dos plasmodesmas, facilitando o transporte do genoma viral (Noueiry *et al.*, 1994). Como os begomovírus se multiplicam no núcleo da célula infectada, é necessária uma etapa adicional de transporte do núcleo para o citoplasma, que é realizada por uma segunda proteína de movimento denominada NSP. Estas duas proteínas de movimento, atuando de maneira cooperativa (Sanderfoot & Lazarowitz, 1995), permitindo ao vírus infectar sistemicamente o hospedeiro.

Mastrevírus e curtovírus são geralmente restritos ao floema, dependendo largamente do fluxo de fotoassimilados para sua dispersão. A proteína capsidial (CP) é essencial para este

processo, e o movimento no floema ocorre na forma de vírions. Entretanto, nos begomovírus, a proteína capsidial é dispensável para o estabelecimento de infecção sistêmica na maioria dos casos já estudados (Rojas *et al.*, 2005). Tanto MP quanto NSP reconhecem o DNA viral de maneira específica em relação à forma e comprimento (Gilbertson *et al.*, 2003; Rojas *et al.*, 1998), o que eliminaria a necessidade da presença da proteína capsidial para o movimento a longa distância.

As infecções causadas por geminivírus normalmente se restringem às células associadas ao floema (p.ex., BGMV em feijoeiro e *Nicotiana benthamiana*) (Morra & Petty, 2000). Entretanto, alguns begomovírus são capazes de infectar, além dos feixes vasculares, os tecidos associados ao mesófilo foliar (p.ex., TGMV em *N. benthamiana*) (Morra & Petty, 2000). Esta propriedade é conhecida como tropismo de tecido (Tyler & Fields, 1996). O tropismo de tecido possui dois componentes principais: fatores genéticos virais, que no caso dos begomovírus foram mapeados às regiões correspondentes aos genes TrAP e NSP/MP e à região reguladora da transcrição do gene NSP, denominada BRi, e fatores do hospedeiro, pois embora o TGMV infecte células do mesófilo foliar em *N. benthamiana*, esse vírus é restrito ao floema em *Phaseolus vulgaris* (Morra & Petty, 2000).

Outras interações geminivírus-hospedeiro

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 (Gilbertson *et al.*, 2003; Noueir *et al.*, 1994), respostas a diferentes mecanismos de defesa da planta (Fontes *et al.*, 2004; Trinks *et al.*, 2005; Vanitharani *et al.*, 2004; Wang *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; Luque *et al.*, 2002; Settlege *et al.*, 2001; revisado por Hanley-Bowdoin *et al.*, 2004).

A disseminação do vírus pela planta implica que novas células passam a ser infectadas, e muitas já se encontram totalmente diferenciadas. Como os geminivírus são totalmente dependentes de fatores do hospedeiro para sua proliferação, nestas células diferenciadas quase não ocorre síntese de DNA e, conseqüentemente, as enzimas e outros fatores responsáveis pela síntese de DNA não estão presentes. Assim, os geminivírus devem ser capazes de ativar a transcrição dos genes do hospedeiro envolvidos no processo de síntese de enzimas e outros fatores necessários para a replicação de DNA. Essa ativação se dá em

parte 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) comprovaram este fenômeno, encontrando proteínas do hospedeiro associadas à replicação do DNA em células totalmente diferenciadas infectadas pelo TGMV, as quais normalmente não apresentam níveis detectáveis dessas proteínas. Além da ativação, as proteínas de replicação dos geminivírus são capazes de interagir com proteínas do hospedeiro envolvidas na replicação de DNA, como a própria PCNA (Castillo *et al.*, 2003) e o fator de replicação C (Luque *et al.*, 2002).

Estes fatores envolvidos na replicação não estão presentes em células diferenciadas normalmente infectadas por geminivírus, de modo que o primeiro passo no processo de infecção é interferir com o controle do ciclo celular para induzir a síntese destas proteínas. Para isto, tanto Rep como Ren interagem com uma proteína relacionada a retinoblastoma (pRB) (Ach *et al.*, 1997). Esta proteína está envolvida no controle do ciclo celular, impedindo que ocorra a passagem da fase G1 para a fase S do ciclo celular. Membros da família pRB regulam negativamente a expressão de genes requeridos para a entrada na fase S e de genes que codificam proteínas envolvidas na replicação de DNA (Lavia, 1999). Além disso, Ren interage com a proteína SINAC1, pertencente à família de fatores de transcrição que possuem domínio NAC, levando a um maior acúmulo desta proteína, o que em contrapartida leva a um aumento no acúmulo de DNA viral (Selth *et al.*, 2005). É provável que a interação Ren-SINAC1 regule positivamente alguns genes envolvidos em processos que sejam vantajosos para a replicação dos geminivírus.

Outro pré-requisito para o sucesso da infecção viral é a capacidade do vírus em suprimir os mecanismos de defesa da planta. Os geminivírus interferem em diferentes respostas de defesa (Trinks *et al.*, 2005; Vanitharani *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2003), 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 em termos temporais, diminuindo o intervalo necessário para o estabelecimento da infecção sistêmica. Algumas dessas interações já foram identificadas, embora os mecanismos moleculares ainda não tenham sido totalmente elucidados.

Utilizando o sistema duplo-híbrido de levedura foi possível demonstrar que a proteína Trap interage e inativa duas proteínas cinase, designadas Adenosina Cinase (*Adenosine Kinase*, ADK) e SNF1 Cinase (*Sucrose Non-Fermenting 1*) (Hao *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003). Ambas proteínas são consideradas componentes de um sistema de defesa geral contra estresses bióticos. De fato, a inativação da SNF1 em *N. benthamiana* leva a um aumento na suscetibilidade da planta a infecção viral, possivelmente devido a sua função na regulação do metabolismo em respostas a estresses celulares que reduzem a disponibilidade de ATP (Hao

et al., 2003). Da mesma forma, a inativação de ADK pela proteína Trap torna a planta mais suscetível à infecção viral (Wang *et al.*, 2005). A proteína ADK é responsável pela fosforilação de adenosina, utilizando ATP para produzir 5'-AMP (Wang *et al.*, 2003). As duas interações provavelmente estão interligadas, pois a cinase SNF1 é ativada por 5'-AMP. O fato de Trap interagir com SNF1 e ADK demonstra que as respostas metabólicas mediadas por SNF1/ADK são um componente importante da resposta de defesa a vírus, e que os geminivírus desenvolveram uma estratégia de contra-ataque baseada na inativação dos dois componentes iniciais dessa via de defesa (SNF1 e ADK). Esses resultados demonstram ainda que genes responsáveis por processos metabólicos primários (*housekeeping genes*) 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 a nível pós-transcricional, por meio da degradação seqüência-específica de mRNAs alvos (Baulcombe, 2004). O silenciamento de RNA constitui também um mecanismo eficiente de defesa de plantas contra vírus (Vance & 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 (Trinks *et al.*, 2005; Van Wezel *et al.*, 2001; Vanitharani *et al.*, 2004; Voinnet *et al.*, 1999). 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 o silenciamento via inibição de ADK.

Interações envolvendo as proteínas de movimento dos geminivírus, MP e NSP, também já foram relatadas. McGarry *et al.* (2003) identificaram e caracterizaram funcionalmente uma acetiltransferase de *Arabidopsis* que interage diretamente com a NSP do *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV). Foi demonstrado que esta proteína, altamente conservada em plantas, é uma proteína nuclear que pode acetilar as histonas H2A e H3 *in vitro*, e também acetilar a proteína capsidial, mas não a proteína NSP. Além disso, não atua como um coativador transcricional *in vitro*. Esta acetiltransferase poderia regular o transporte núcleo-citoplasma do genoma viral, mediado por NSP, e outros eventos nucleares não-transcricionais nas células das plantas.

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). A interação entre as proteínas NIK e NSP foi alvo de um estudo posterior com o objetivo de elucidar sua função no ciclo de infecção viral (Fontes *et al.*, 2004). Neste estudo foi feita sua caracterização bioquímica, demonstrando-se que as cinases que interagem com NSP são proteínas com propriedades de receptores que se localizam em membranas, e que a interação com NSP inibe sua atividade. Dessa forma, a interação entre NSP e NIK seria uma outra forma de suprimir uma resposta de defesa da planta ao vírus.

Diversidade genética de begomovírus em tomateiro

Dentre as culturas economicamente mais importantes, uma das mais afetadas pelo aumento na incidência de begomovírus é o tomateiro (Morales & Anderson, 2001; Moriones & Navas-Castillo, 2000; Polston & Anderson, 1997; Ribeiro *et al.*, 2003). Em grande parte, este problema está associado ao aumento populacional do biótipo B do inseto vetor, a mosca-branca *Bemisia tabaci* (Morales & Jones, 2004; Naranjo & Ellsworth, 2001). O biótipo B é considerado por alguns autores como uma nova espécie, denominada *Bemisia argentifolii*, diferenciada com base em características morfológicas e em padrões de alozimas (Bellows *et al.*, 1994; França *et al.*, 1996). O biótipo B apresenta uma gama de hospedeiros muito mais ampla que o biótipo A, incluindo solanáceas como o tomateiro e outras plantas silvestres e/ou daninhas, além de possuir maior um grau de adaptação e dispersão (Bedford *et al.*, 1994). Com estas características, o inseto provavelmente trouxe para o tomateiro espécies de begomovírus nativos presentes nas plantas daninhas. Diversas espécies de begomovírus infectando plantas daninhas como *Sida rhombifolia* e *Ageratum conizoides* já foram isoladas e caracterizadas (Frischmuth *et al.*, 1997b; Tan *et al.*, 1995). O *Sida golden mosaic virus* (SiGMV), isolado a partir de *S. rhombifolia*, é capaz de infectar também plantas de tomateiro e feijoeiro (Frischmuth *et al.*, 1997a). Outros relatos podem ser encontrados na literatura associando infecções de plantas por geminivírus à presença de plantas daninhas nas lavouras (Creamer *et al.*, 1996; Roye *et al.*, 1997; Sánchez-Campos *et al.*, 1999; Umaharan *et al.*, 1998).

No Brasil, uma década após o relato da presença do novo biótipo de mosca-branca, levantamento realizado por meio do sequenciamento parcial do genoma de begomovírus infectando tomateiros nas regiões Sudeste e Nordeste indicou a presença de pelo menos sete novas espécies associadas à cultura (Ribeiro *et al.*, 2003). No estado de Minas Gerais foram

caracterizadas três novas espécies. A espécie predominante no Triângulo Mineiro foi denominada *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) (Fernandes *et al.*, 2000). Na Zona Metalúrgica foi descrito o *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) (Ambrozevicius *et al.*, 1999; Andrade *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2003). Isolados de ToCMoV também foram identificados no Rio de Janeiro, Espírito Santo e em estados do nordeste como Bahia e Pernambuco (Ribeiro *et al.*, 2003). Uma terceira espécie denominada *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) foi recentemente caracterizada (Calegario *et al.*, 2006). Além dessas três espécies, cujos genomas encontram-se clonados e foram totalmente sequenciados, relatos de possíveis novas espécies infectando o tomateiro continuam ocorrendo (Albuquerque *et al.*, 2004; Pires *et al.*, 2004), sugerindo que o processo de transferência de vírus nativos para o tomateiro, com a conseqüente evolução de novas espécies, ainda se encontra em andamento.

A coexistência em uma mesma planta de espécies virais pouco adaptadas ao hospedeiro favorece a ocorrência de recombinação e/ou pseudo-recombinação entre genomas virais, podendo levar ao surgimento de novas espécies mais adaptadas. No México, diversos begomovírus que infectam tomateiros foram descritos nos últimos quinze anos (Brown & Nelson, 1988; Brown & Poulos, 1990; Paplomatas *et al.*, 1994; Torres-Pacheco *et al.*, 1996). Muitos desses begomovírus apresentam conservação de seqüências em regiões específicas do genoma, indicando que o processo de evolução vem ocorrendo rapidamente, dando origem a novos vírus através de recombinação e/ou reagrupamento dos componentes do genoma (Hou & Gilbertson, 1996; Padidam *et al.*, 1999; Torres-Pacheco *et al.*, 1993). Resultados obtidos por diversos grupos de pesquisadores sugerem que esse processo de evolução, adaptação e seleção de espécies de begomovírus pode ocorrer em períodos de tempo relativamente curtos, da ordem de 10 a 15 anos (Hou & Gilbertson, 1996; Pita *et al.*, 2001; Sanz *et al.*, 2000).

No Brasil, resultados obtidos por Zerbini *et al.* (2002) evidenciam este evento. Os autores detectaram os componentes genômicos do ToRMV em *Nicandra physaloides* (joá-de-capote) e *Phaseolus vulgaris*, porém em associação com componentes genômicos distintos: o DNA-A do ToRMV foi detectado em *N. physaloides* em associação com um DNA-B desconhecido, e o DNA-B do ToRMV foi detectado em *P. vulgaris* em associação com um DNA-A desconhecido. Galvão *et al.* (2003) demonstraram que um isolado de ToCMoV obtido na região de Betim, MG, possui a capacidade de infectar sistemicamente plantas de *N. benthamiana*, mas não de tomateiro, sem a necessidade do DNA-B cognato. Comparações de seqüências demonstraram que esse isolado é resultado da recombinação entre o ToRMV e um isolado do ToCMoV da Bahia. Em conjunto, esses resultados indicam que os begomovírus associados ao tomateiro, a outras plantas cultivadas e a plantas daninhas em Minas Gerais

estão interagindo por meio de recombinação e pseudo-recombinação, provavelmente evoluindo em direção a uma maior adaptação ao tomateiro.

LITERATURA CITADA

- ACH, R.A.; DURFEE, T.; MILLER, A.B.; TARANTO, P.; HANLEY-BOWDOIN, L.; ZAMBRYSKI, P.C.; GRUISSEM, W. RRB1 and RRB2 encode maize retinoblastoma-related proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein. *Molecular and Cell Biology*, v. 17, p. 5077-5086, 1997.
- ALBUQUERQUE, L.C.; CARRIJO, F.R.F.; GIORDANO, L.B.; BOITEUX, L.S.; ÁVILA, A.C.; FONSECA, M.E.N.; NAGATA, T.; INOUE-NAGATA, A.K. A new begomovirus species in tomato crop in Central Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 29, p. S218-S219, 2004.
- AMBROZEVICIUS, L.P.; ANDRADE, E.C.; ZAMBOLIM, E.M.; FONTES, E.P.B.; ZERBINI, F.M. Incidence and host range of TGV-Ig, a bipartite *Begomovirus* from the "Zona Metalúrgica" of Minas Gerais, Brazil. *Virus Reviews and Research*, v. 4, p. 155, 1999.
- AMBROZEVICIUS, L.P.; CALEGARIO, R.F.; FONTES, E.P.B.; CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 27, p. 372-377, 2002.
- ANDRADE, E.C.; AMBROZEVICIUS, L.P.; CALEGARIO, R.F.; FONTES, E.P.B.; ZERBINI, F.M. Molecular cloning and characterization of *Tomato chlorotic mottle virus* (TCMV), a new tomato-infecting begomovirus. *Virus Reviews and Research*, v. 7, p. 153, 2002.
- ANDRADE, E.C.; LOPES, E.F.; ALFENAS, P.F.; FONTES, E.P.B.; RIBEIRO, S.G.; ZERBINI, F.M. Pseudorecombination between begomoviruses from tomato and *Sida* sp. In: 4th International Geminivirus Symposium (Programme and Abstracts), Cape Town, South Africa. *Anais*. p. P3-9, 2004.
- ARGÜELLO-ASTORGA, G.; HERRERA-ESTRELLA, L.; RIVERA-BUSTAMANTE, R. Experimental and theoretical definition of geminivirus origin of replication. *Plant Molecular Biology*, v. 26, p. 553-556, 1994.
- ARGUELLO-ASTORGA, G.; LOPEZ-OCHOA, L.; KONG, L.J.; OROZCO, B.M.; SETTLAGE, S.B.; 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.
- ARGUELLO-ASTORGA, G.R.; RUIZ-MEDRANO, R. An iteron-related domain is associated to Motif 1 in the replication proteins of geminiviruses: identification of potential interacting amino acid-base pairs by a comparative approach. *Archives of Virology*, v. 146, p. 1465-1485, 2001.
- 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.; MARKHAM, P.G. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographical regions. *Annals of Applied Biology*, v. 125, p. 311-325, 1994.
- BELLOWS, T.S.; PERRING, T.M.; GILL, R.J.; HEADRICK, D.H. Description of a new species of *Bemisia*. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 87, p. 195-206, 1994.

- BEZERRA, I.C.; LIMA, M.F.; RIBEIRO, S.G.; GIORDANO, L.B.; ZERBINI, F.M.; ÁVILA, A.C. Occurrence of geminivirus in tomato-producing areas in Submédio São Francisco. *Fitopatologia Brasileira*, v. 22, p. 331, 1997.
- BRIDDON, R.W. Cotton leaf curl disease, a multicomponent begomovirus complex. *Molecular Plant Pathology*, v. 4, p. 427-434, 2003.
- BRIDDON, R.W.; PINNER, M.S.; STANLEY, J.; MARKHAM, P.G. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology*, v. 177, p. 85-94, 1990.
- BROWN, J.K.; BIRD, J. Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean basin. *Plant Disease*, v. 76, p. 220-225, 1992.
- BROWN, J.K.; NELSON, M.R. Transmission, host range, and virus-vector relationships of chino del tomate virus, a whitefly-transmitted geminivirus from Sinaloa, Mexico. *Plant Disease*, v. 72, p. 866-869, 1988.
- BROWN, J.K.; POULOS, B.T. Serrano golden mosaic virus: A newly identified whitefly-transmitted geminivirus of pepper and tomato in the United States and Mexico. *Plant Disease*, v. 74, p. 720, 1990.
- CALEGARIO, R.F.; FERREIRA, S.S.; ANDRADE, E.C.; ZERBINI, F.M. Biological and molecular properties of *Tomato yellow spot virus*, (ToYSV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, submetido, 2006.
- CASTILLO, A.G.; COLLINET, D.; DERET, S.; KASHOGGI, A.; BEJARANO, E.R. Dual interaction of plant PCNA with geminivirus replication accessory protein (Ren) and viral replication protein (Rep). *Virology*, v. 312, p. 381-394, 2003.
- CHATTERJI, A.; PADIDAM, M.; BEACHY, R.N.; FAUQUET, C.M. Identification of replication specificity determinants in two strains of tomato leaf curl virus from New Delhi. *Journal of Virology*, v. 73, p. 5481-5489, 1999.
- COSTA, A.S. Increase in the populational density of *Bemisia tabaci*, a threat to widespread virus infection of legume crops in Brazil. pp.171 In: BIRD, J.; MARAMOROSCH, K. (Eds.) *Tropical Diseases of Legumes*. New York: Academic Press. 1975.
- CREAMER, R.; LUQUE-WILLIAMN, M.; HOWO, M. Epidemiology and incidence of beet curly top geminivirus in naturally infected weed hosts. *Plant Disease*, v. 80, p. 533-535, 1996.
- DAVIES, J.W.; STANLEY, J.; DONSON, J.; MULLINEAUX, P.M.; BOULTON, M.I. Structure and replication of geminivirus genomes. *Journal of Cell Science*, v. 7, p. 95-107, 1987.
- FARIA, J.C.; BEZERRA, I.C.; ZERBINI, F.M.; RIBEIRO, S.G.; LIMA, M.F. Situação atual das geminiviroses no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 25, p. 125-137, 2000.
- FARIA, J.C.; SOUZA-DIAS, J.A.C.; SLACK, S.; MAXWELL, D.P. A new geminivirus associated with tomato in the State of São Paulo, Brazil. *Plant Disease*, v. 81, p. 423, 1997.
- FAUQUET, C.M.; BISARO, D.M.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; HARRISON, B.D.; RYBICKI, E.P.; STENGER, D.C.; STANLEY, J. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family *Geminiviridae*, and an updated list of begomovirus species. *Archives of Virology*, v. 148, p. 405-421, 2003.
- FERNANDES, A.V.; ANDRADE, E.C.; ALFENAS, P.F.; GALVÃO, R.M.; ZERBINI, F.M.; FONTES, E.P.B. Clonagem e caracterização de novos geminivírus que infectam *Sida rhombifolia*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 23, p. 317, 1998.

- FERNANDES, J.J.; CARVALHO, M.G.; ANDRADE, E.C.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; FONTES, E.P.B.; ZERBINI, F.M. Biological and molecular properties of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Plant Pathology*, v. 55, DOI 10.1111/j.1365-3059.2006.01395.x, 2006.
- FERNANDES, J.J.; FONTES, E.P.B.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. Molecular cloning and sequencing of *Tomato rugose mosaic virus*, a geminivirus isolated from tomatoes at "Triângulo Mineiro", Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 25, p. 440, 2000.
- FERREIRA, S.S.; ALFENAS, P.F.; LIMA, A.T.M.; BARROS, D.R.; SENNA, L.; ZERBINI, F.M. Detecção de begomovírus em tomateiro no município de Paty de Alferes, Rio de Janeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 30, p. S183, 2005.
- FONTES, E.P.B.; GLADFELTER, H.J.; SCHAFFER, R.L.; PETTY, I.T.D.; HANLEY-BOWDOIN, L. Geminivirus replication origins have a modular organization. *Plant Cell*, v. 6, p. 405-416, 1994.
- FONTES, E.P.B.; LUCKOW, V.A.; HANLEY-BOWDOIN, L. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. *Plant Cell*, v. 4, p. 597-608, 1992.
- FONTES, E.P.B.; SANTOS, A.A.; LUZ, D.F.; WACLAWOVSKY, A.J.; CHORY, J. The geminivirus nuclear shuttle protein is a virulence factor that suppresses transmembrane receptor kinase activity. *Genes & Development*, v. 18, p. 2545-2556, 2004.
- FRANÇA, F.H.; VILLAS-BOAS, G.L.; CASTELO-BRANCO, M. Ocorrência de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera:Aleyrodidae) no Distrito Federal. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v. 25, p. 369-372, 1996.
- FRISCHMUTH, T.; ENGEL, M.; JESKE, H. Beet curly top virus DI DNA-mediated resistance is linked to its size. *Molecular Breeding*, v. 3, p. 213-217, 1997a.
- FRISCHMUTH, T.; ENGEL, M.; LAUSTER, S.; JESKE, H. Nucleotide sequence evidence for the occurrence of three distinct whitefly-transmitted, *Sida*-infecting bipartite geminiviruses in Central America. *Journal of General Virology*, v. 78, p. 2675-2682, 1997b.
- GALVÃO, R.M.; FERNANDES, A.V.; ALMEIDA, J.D.; ALFENAS, P.F.; ANDRADE, E.C.; FONTES, E.P.B. Molecular characterization of two new tomato-infecting geminiviruses and the *Sida*-infecting geminiviruses complex from Brazil. In: International Workshop on Bemisia and Geminiviral diseases, San Juan - Puerto Rico. *Anais*. p. L-93, 1998.
- GALVÃO, R.M.; MARIANO, A.C.; LUZ, D.F.; ALFENAS, P.F.; ANDRADE, E.C.; ZERBINI, F.M.; ALMEIDA, M.R.; FONTES, E.P.B. A naturally occurring recombinant DNA-A of a typical bipartite begomovirus does not require the cognate DNA-B to infect *Nicotiana benthamiana* systemically. *Journal of General Virology*, v. 84, p. 715-726, 2003.
- GILBERTSON, R.L.; HIDAYAT, S.H.; PAPLOMATAS, E.J.; ROJAS, M.R.; HOU, Y.-H.; MAXWELL, D.P. Pseudorecombination between infectious cloned DNA components of tomato mottle and bean dwarf mosaic geminiviruses. *Journal of General Virology*, v. 74, p. 23-31, 1993.
- GILBERTSON, R.L.; SUDARSHANA, M.; JIANG, H.; ROJAS, M.R.; LUCAS, W.J. Limitations on geminivirus genome size imposed by plasmodesmata and virus-encoded movement protein: Insights into DNA trafficking. *Plant Cell*, v. 15, p. 2578-2591, 2003.

- GLADFELTER, H.J.; EAGLE, P.A.; FONTES, E.P.B.; BATTS, L.; HANLEY-BOWDOIN, L. Two domains of the AL 1 protein mediate geminivirus origin recognition. *Virology*, v. 239, p. 186-197, 1997.
- GUTIERREZ, C. Geminivirus DNA replication. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 56, p. 313-329, 1999.
- HANLEY-BOWDOIN, L.; SETTLAGE, S.B.; OROZCO, B.M.; NAGAR, S.; ROBERTSON, D. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 18, p. 71-106, 1999.
- HANLEY-BOWDOIN, L.; SETTLAGE, S.B.; 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.; BISARO, D.M. Geminivirus AL2 and L2 proteins interact with and inactivate SNF1 kinase. *Plant Cell*, v. 15, p. 1034-1048, 2003.
- HARRISON, B.D.; ROBINSON, D.J. Natural genomic and antigenic variation in white-fly transmitted geminiviruses (begomoviruses). *Annual Review of Phytopathology*, v. 39, p. 369-398, 1999.
- HOFER, P.; BEDFORD, I.D.; MARKHAM, P.G.; JESKE, H.; FRISCHMUTH, T. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. *Virology*, v. 236, p. 288-295, 1997a.
- HOFER, P.; ENGEL, M.; JESKE, H.; FRISCHMUTH, T. Nucleotide sequence of a new bipartite geminivirus isolated from the common weed *Sida rhombifolia* in Costa Rica. *Virology*, v. 78, p. 1785-1790, 1997b.
- HOU, Y.M.; GILBERTSON, R.L. Increased pathogenicity in a pseudorecombinant bipartite geminivirus correlates with intermolecular recombination. *Journal of Virology*, v. 70, p. 5430-5436, 1996.
- HOWARTH, A.J.; CATON, J.; BOSSERT, M.; GOODMAN, R.M. Nucleotide sequence of bean golden mosaic virus and a model for gene regulation in geminiviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 82, p. 3572-3576, 1985.
- JOVEL, J.; RESKI, G.; ROTHENSTEIN, D.; RINGEL, M.; FRISCHMUTH, T.; JESKE, H. *Sida micrantha* mosaic is associated with a complex infection of begomoviruses different from *Abutilon mosaic virus*. *Archives of Virology*, v. 149, p. 829-841, 2004.
- JUPIN, I.; HEROCOURT, F.; BENZ, B.; GRONENBORN, B. DNA replication specificity of TYLCV geminivirus is mediated by the amino-terminal 116 amino acids of the Rep protein. *FEBS Letters*, v. 262, p. 116-120, 1995.
- LATHAM, J.R.; SAUNDERS, K.; PINNER, M.S.; 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.; GRONENBORN, B. Identification of the nicking tyrosine of geminivirus Rep protein. *FEBS Letters*, v. 377, p. 258-262, 1995.
- LAVIA, P.A., JANSEN-DURR, P. E2F target genes and cell-cycle check-point control. *BioEssays*, v. 21, p. 221-230, 1999.
- LAZAROWITZ, S.G. Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 11, p. 327-349, 1992.

- LIN, B.; AKBAR BEHJATNIA, S.A.; DRY, I.B.; RANGLES, J.W.; REZAIAN, M.A. High-affinity Rep-binding is not required for the replication of a geminivirus DNA and its satellite. *Virology*, v. 305, p. 353-363, 2003.
- LOURENÇÃO, A.L.; NAGAI, H. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. *Bragantia*, v. 53, p. 53-59, 1994.
- LUQUE, A.; SANZ-BURGOS, A.P.; RAMIREZ-PARRA, E.; CASTELLANO, M.M.; GUTIERREZ, C. Interaction of geminivirus Rep protein with replication factor C and its potential role during geminivirus DNA replication. *Virology*, v. 302, p. 83-94, 2002.
- MARIANO, A.C.; ANDRADE, M.O.; SANTOS, A.A.; CAROLINO, S.M.B.; OLIVEIRA, M.L.; BARACAT-PEREIRA, M.C.; BROMMONSHENKEL, S.H.; FONTES, E.P.B. Identification of a novel receptor-like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein. *Virology*, v. 318, p. 24-31, 2004.
- MCGARRY, R.C.; BARRON, Y.D.; CARVALHO, M.F.; HILL, J.E.; GOLD, D.; CHEUNG, E.; KRAUS, W.L.; LAZAROWITZ, S.G. A novel Arabidopsis acetyltransferase interacts with the geminivirus movement protein NSP. *Plant Cell*, v. 15, p. 1605-1618, 2003.
- MONCI, F.; SANCHEZ-CAMPOS, S.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E. A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Virology*, v. 303, p. 317-326, 2002.
- MORALES, F.J.; ANDERSON, P.K. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology*, v. 146, p. 415-441, 2001.
- MORALES, F.J.; JONES, P.G. The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. *Virus Research*, v. 100, p. 57-65, 2004.
- MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J. *Tomato yellow leaf curl virus*, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Research*, v. 71, p. 123-134, 2000.
- MORRA, M.R.; PETTY, I.T.D. Tissue specificity of geminivirus infection is genetically determined. *Plant Cell*, v. 12, p. 2259-2270, 2000.
- NAGAR, S.; PEDERSEN, T.J.; CARRICK, K.M.; HANLEY-BOWDOIN, L.; ROBERTSON, D. A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. *Plant Cell*, v. 7, p. 705-719, 1995.
- NARANJO, S.E.; ELLSWORTH, P.C. Challenges and opportunities for pest management of *Bemisia tabaci* in the new century. *Crop Protection*, v. 20, p. 707, 2001.
- NOUEIRY, A.O.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell*, v. 76, p. 925-932, 1994.
- OROZCO, B.M.; GLADFELTER, H.J.; SETTLAGE, S.B.; EAGLE, P.A.; GENTRY, R.N.; HANLEY-BOWDOIN, L. Multiple cis elements contribute to geminivirus origin function. *Virology*, v. 242, p. 346-356, 1998.
- OROZCO, B.M.; HANLEY-BOWDOIN, L. Conserved sequence and structural motifs contribute to the DNA binding and cleavage activities of a geminivirus replication protein. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, p. 24448-24456, 1998.
- PADIDAM, M.; SAWYER, S.; FAUQUET, C.M. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology*, v. 265, p. 218-224, 1999.

- PAPLOMATAS, E.J.; PATEL, V.P.; HOU, Y.M.; NOUEIRY, A.O.; GILBERTSON, R.L. Molecular characterization of a new sap-transmissible bipartite genome geminivirus infecting tomatoes in Mexico. *Phytopathology*, v. 84, p. 1215-1224, 1994.
- PETTY, I.T.; CARTER, S.C.; MORRA, M.R.; JEFFREY, J.L.; OLIVEY, H.E. Bipartite geminivirus host adaptation determined cooperatively by coding and noncoding sequences of the genome. *Virology*, v. 277, p. 429-438, 2000.
- PETTY, I.T.D.; MILLER, C.G.; MEADE-HASH, T.J.; SCHAFFER, R.L. Complementable and noncomplementable host adaptation defects in bipartite geminiviruses. *Virology*, v. 212, p. 263-267, 1995.
- PIRES, S.R.; ANDRADE, E.C.; ZERBINI, F.M. Detection of a possible new begomovirus species infecting tomato in Minas Gerais state. *Virus Reviews and Research*, v. 9, p. 122, 2004.
- PITA, J.S.; FONDONG, V.N.; SANGARE, A.; OTIM-NAPE, G.W.; OGWAL, S.; FAUQUET, C.M. Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. *Journal of General Virology*, v. 82, p. 655-665, 2001.
- POLSTON, J.E.; ANDERSON, P.K. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Disease*, v. 81, p. 1358-1369, 1997.
- REZENDE, E.A.; FILGUEIRA, F.A.R.; ZERBINI, F.M.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; FERNANDES, J.J.; GILBERTSON, R.L. Tomato infected with geminivirus in greenhouse conditions at Uberlândia-MG, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 21, p. 424, 1996.
- RIBEIRO, S.G.; AMBROZEVICIUS, L.P.; ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; CALEGARIO, R.F.; FERNANDES, J.J.; LIMA, M.F.; MELLO, R.N.; ROCHA, H.; ZERBINI, F.M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology*, v. 148, p. 281-295, 2003.
- RIBEIRO, S.G.; BEZERRA, I.C.; LIMA, M.F.; ÁVILA, A.C.; GIORDANO, L.B. Occurrence of geminivirus in tomato plants in Bahia. In: VIII Encontro Nacional de Virologia (Anais), São Lourenço, MG. p. 290, 1996.
- RIBEIRO, S.G.; MELLO, L.V.; BOITEUX, L.S.; KITAJIMA, E.W.; FARIA, J.C. Tomato infection by a geminivirus in the Federal District, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 19, p. 330, 1994.
- ROJAS, M.R.; HAGEN, C.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology*, v. 43, p. 361-394, 2005.
- ROJAS, M.R.; NOUEIRY, A.O.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. Bean dwarf mosaic geminivirus movement proteins recognize DNA in a form- and size-specific manner. *Cell*, v. 95, p. 105-113, 1998.
- ROTH, B.M.; PRUSS, G.J.; VANCE, V.B. Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Research*, v. 102, p. 97-108, 2004.
- ROYE, M.E.; MCLAUGHLIN, W.A.; NAKHLA, M.K.; MAXWELL, D.P. Genetic diversity among geminiviruses associated with the weed species *Sida* spp., *Macroptilium lathyroides*, and *Wissadula amplissima* from Jamaica. *Plant Disease*, v. 81, p. 1251-1258, 1997.
- SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; NAVAS-CASTILLO, J.; CAMERO, R.; SORIA, C.; DÍAZ, J.A.; MORIONES, E. Displacement of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)-Sr by TYLCV-Is in tomato epidemics in Spain. *Phytopathology*, v. 89, p. 1038-1043, 1999.

- SANDERFOOT, A.A.; INGHAM, D.J.; LAZAROWITZ, S.G. A viral movement protein as a nuclear shuttle. The geminivirus BR1 movement protein contains domains essential for interaction with BL1 and nuclear localization. *Plant Physiology*, v. 110, p. 23-33, 1996.
- SANDERFOOT, A.A.; LAZAROWITZ, S.G. Cooperation in viral movement: The geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery. *Plant Cell*, v. 7, p. 1185-1194, 1995.
- SANZ, A.I.; FRAILE, A.; GARCÍA-ARENAL, F.; ZHOU, X.; ROBINSON, D.J.; KHALID, S.; BUTT, T.; HARRISON, B.D. Multiple infection, recombination and genome relationships among begomovirus isolates found in cotton and other plants in Pakistan. *Journal of General Virology*, v. 81, p. 1839-1849, 2000.
- SAUNDERS, K.; WEGE, C.; VELUTHAMBI, K.; JESKE, H.; STANLEY, J. The distinct disease phenotypes of the common and yellow vein strains of Tomato golden mosaic virus are determined by nucleotide differences in the 3'-terminal region of the gene encoding the movement protein. *Journal of General Virology*, v. 82, p. 45-51, 2001.
- SCHAFFER, R.L.; MILLER, C.G.; PETTY, I.T.D. Virus and host-specific adaptations in the BL1 and BR1 genes of bipartite geminiviruses. *Virology*, v. 214, p. 330-338, 1995.
- SCHUSTER, D.J.; MUELLER, T.F.; KRING, J.B.; PRICE, J.F. Relationship of the sweetpotato whitefly to a new tomato fruit disorder. *HortScience*, v. 25, p. 1618-1620, 1990.
- SELTH, L.A.; DOGRA, S.C.; RASHEED, M.S.; HEALY, H.; RANGLES, J.W.; 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.
- SETTLAGE, S.B.; MILLER, A.B.; GRUISSEM, W.; HANLEY-BOWDOIN, L. Dual interaction of a geminivirus replication accessory factor with a viral replication protein and a plant cell cycle regulator. *Virology*, v. 279, p. 570-576, 2001.
- STANLEY, J. Infectivity of the cloned geminivirus genome requires sequences from both DNAs. *Nature*, v. 305, p. 643-645, 1983.
- STANLEY, J. Analysis of African cassava mosaic virus recombinants suggest strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. *Virology*, v. 206, p. 707-712, 1995.
- STANLEY, J. Subviral DNAs associated with geminivirus disease complexes. *Veterinary Microbiology*, v. 98, p. 121-129, 2004.
- STANLEY, J.; BISARO, D.M.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; FAUQUET, C.M.; HARRISON, B.D.; RYBICKI, E.P.; STENGER, D.C. Family *Geminiviridae*. pp.301-326 In: FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. (Eds.) *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier Academic Press. 2005.
- TAN, P.H.; WONG, S.M.; WU, M.; BEDFORD, I.D.; SAUNDERS, K.; STANLEY, J. Genome organization of ageratum yellow vein virus, a monopartite whitefly-transmitted geminivirus isolated from a common weed. *Journal of General Virology*, v. 76, p. 2915-2922, 1995.
- TORRES-PACHECO, I.; GARZÓN-TIZNADO, J.A.; BROWN, J.K.; BECERRA-FLORA, A.; RIVERA-BUSTAMANTE, R. Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the Southern United States. *Phytopathology*, v. 86, p. 1186-1192, 1996.
- TORRES-PACHECO, I.; GARZÓN-TIZNADO, J.A.; HERRERA-ESTRELA, L.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. Complete nucleotide sequence of pepper huasteco virus: Analysis

- and comparison with bipartite geminiviruses. *Journal of General Virology*, v. 74, p. 2225-2231, 1993.
- TRINKS, D.; RAJESWARAN, R.; SHIVAPRASAD, P.V.; AKBERGENOV, R.; OAKELEY, E.J.; VELUTHAMBI, K.; HOHN, T.; POOGGIN, M.A. Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. *Journal of Virology*, v. 79, p. 2517-2527, 2005.
- TYLER, K.L.; FIELDS, B.N. Pathogenesis of viral infections. pp.173-218 In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Eds.) *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 1996.
- UMAHARAN, P.; PADIDAM, M.; PHELPS, R.H.; BEACHY, R.N.; FAUQUET, C.M. Distribution and diversity of geminiviruses in Trinidad and Tobago. *Virology*, v. 88, p. 1262-1268, 1998.
- VAN WEZEL, R.; LIU, H.; TIEN, P.; STANLEY, J.; HONG, Y. Gene C2 of the monopartite geminivirus *Tomato yellow leaf curl virus*-China encodes a pathogenicity determinant that is localized in the nucleus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 14, p. 1125-1128, 2001.
- VANCE, V.; VAUCHERET, H. RNA silencing in plants - Defense and counterdefense. *Science*, v. 292, p. 2277-2280, 2001.
- VANITHARANI, R.; CHELLAPPAN, P.; PITA, J.S.; FAUQUET, C.M. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of postranscriptional gene silencing. *Journal of Virology*, v. 78, p. 9487-9498, 2004.
- VOINNET, O.; PINTO, Y.M.; BAULCOMBE, D.C. Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 96, p. 14147-14152, 1999.
- WANG, H.; BUCKLEY, K.J.; YANG, X.; BUCHMANN, R.C.; BISARO, D.M. Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. *J. Virol.*, v. 79, p. 7410-7418, 2005.
- WANG, H.; HAO, L.H.; SHUNG, C.Y.; SUNTER, G.; BISARO, D.M. Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Plant Cell*, v. 15, p. 3020-3032, 2003.
- WERE, H.K.; WINTER, S.; MAISS, E. Viruses infecting cassava in Kenya. *Plant Disease*, v. 88, p. 17-22, 2004.
- XIE, Q.; SANZ-BURGOS, A.P.; GUO, H.; GARCIA, J.A.; 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.
- ZERBINI, F.M.; ZAMBOLIM, E.M.; FERNANDES, J.J.; GILBERTSON, R.L.; CARRIJO, I.V. Um novo geminivírus isolado de tomateiro (*L. esculentum*) em Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira*, v. 21, p. 430, 1996.
- ZERBINI, F.M.; FERNANDES, J.J.; FONTES, E.P.B.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; CARVALHO, M.G. Association of the DNA components of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) with distinct geminivirus DNA components in *Nicandra physaloides* and *Phaseolus vulgaris*. In: XII International Congress of Virology (Abstracts), Paris, França. Anais. p. 147, 2002.
- ZERBINI, F.M.; ALFENAS, P.F.; ANDRADE, E.C. O silenciamento de RNA como um mecanismo de defesa de plantas a vírus. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v. 13, p. 191-246, 2005.

CAPÍTULO 1

***Tomato yellow spot virus* (ToYSV), A NOVEL TOMATO-INFECTING
BEGOMOVIRUS FROM BRAZIL WITH A RECOMBINANT ORIGIN, IS CAPABLE
OF FORMING VIABLE PSEUDORECOMBINANTS WITH BEGOMOVIRUSES
FROM TOMATO BUT NOT FROM *Sida* SP.**

Andrade, E.C., Manhani, G.G., Calegario, R.F., Fontes E.P.B. & Zerbini, F.M. *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), a novel tomato-infecting begomovirus from Brazil with a recombinant origin, is capable of forming viable pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from *Sida* sp. *Journal of General Virology*, submetido.

Tomato yellow spot virus (ToYSV), a novel tomato-infecting begomovirus from Brazil with a recombinant origin, is capable of forming viable pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from *Sida* sp.

E.C. Andrade¹, G.G. Manhani¹, R.F. Calegario¹, E.P.B. Fontes² and F.M. Zerbini¹

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil

²Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil, 36570-000

Running title: Pseudorecombination among Brazilian begomoviruses

Word in text: 4285

Words in summary: 249

Number of Figures and Tables: 3 Figures, 2 Tables

Corresponding author: F. M. Zerbini

Fax: (+55-31) 3899-2240; E-mail: zerbini@ufv.br

SUMMARY

Geminiviruses are characterized by a circular, single-stranded DNA genome and twinned icosahedral particles. Begomoviruses (whitefly-transmitted geminiviruses) are a major constraint to crop production worldwide. In Brazil, tomato-infecting begomoviruses emerged as serious pathogens over the last ten years, due to the introduction of a new biotype of the insect vector. *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) is a novel begomovirus with a recombinant origin including sequences from a *Sida*-infecting virus and an unknown parent. Considering the severe symptoms induced in tomato, we carried out a study to determine the viability of pseudorecombinants formed between the DNA components of ToYSV and other weed- and tomato-infecting begomoviruses from Brazil which cause milder symptoms but are more prevalent in the field. Despite its close relationship with other weed-infecting viruses, ToYSV was only capable of forming viable pseudorecombinants with tomato viruses. One pseudorecombinant was formed between ToYSV and Tomato crinkle leaf yellows virus (TCrLYV). The origin of replication of these two viruses has identical Rep-binding sequences, which probably explain the viability and the severe symptoms induced by the pseudorecombinant. However, the other pseudorecombinant was formed between ToYSV and Tomato golden mosaic virus (TGMV), which has different Rep-binding sequences. Together, our results indicate that the TGMV Rep protein is versatile in terms of recognizing heterologous DNA components, and demonstrate that a virus with a recombination origin can actually be closer in terms of trans-replication to viruses with low sequence identity, as long as the recombination occurred in a region of the genome not involved in replication.

INTRODUCTION

Plant viruses of the *Geminiviridae* family are characterized by possessing a genome composed of one or two circular, single-stranded DNA molecules, encapsulated in a unique particle morphology of twinned incomplete icosahedra. The family is divided into four genera based on host range, insect vector and genome organization. Species in the genus *Begomovirus* are transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci* to dicotyledonous plants and have a genome composed of one (monopartite) or two (bipartite) ssDNA molecules of approximately 2.6 kb each (Stanley *et al.*, 2005). For bipartite begomoviruses the two genomic components are referred to as DNA-A and DNA-B. The gene products encoded by the DNA-A are responsible for viral replication (*rep* and *ren*), regulation of gene expression and suppression of RNA silencing (*trap*), and particle encapsidation (*cp*) (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). The DNA-B encodes for two proteins, MP and NSP, involved in inter- and intracellular trafficking within the plant, host range and symptom modulation (Ingham *et al.*, 1995; Lazarowitz & Beachy, 1999; Schaffer *et al.*, 1995).

The two cognate DNA components have no sequence homology, sharing only a “common region” (CR) of approximately 200 bp with high sequence identity (>90%). The CR contains the origin of replication (*ori*) and several sequence elements required for DNA replication (Chatterji *et al.*, 1999; Eagle *et al.*, 1994; Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999; Laufs *et al.*, 1995). One of these elements consists of two tandemly repeated sequences (iterons) located near the origin of replication. The iterons are binding sites for the cognate Rep protein to initiate viral replication (Argüello-Astorga *et al.*, 1994a; Fontes *et al.*, 1994b), and the specificity of the Rep/iteron binding is a major determinant in the formation of viable pseudorecombinants between different species/strains of begomoviruses (Argüello-Astorga *et al.*, 1994a; Chatterji *et al.*, 1999; Eagle *et al.*, 1994; Fontes *et al.*, 1994b). The formation of viable pseudorecombinants indicates that factors responsible for replication and movement can be interchangeable between non cognate DNA components, and can be used as molecular tools to investigate begomovirus evolution.

Begomoviruses are considered to be one of the most economically important groups of plant viruses due to their high incidence and disease severity in tropical and sub-tropical areas of the world (Briddon, 2003; Morales & Anderson, 2001; Moriones & Navas-Castillo, 2000; Were *et al.*, 2004). In Brazil, begomoviruses have been a limiting factor for bean production since the 1970's (Costa, 1976), and in tomatoes since the mid-1990's (Ribeiro *et al.*, 2003). The first report of a tomato-infecting geminivirus in Brazil was made by Matyis *et al.* (1975). The virus was purified and named *Tomato golden mosaic virus* (TGMV). Tomato golden mosaic, however, was never an important disease, probably because the A biotype of the

insect, the only one present in Brazil at that time, colonizes tomatoes at low efficiency (Bedford *et al.*, 1994). After the introduction of the B biotype in the early 1990's (Lourenção & Nagai, 1994), the emergence and spread of tomato-infecting begomoviruses were immediate. Preliminary molecular studies indicated the presence of several putative new species (Ribeiro *et al.*, 1998). Further studies demonstrated that begomoviruses causing severe diseases in tomato crops throughout the country belonged to at least seven new species (Ambrozevicius *et al.*, 2002; Fernandes *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2003). This quick emergence is thought to have occurred due to the presence of indigenous begomoviruses infecting weed species like *Malva* and *Sida*. These native viruses would have been transferred to tomato by the B biotype of the insect vector. In the new host, mixed infections would have facilitated recombination or pseudorecombination events leading to the formation of novel, better adapted species. Evidence in support of this hypothesis includes the finding of several interspecies recombination events in natural mixed infections (Monci *et al.*, 2002; Rothenstein *et al.*, 2006), and the formation of infectious pseudorecombinants naturally (Pita *et al.*, 2001; Zerbini *et al.*, 2002) or under laboratory conditions via the exchange of cloned DNA components from different bipartite begomoviruses (Gilbertson *et al.*, 1993; Hou *et al.*, 1998; Ramos *et al.*, 2003; Unseld *et al.*, 2000a).

Tomato yellow spot virus (ToYSV) is a new begomovirus recently described in tomatoes in Brazil (Calegario *et al.*, 2006). The virus has a low prevalence in the field but causes severe symptoms in tomato and artificial hosts such as *Nicotiana benthamiana* (Ambrozevicius *et al.*, 2002; Calegario *et al.*, 2006; F.M. Zerbini *et al.*, *unpublished results*), unlike *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) and *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), two other species recently characterized, which are highly prevalent in the field but induce relatively mild symptoms (Ambrozevicius *et al.*, 2002; Fernandes *et al.*, 2006; Galvão *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2003). Also unlike ToRMV and ToCMoV, ToYSV is readily sap-transmissible to several solanaceous hosts such as tobacco and sweet pepper (but not to tomato) (Calegario *et al.*, 2006). The analyzes of ToYSV properties, as well as its relationships with other tomato- and weed-infecting begomoviruses from Brazil, may help us to understand the mechanisms involved in symptom severity and provide clues as to why some begomovirus species are prevalent in a given geographical area in detriment of others. Here, we studied the formation of viable pseudorecombinants between ToYSV and previously characterized Brazilian begomoviruses from tomato and *Sida rhombifolia*, the first step in this analysis. Results are discussed within the context of begomovirus emergence and evolution.

METHODS

Sequence comparisons and recombination analysis. Partial nucleotide and amino acid sequences of ToYSV and the additional begomoviruses used in the pseudorecombination assays (see Table 1 for the complete list and GenBank accession numbers) were aligned using Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). Percent nucleotide and amino acid sequence identities for the entire genome and for the Rep protein were calculated using DNAMAN ver. 4.0 (Lynnon BioSoft). Nucleotide identities were calculated using the following parameters: K-tuple = 2, Gap open = 10, Gap penalty = 7, and Gap extension = 5. Amino acid identities were calculated using the BLOSUM matrix with the following parameters: K-tuple = 2, Gap open = 10, Gap penalty = 4, and Gap extension = 0.1. Analyses of potential recombination events were carried out using the Recombination Detection Program (RDP) ver. 2.0 (Martin & Rybicki, 2000), using all default parameters.

Construction of infectious ToYSV clones. The isolation and characterization of the MG-Bi2 isolate of ToYSV has been recently described (Calegario *et al.*, 2006). The isolate was maintained in *Nicotiana benthamiana* plants by successive sap-inoculations using 0.01 M sodium phosphate, pH 8.0, plus 0.1% sodium sulphite. Full-length clones corresponding to DNA-A and -B were obtained using the Templphi kit (Amersham Biosciences) (Calegario *et al.*, 2006). To construct partial repeat clones of the ToYSV genome, the *Sac* I-*Eco*R V fragment of pToYSV-A was cloned into the pUC118 vector, generating pToYSV-A0.2. The full-length *Sac* I fragment was then inserted into pToYSV-A0.2, generating pToYSV-A1.2. Likewise, the *Sac* I-*Xba* I fragment of pToYSV-B was cloned into pUC 118, generating pToYSV-B0.2, and the full-length *Sac* I fragment was then inserted into pToYSV-B0.2 to generate pToYSV-B1.2.

Plant inoculations. *Nicotiana benthamiana* plants were biolistically inoculated (Aragão *et al.*, 1996), always with 2 µg of each DNA component, with different combinations of the cloned DNA-A and -B of ToYSV and of the additional tomato- and *Sida*-infecting begomoviruses (Table 1). The clones of ToCMoV-[BA-Se1]-A and -B are monomers, while all others are cloned as partial tandem repeats. For ToCMoV-[MG-Bt1], SiMoV and SiYMV, only the DNA-A is cloned. For ToCMoV-[MG-Ig1] and TCrLYV, only the DNA-B is cloned.

Detection of viral infection. Four weeks (28 days) after inoculation, plants were visually evaluated for the presence of symptoms, photographed, and total DNA was extracted from non-inoculated leaves (Dellaporta *et al.*, 1983). Viral DNA was detected by PCR-RFLP using universal begomovirus primers (PAL1v978/PAR1C715 for DNA-A and PBL1v2040/PCRC1 for DNA-B (Rojas *et al.*, 1993), and cleavage of amplicons with restriction enzymes specific for each viral species to confirm the nature of the infections.

RESULTS

ToYSV has a recombinant origin including sequences from *Sida*-infecting begomoviruses. Sequence comparisons and phylogenetic analysis based on the full-length DNA-A sequences indicated a close relationship between ToYSV and the *Sida*-infecting begomoviruses SiMoV and SiYMV (Calegario *et al.*, 2006). In fact, the complete DNA-A of ToYSV displays the highest nucleotide sequence identity with these two viruses (87% and 83% with SiMoV and SiYMV, respectively; Figure 1B). However, the amino acid sequences of their Rep proteins are not particularly conserved, with 77%/75% identity between ToYSV and SiMoV/SiYMV, respectively (Figure 1C). By comparison, the Rep sequences of ToYSV and TGMV display 80% identity (Figure 1C). Conversely, the CP amino acid sequences of ToYSV and SiMoV/SiYMV are almost identical, with 96%/89% identity, respectively.

We performed a recombination detection analysis using sequences of several tomato- and *Sida*-infecting begomoviruses from Brazil (listed in Table 1). This analysis strongly indicated that ToYSV has a recombinant origin, with the fragment corresponding to nucleotides 1 to 529 (the exact breakpoints varying depending on the program module) being derived from either SiMoV or SiYMV (Figure 1A). The second parent was not identified, suggesting that it could be an uncharacterized virus. This recombination pattern was detected by the RDP, GeneConv, Bootscan and Chimaera modules of the program with a 7.3×10^{-10} , 4.8×10^{-5} , 1.5×10^{-3} and 1.7×10^{-7} probability, respectively. Together, previous results from sequence comparisons and phylogenetic analysis plus the results from recombination analysis indicate that ToYSV has a recombinant origin, with most of the coat protein (including *cp* regulatory sequences) from a *Sida*-infecting virus and the replication module, including the viral origin of replication, from an unknown virus.

ToYSV and *Sida*-infecting begomoviruses do not form viable pseudorecombinants. Plants of *Nicotiana benthamiana* inoculated with the pseudorecombinants formed by ToYSV-B and either SiMoV and SiYMV displayed no symptoms of viral infection, either local or systemic, at 28 days post-inoculation (dpi) (Table 2). Viral DNA was not detected in non-inoculated leaves of plants bombarded with either one of these two pseudorecombinants (data not shown). These results indicate that, even though SiMoV and SiYMV are the viruses with higher sequence identity to ToYSV, the viral factors required for replication and/or movement are not exchangeable between these viruses. The alignment of part of the common region of the three viruses (Figure 1B) reveals no conservation among their iterons (ToYSV: GGTG; SiMoV: GGAG; SiYMV: GGGG), which could be an impediment to recognition of the ToYSV-B origin of replication by the Rep proteins encoded by SiMoV and SiYMV. Similarly, the Rep proteins encoded by the three

viruses have relatively low amino acid sequence identity (77% between ToYSV and SiMoV and 75% between ToYSV and SiYMV) and poorly conserved DNA binding domains (Figure 1C).

The virus-specific recognition domain of the Rep protein was mapped to the N-terminal region (Choi & Stenger, 1995; Gladfelter *et al.*, 1997), and includes the DNA binding domain (Motif 1). A more detailed analysis of this region revealed one amino acid stretch (8-10 residues) located upstream of Motif 1, denominated iteron-related domain (IRD) (Figure 1C), proposed to contain the major DNA binding specific determinants (Arguello-Astorga & Ruiz-Medrano, 2001). Such analysis revealed a consistent protein-DNA sequence correlation at the level of specific amino acid-nucleotide pairs which allowed the prediction of a molecular code ruling the preference of the Rep protein to specific DNA sequences (Arguello-Astorga & Ruiz-Medrano, 2001). All begomovirus iterons are composed of an invariable GG sequence followed by three nucleotides (named N1, N2 and N3) which vary among species (Figure 1B). The IRD sequence is conserved among begomoviruses with identical iterons, but varies between species with different iteron sequences, with exception of an invariant Phe residue at the center of the IRD (Figure 1C). Predicted amino acid-nucleotide pairing would occur between iteron nucleotide N1 and the last amino acid of IRD, N2 with the sixth IRD amino acid and N3 with the first or third IRD amino acid, depending on the iteron sequence (Arguello-Astorga & Ruiz-Medrano, 2001).

A detailed analysis of the IRD sequence of ToYSV, SiMoV and SiYMV shows low conservation, and the specific amino acids responsible for iteron recognition are not absolutely conserved (Figure 1C). This observation, associated with the lack of iteron conservation between ToYSV, SiMoV and SiYMV, could explain the impediment for trans-replication of ToYSV-B by the Rep proteins encoded by SiMoV and SiYMV.

Pseudorecombination between ToYSV and tomato-infecting begomoviruses.

Pseudorecombinants produced between ToYSV and tomato-infecting begomoviruses could be divided into three groups. The first group includes non-viable pseudorecombinants, which did not induce symptoms in inoculated plants at 28 dpi and for which no viral DNA could be detected (Table 2 and data not shown). This group includes pseudorecombinants between ToYSV-A and ToRMV-B, ToYSV-A and TGMV-B, ToCMoV-[MG-Bt1]-A and ToYSV-B, and both combinations of ToYSV and ToCMoV-[BA-Se1]. As observed for the *Sida*-infecting begomoviruses, there is no conservation among the iterons of ToYSV (GGTG) and ToRMV (GGTAG), ToCMoV (GGGG) or TGMV (GGTAG) (Figure 1B). Likewise, the IRD sequence shows no conservation, and the specific amino acids responsible for iteron recognition are not fully conserved among these four viruses (Figure 1C). However, some reciprocal

pseudorecombinants were viable (see below), indicating that absolute iteron/IRD conservation is not the single determining factor for their viability.

The second group is comprised of two pseudorecombinants: ToRMV-A and ToYSV-B, and ToYSV-A and ToCMoV-[MG-Ig1]-B. These combinations did not induce symptoms of systemic infection at 28 dpi, however viral DNA (A component only) could be detected in non-inoculated leaves (Table 2; Figure 3). The capacity of ToRMV-A to infect *N. benthamiana* in the absence of the cognate DNA-B has been demonstrated (Andrade *et al.*, 2004; Andrade *et al.*, 2005). However, ToYSV-A is not capable of infecting *N. benthamiana* alone (Table 2), indicating that a very low accumulation of ToCMoV-[MG-Ig1]-B could be taking place, below the limit of detection of the PCR-RFLP assay but high enough to allow the DNA-B-encoded proteins to move ToYSV DNA-A from cell to cell. Previous studies have demonstrated that symptom determinants in begomovirus infections are encoded by DNA-B (Ingham *et al.*, 1995; Schaffer *et al.*, 1995), which correlates with our results as plants inoculated with these two combinations did not display any symptoms. The lack of iteron and IRD conservation between ToYSV and ToCMoV-[MG-Ig1] could be a barrier to effective trans-replication of the heterologous DNA-B, explaining its low level in non-inoculated leaves.

The third group is comprised of two combinations, ToYSV-A and TCrLYV-B, and TGMV-A and ToYSV-B, which formed fully infectious pseudorecombinants. Systemic symptoms induced in *N. benthamiana* by ToYSV and TGMV are quite severe (Figure 2A,B). Symptoms induced by TCrLYV are unknown, as only the DNA-B of this virus has been cloned so far. Nonetheless, the pseudorecombinant formed by ToYSV-A and TCrLYV-B induced severe mosaic, leaf curling and epinasty (Table 1, Figure 2C), indistinguishable from the symptoms induced by ToYSV. The identity of each viral component present in plants inoculated with the pseudorecombinant was confirmed by the PCR-RFLP assay. Fragments corresponding to both DNAs were PCR-amplified from non-inoculated leaves (Figure 3A), and cleaved with virus-specific restriction enzymes (*Sac* I for ToYSV-A and *Eco*R I for TCrLYV-B) (Figure 3B). Equivalent results were obtained for the other pseudorecombinant (TGMV-A and ToYSV-B), which also induced severe mosaic, leaf curling and epinasty (Table 2, Figure 2D). In this case, symptoms were as severe as those induced by ToYSV, but slightly less severe than those induced by TGMV, again confirming that symptom induction is governed by the DNA-B. Both DNAs were PCR-amplified (Figure 3A) and cleaved with virus-specific enzymes (*Pst* I for TGMV-A and *Hind* III for ToYSV-B), thus confirming the identity of each DNA component (Figure 3B).

The common region alignment (Figure 1B) indicates that ToYSV and TCrLYV have identical iterons, which certainly contributed for the severe symptoms induced by the pseudorecombinant. However, ToYSV and TGMV iterons are distinct (GGTG and GGTA, respectively). Nevertheless, the Rep protein encoded by TGMV was capable of binding to ToYSV-B and directing replication of the non-cognate component. Analysis of the amino acid sequence of the Rep proteins indicates that the IRD domains of TGMV and ToYSV are the most conserved between all begomoviruses analyzed in this study (5 out of 8 amino acids), including residues directly involved in Rep-iteron recognition (Figure 1C). This sequence conservation could be sufficient to mediate iteron recognition by the heterologous Rep protein.

Together, these results demonstrate that a virus with a putative recombination origin (ToYSV) can display high sequence identity for the entire genome with one of the recombination parents (SiMoV or SiYMV), but actually be closer in terms of trans-replication to viruses with lower sequence identity (TGMV), as long as the recombination occurred in a region of the genome not involved in replication (in this specific case, the coat protein gene).

DISCUSSION

Studying the relationship between ToYSV, which induces extremely severe symptoms in tomato but is quite sporadic in the field, and the much more ubiquitous ToRMV and ToCMoV, both of which induce milder symptoms, could provide significant clues as to the mechanisms governing symptom induction and host adaptation in begomoviruses. ToYSV was originally isolated from tomato (Ambrozevicius *et al.*, 2002), and characterized at the biological and molecular levels as a distinct species in the genus *Begomovirus* (Calegario *et al.*, 2006). Interestingly, sequence comparisons and phylogenetic analysis based on the full-length DNA-A indicated that ToYSV is more closely related to *Sida*-infecting begomoviruses, such as SiMoV and SiYMV, rather than to tomato-infecting viruses, such as TGMV, ToRMV or ToCMoV. It must be pointed out that the two aforementioned *Sida* viruses have never been detected infecting tomatoes, and that the three tomato viruses have never been detected in *Sida* or any host other than tomato, except for the detection of the genomic components of ToRMV in association with distinct components in voluntary bean plants and in the weed *Nicandra physaloides* (Zerbini *et al.*, 2002). However, our analysis indicates that ToYSV actually has a recombinant origin, with a large part of its coat protein gene derived either from SiMoV or SiYMV, and the remaining of the DNA-A from an unknown virus. Therefore, its “close” relationship with SiMoV and SiYMV is rather artificial, considering that the coat

protein plays a small role in the begomovirus infection cycle, being dispensable for replication and systemic movement (Pooma *et al.*, 1996; Qin *et al.*, 1998).

In all previous scenarios of tomato begomovirus emergence it was suggested that indigenous viruses infecting weeds and wild hosts had been transferred to the new host, generating novel species after recombination and/or pseudorecombination events (Monci *et al.*, 2002; Padidam *et al.*, 1999; Pita *et al.*, 2001; Saunders *et al.*, 2002; Unselde *et al.*, 2000a; Zhou *et al.*, 1997). Among the Brazilian viruses, a recombinant origin has been indicated for ToCMoV (Galvão *et al.*, 2003), and possible pseudorecombination between ToRMV and uncharacterized viruses was detected under natural conditions (Zerbini *et al.*, 2002).

The formation of viable pseudorecombinants is one of the easiest and most reliable ways to detect relationships among apparently unrelated begomoviruses (Gilbertson *et al.*, 1993; Pita *et al.*, 2001; Sung & Coutts, 1995). Pseudorecombination involves essentially one viral protein (Rep) and a short sequence at the common region (the iterons), as the interaction between the DNA-B-encoded movement proteins and the viral DNA is much less specific (Bridson & Markham, 2001; Frischmuth *et al.*, 1993; Lazarowitz & Beachy, 1999). Therefore, a recombination event not involving the *Rep* gene and the origin of replication could, in theory, generate a virus phylogenetically closer to *Sida* viruses but incapable of pseudorecombining with them. Pseudorecombinants between ToYYSV DNA-B and the DNA-A of tomato viruses would be viable as long as replication would take place, and would induce severe symptoms since this is a function of the DNA-B-encoded proteins (Ingham *et al.*, 1995; Petty *et al.*, 2000; Schaffer *et al.*, 1995).

At least two factors are directly involved in pseudorecombinant viability: (i) conservation of iteron sequence (Argüello-Astorga *et al.*, 1994b), and (ii) conservation of the IRD sequence of the Rep protein, particularly the three amino acids predicted to be involved in pairing with the iteron nucleotides (Arguello-Astorga & Ruiz-Medrano, 2001). Among these three amino acids, none is conserved between ToYYSV and ToRMV, only one is conserved among ToYYSV, SiMoV, SiYMV and ToCMoV-[BA-Se1] (an arginine at position 6), and two are conserved among ToYYSV, ToCMoV-[MG-Bt1] and ToCMoV-[MG-Ig1] (lisine and arginine at positions 3 and 6, respectively). These two conserved residues were not sufficient to warrant recognition of ToYYSV iterons by the Rep protein encoded by ToCMoV-[MG-Bt1], but the ToYYSV Rep was capable of recognizing, albeit inefficiently, the iteron from ToCMoV-[MG-Ig1]. This inefficient interaction could have been responsible for a low accumulation of DNA-B, but still high enough to allow synthesis of the movement proteins, in such a way that the pseudorecombinant infected *N. benthamiana* plants systemically. This low DNA-B accumulation is consistent with the lack of symptoms in inoculated plants. It is

possible that the maintenance of this pseudorecombinant in the plant could lead to further recombination events which could enhance the interaction between the Rep protein and the iterons, something which has been previously reported for another pseudorecombinant (Hou & Gilbertson, 1996).

The conservation between the iterons of ToYSV and TCrLYV certainly contributed to the viability of the pseudorecombinant formed by these viruses. Symptoms induced by the pseudorecombinant are slightly attenuated in comparison to wt ToYSV, but unfortunately it is impossible to compare them to those induced by wt TCrLYV, as the DNA-A of this virus has yet not been isolated. Interestingly, symptoms induced by the ToYSV-A/TCrLYV-B pseudorecombinant are more severe than those induced by a ToRMV-A/TCrLYV-B pseudorecombinant (Andrade *et al.*, 2004), probably due to the better iteron conservation between ToYSV and TCrLYV compared to ToRMV and TCrLYV. Unfortunately, the unavailability of the amino acid sequence for the Rep protein of TCrLYV prevents further considerations on Rep-iteron interactions involving this virus.

Conversely, there is no iteron conservation between ToYSV and TGMV, which in theory would complicate pseudorecombination between these viruses. Nevertheless, a TGMV-A/ToYSV-B pseudorecombinant was viable and induced symptoms which were only slightly attenuated compared to the wt viruses. This result demonstrates that the TGMV Rep is versatile and can recognize a heterologous DNA component with different iterons, and that the gene products encoded by the two heterologous components were capable of interacting efficiently, allowing the onset of a systemic infection which caused severe symptoms. Although they are not conserved, the iterons of ToYSV and TGMV differ by only one nucleotide. Besides, analysis of the Rep protein amino acid sequence indicated that the IRDs of ToYSV and TGMV have the highest conservation among the viruses used in the assay (5 out of 8 residues). The asymmetry among the two pseudorecombinants indicates that the TGMV Rep is more versatile in terms of recognizing heterologous DNA components, and suggests that a glutamine residue at position 6 of the IRD (as opposed to an arginine residue) is best for such property.

In summary, our results demonstrate that pseudorecombination among different begomovirus species can be more frequent than previously thought. Considering the explosive emergence of tomato begomoviruses in Brazil in recent years and the existence of natural reservoirs in wild/weed species, it is likely that the scenario described in this work also takes place in the field, leading to the surfacing of novel begomovirus species better adapted to the tomato. Also, it supports the view (Rothenstein *et al.*, 2006) that sequence comparisons and

phylogeny of the full-length DNA-A can be misleading if recombination is not taken into account.

References

- Ambrozevicius, L. P., Calegario, R. F., Fontes, E. P. B., Carvalho, M. G. & Zerbini, F. M. (2002). Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira* **27**, 372-377.
- Andrade, E. C., Ambrozevicius, L. P., Calegario, R. F., Fontes, E. P. B. & Zerbini, F. M. (2002). Molecular cloning and characterization of *Tomato chlorotic mottle virus* (TCMV), a new tomato-infecting begomovirus. *Virus Reviews and Research* **7**, 153.
- Andrade, E. C., Lopes, E. F., Alfenas, P. F., Fontes, E. P. B., Ribeiro, S. G. & Zerbini, F. M. (2004). Pseudorecombination between begomoviruses from tomato and *Sida* sp. In *4th International Geminivirus Symposium (Programme and Abstracts)*, pp. P3-9. Cape Town, South Africa.
- Andrade, E. C., Pires, S. R., Alfenas, P. F., Barros, D. R., Fontes, E. P. B. & Zerbini, F. M. (2005). The DNA-A of the bipartite begomovirus *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) is capable of systemically infecting *Nicotiana benthamiana* in the absence of its cognate DNA-B. In *XIII International Congress of Virology (Abstracts)*, pp. 23. San Francisco, USA.
- Aragão, F. J. L., Barros, L. M. G., Brasileiro, A. C. M., Ribeiro, S. G., Smith, F. D., Sanford, J. C., Faria, J. C. & Rech, E. L. (1996). Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theoretical and Applied Genetics* **93**, 142-150.
- Argüello-Astorga, G., Herrera-Estrella, L. & Rivera-Bustamante, R. (1994a). Experimental and theoretical definition of geminivirus origin of replication. *Plant Molecular Biology* **26**, 553-556.
- Argüello-Astorga, G. R., Guevara-González, R. G., Herrera-Estrella, L. R. & Rivera-Bustamante, R. F. (1994b). Geminivirus replication origins have a group-specific organization of interactive elements: a model for replication. *Virology* **203**, 90-100.
- Argüello-Astorga, G. R. & Ruiz-Medrano, R. (2001). An iteron-related domain is associated to Motif 1 in the replication proteins of geminiviruses: identification of potential interacting amino acid-base pairs by a comparative approach. *Archives of Virology* **146**, 1465-1485.
- Bedford, I. D., Briddon, R. W., Brown, J. K., Rosell, R. C. & Markham, P. G. (1994). Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographical regions. *Annals of Applied Biology* **125**, 311-325.
- Briddon, R. W. (2003). Cotton leaf curl disease, a multicomponent begomovirus complex. *Molecular Plant Pathology* **4**, 427-434.
- Briddon, R. W. & Markham, P. G. (2001). Complementation of bipartite begomovirus movement functions by topocoviruses and curtoviruses. *Archives of Virology* **146**, 1811-1819.
- Calegario, R. F., Ferreira, S. S., Andrade, E. C. & Zerbini, F. M. (2006). Biological and molecular properties of *Tomato yellow spot virus*, (ToYSV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **submitted**.
- Chatterji, A., Padidam, M., Beachy, R. N. & Fauquet, C. M. (1999). Identification of replication specificity determinants in two strains of tomato leaf curl virus from New Delhi. *Journal of Virology* **73**, 5481-5489.
- Choi, I. R. & Stenger, D. C. (1995). Strain-specific determinants of beet curly top geminivirus DNA replication. *Virology* **206**, 904-912.
- Costa, A. S. (1976). Whitefly-transmitted plant diseases. *Annual Review of Phytopathology* **14**, 429-440.
- Dellaporta, S. L., Wood, J. & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* **1**, 19-21.

- Eagle, P. A., Orozco, B. M. & Hanley-Bowdoin (1994). A DNA sequence required for geminivirus replication also mediates transcriptional regulation. *Plant Cell* **6**, 1157-1170.
- Fernandes, A. V., Galvão, R. M., Machado, J. J., Zerbini, F. M. & Fontes, E. P. B. (1999). Cloning and molecular characterization of A components of two new *Sida rhombifolia*-infecting geminiviruses. *Virus Reviews and Research* **4**, 148.
- Fernandes, J. J., Carvalho, M. G., Andrade, E. C., Brommonschenkel, S. H., Fontes, E. P. B. & Zerbini, F. M. (2006). Biological and molecular properties of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Plant Pathology* **55**, DOI 10.1111/j.1365-3059.2006.01395.x
- Fontes, E. P. B., Eagle, P. A., Sipe, P. S., Luckow, V. A. & Hanley-Bowdoin, L. (1994a). Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 8459-8465.
- Fontes, E. P. B., Gladfelter, H. J., Schaffer, R. L., Petty, I. T. D. & Hanley-Bowdoin, L. (1994b). Geminivirus replication origins have a modular organization. *Plant Cell* **6**, 405-416.
- Frischmuth, T., Roberts, S., von Arnim, A. & Stanley, J. (1993). Specificity of bipartite geminivirus movement proteins. *Virology* **196**, 666-673.
- Galvão, R. M., Mariano, A. C., Luz, D. F., Alfenas, P. F., Andrade, E. C., Zerbini, F. M., Almeida, M. R. & Fontes, E. P. B. (2003). 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* **84**, 715-726.
- Gilbertson, R. L., Hidayat, S. H., Paplomatas, E. J., Rojas, M. R., Hou, Y.-H. & Maxwell, D. P. (1993). Pseudorecombination between infectious cloned DNA components of tomato mottle and bean dwarf mosaic geminiviruses. *Journal of General Virology* **74**, 23-31.
- Gladfelter, H. J., Eagle, P. A., Fontes, E. P. B., Batts, L. & Hanley-Bowdoin, L. (1997). Two domains of the AL 1 protein mediate geminivirus origin recognition. *Virology* **239**, 186-197.
- Hanley-Bowdoin, L., Settlage, S. B., Orozco, B. M., Nagar, S. & Robertson, D. (1999). Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences* **18**, 71-106.
- Hou, Y. M. & Gilbertson, R. L. (1996). Increased pathogenicity in a pseudorecombinant bipartite geminivirus correlates with intermolecular recombination. *Journal of Virology* **70**, 5430-5436.
- Hou, Y. M., Paplomatas, E. J. & Gilbertson, R. L. (1998). Host adaptation and replication properties of two bipartite geminiviruses and their pseudorecombinants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**, 208-217.
- Ingham, D. J., Pascal, E. & Lazarowitz, S. G. (1995). Both bipartite geminivirus movement proteins define viral host range, but only BL1 determines viral pathogenicity. *Virology* **207**, 191-204.
- Laufs, J., Schumacher, S., Geisler, N., Jupin, I. & Gronenborn, B. (1995). Identification of the nicking tyrosine of geminivirus Rep protein. *FEBS Letters* **377**, 258-262.
- Lazarowitz, S. G. & Beachy, R. N. (1999). Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *Plant Cell* **11**, 535-548.
- Lourenção, A. L. & Nagai, H. (1994). Outbreaks of *Bemisia tabaci* in São Paulo state (in Portuguese). *Bragantia* **53**, 53-59.
- Martin, D. & Rybicki, E. P. (2000). RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics* **16**, 562-563.
- Matyis, J. C., Silva, D. M., Oliveira, A. R. & Costa, A. S. (1975). Purification and morphology of tomato golden mosaic virus (in Portuguese). *Summa Phytopathologica* **1**, 267-275.

- Monci, F., Sanchez-Campos, S., Navas-Castillo, J. & Moriones, E. (2002). 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* **303**, 317-26.
- Morales, F. J. & Anderson, P. K. (2001). The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology* **146**, 415-441.
- Moriones, E. & Navas-Castillo, J. (2000). *Tomato yellow leaf curl virus*, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Research* **71**, 123-134.
- Padidam, M., Sawyer, S. & Fauquet, C. M. (1999). Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* **265**, 218-224.
- Petty, I. T., Carter, S. C., Morra, M. R., Jeffrey, J. L. & Olivey, H. E. (2000). Bipartite geminivirus host adaptation determined cooperatively by coding and noncoding sequences of the genome. *Virology* **277**, 429-438.
- Pita, J. S., Fondong, V. N., Sangare, A., Otim-Nape, G. W., Ogwal, S. & Fauquet, C. M. (2001). Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. *Journal of General Virology* **82**, 655-665.
- Pooma, W., Gillette, W. K., Jeffrey, J. L. & Petty, I. T. D. (1996). Host and viral factors determine the dispensability of coat protein for bipartite geminivirus movement. *Virology* **218**, 264-268.
- Qin, S., Ward, B. M. & Lazarowitz, S. G. (1998). The bipartite geminivirus coat protein aids BR1 function in viral movement by affecting the accumulation of viral single-stranded DNA. *Journal of Virology* **72**, 9247-9256.
- Ramos, P. L., Guevara-Gonzalez, R. G., Peral, R., Ascencio-Ibanez, J. T., Polston, J. E., Arguello-Astorga, G. R., Vega-Arreguin, J. C. & Rivera-Bustamante, R. F. (2003). 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* **148**, 1697-1712.
- Ribeiro, S. G., Ambrozecius, L. P., Ávila, A. C., Bezerra, I. C., Calegario, R. F., Fernandes, J. J., Lima, M. F., Mello, R. N., Rocha, H. & Zerbini, F. M. (2003). Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology* **148**, 281-295.
- Ribeiro, S. G., Ávila, A. C., Bezerra, I. C., Fernandes, J. J., Faria, J. C., Lima, M. F., Gilbertson, R. L., Zambolim, E. M. & Zerbini, F. M. (1998). Widespread occurrence of tomato geminiviruses in Brazil, associated with the new biotype of the whitefly vector. *Plant Disease* **82**, 830.
- Rojas, M. R., Gilbertson, R. L., Russell, D. R. & Maxwell, D. P. (1993). Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* **77**, 340-347.
- Rothenstein, D., Haible, D., Dasgupta, I., Dutt, N., Patil, B. L. & Jeske, H. (2006). Biodiversity and recombination of cassava-infecting begomoviruses from southern India. *Archives of Virology* **151**, 55-69.
- Saunders, K., Salim, N., Mali, V. R., Malathi, V. G., Briddon, R., Markham, P. G. & Stanley, J. (2002). Characterisation of Sri Lankan cassava mosaic virus and Indian cassava mosaic virus: evidence for acquisition of a DNA B component by a monopartite begomovirus. *Virology* **293**, 63-74.
- Schaffer, R. L., Miller, C. G. & Petty, I. T. D. (1995). Virus and host-specific adaptations in the BL1 and BR1 genes of bipartite geminiviruses. *Virology* **214**, 330-338.
- Stanley, J., Bisaro, D. M., Briddon, R. W., Brown, J. K., Fauquet, C. M., Harrison, B. D., Rybicki, E. P. & Stenger, D. C. (2005). Family *Geminiviridae*. In *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 301-326.

- Edited by C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L. A. Ball. San Diego: Elsevier Academic Press.
- Sung, Y. K. & Coutts, R. H. (1995). Pseudorecombination and complementation between potato yellow mosaic geminivirus and tomato golden mosaic geminivirus. *Journal of General Virology* **76**, 2809-2815.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673-4680.
- Unseld, S., Ringel, M., Höfer, P., Höhnle, M., Jeske, H., Bedford, I. D., Markham, P. G. & Frischmuth, T. (2000). Host range and symptom variation of pseudorecombinant virus produced by two distinct bipartite geminiviruses. *Archives of Virology* **145**, 1449-1454.
- Were, H. K., Winter, S. & Maiss, E. (2004). Viruses infecting cassava in Kenya. *Plant Disease* **88**, 17-22.
- Zerbini, F. M., Fernandes, J. J., Fontes, E. P. B., Brommonschenkel, S. H. & Carvalho, M. G. (2002). Association of the DNA components of *Tomato rugose mosaic virus* (TRMV) with distinct geminivirus DNA components in *Nicandra physaloides* and *Phaseolus vulgaris*. In *XII International Congress of Virology (Abstracts)*, pp. 147. Paris, France.
- Zhou, X., Liu, Y., Calvert, L., Munoz, C., Otim-Nape, G. W., Robinson, D. J. & Harrison, B. D. (1997). Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *Journal of General Virology* **78**, 2101-2111.

Table 1. Viruses used in the recombination analysis and pseudorecombination assays.

Species-[isolate]	GenBank accession number	Reference
<i>Tomato yellow spot virus</i> (ToYSV-[MG-Bi2])	NC_007726 (DNA-A) NC_007727 (DNA-B)	Calegario <i>et al.</i> (2006)
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i> (ToCMoV-[BA-Se1])	NC_003664 (DNA-A) NC_003665 (DNA-B)	Ribeiro <i>et al.</i> (2003)
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i> (ToCMoV-[MG-Bt1])	AY090557 (DNA-A)	Galvão <i>et al.</i> (2003)
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i> (ToCMoV-[MG-Ig1])	DQ336353 (DNA-A) DQ336354 (DNA-B)	Andrade <i>et al.</i> (2002)
<i>Tomato golden mosaic virus</i> (TGMV-[Yellow vein])	NC_001507 (DNA-A) NC_001508 (DNA-B)	Fontes <i>et al.</i> (1994a)
<i>Tomato rugose mosaic virus</i> (ToRMV-[MG-Ub1])	NC_002555 (DNA-A) NC_002556 (DNA-B)	Fernandes <i>et al.</i> (2006)
Tomato crinkle leaf yellows virus (TCrLYV-[MG-Vi3])	AY090556 (DNA-B)	Galvão <i>et al.</i> (2003)
<i>Sida mottle virus</i> (SiMoV-[MG-Vi1])	NC_004637 (DNA-A)	Fernandes <i>et al.</i> (1999)
<i>Sida yellow mosaic virus</i> (SiYMV-[MG-Vi2])	NC_004639 (DNA-A)	Fernandes <i>et al.</i> (1999)

Table 2. Infectivity of pseudo-recombinants formed among ToYSV and begomoviruses from tomato and *Sida* sp.

Combinations ^a	Plants infected/ inoculated (no. of independent experiments)	Virus detection ^b		Symptoms ^c
		DNA-A	DNA-B	
ToYSV-A + ToCMoV-[BA-Se1]-B	0/12 (2)	0	0	(-)
ToCMoV-[BA-Se1]-A + ToYSV-B	0/12 (2)	0	0	(-)
ToCMoV-[MG-Bt1]-A + ToYSV-B	0/12 (2)	0	0	(-)
ToYSV-A + ToCMoV-[MG-Ig1]-B	2/12 (2)	2	0	asymptomatic
ToYSV-A + TGMV-B	0/12 (2)	0	0	(-)
TGMV-A + ToYSV-B	4/12 (2)	4	4	ep, lc, m
ToYSV-A + ToRMV-B	0/18 (3)	0	0	(-)
ToRMV-A + ToYSV-B	1/18 (3)	1	0	asymptomatic
ToYSV-A + TCrLYV-B	8/12 (2)	8	8	dc, ep, m
SiMoV-A + ToYSV-B	0/12 (2)	0	0	(-)
SiYMV-A + ToYSV-B	0/12 (2)	0	0	(-)
ToYSV-A	0/15 (1)	0	0	(-)
ToYSV-A + ToYSV-B	15/15 (1)	15	15	lc, sm

^a Virus abbreviations as in Table 1

^b Virus detection by PCR-RFLP, using universal begomovirus primers followed by cleavage with species-specific restriction endonucleases

^c dc, down cupping; ep, epinasty; lc, leaf curling; m, mosaic; sm, severe mosaic

Figure legends

Figure 1. A. Recombination analysis. Schematic representation of the recombinant origin of *Tomato yellow spot virus* (ToYSV). Potential recombination breakpoints and the probability (P) that the indicated region does not have a recombinant origin are represented on the linear map of the begomovirus DNA-A. The shading patterns on the ToYSV map indicate the origin of each viral fragment. The solid arrows indicate the position, orientation and extension of each gene, as indicated. CR indicates the common region which includes the origin of replication. **B.** Alignment of partial common region sequences of the viruses used in the pseudorecombination assays. The Rep binding sites (iterons), relevant for trans-replication of begomovirus DNA components, are double-underlined. The TATA box of the Rep gene is underlined. Asterisks indicate nucleotide positions which are conserved among all the aligned sequences. **C.** Rep alignment and percent amino acid sequence identity (%aa) between Rep proteins of the viruses used in the pseudorecombination assays. The sequence identified as “Motif 1” is conserved in all geminivirus Rep proteins, and is involved in DNA binding. Underlined sequences correspond to the domain associated to sequence-specific recognition of iterons, named “iteron-related domain” (IRD), according to (Arguello-Astorga & Ruiz-Medrano, 2001). Amino acids within the IRD which are responsible for recognition of the variant nucleotides in the iterons are in bold.

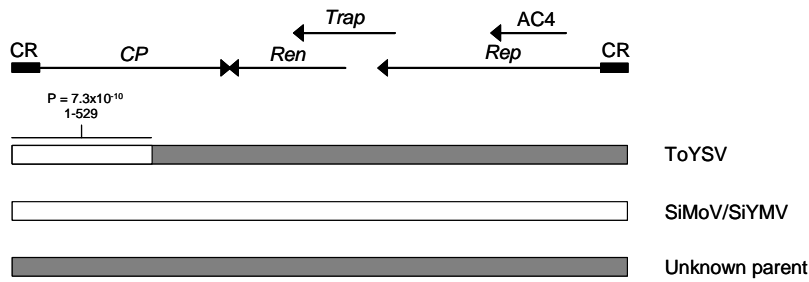
Figure 2. Symptoms induced in *Nicotiana benthamiana* plants infected with ToYSV (A), TGMV (B), the pseudorecombinant ToYSV-A + TCrLYV-B (C), and the pseudorecombinant TGMV-A + ToYSV-B (D). Plants were biolistically inoculated with 2 µg of each DNA component and were photographed 28 days after inoculation.

Figure 3. Detection of viral infection in *Nicotiana benthamiana* plants by PCR-RFLP. Plants were biolistically inoculated with 2 µg of each DNA component, using different combinations of the cloned DNA-A and -B of ToYSV and of the additional tomato- and *Sida*-infecting begomoviruses. Total DNA was extracted at 28 dpi from non-inoculated leaves. **A.** Viral DNA-A (lines 1-6) and -B (lines 7-12) were detected by PCR using universal begomovirus primers. 1,2 and 7,8. Positive and negative controls, respectively. 3,9. PCR amplification from plant inoculated with the pseudorecombinant ToYSV-A + ToCrLYV-B. 4,10. PCR amplification from plant inoculated with the pseudorecombinant ToYSV-A + ToCMoV-[MG-Ig1]-B. 5,11. PCR amplification from plant inoculated with the pseudorecombinant ToRMV-A + ToYSV-B. 6, 12. PCR amplification by PCR from plant inoculated with the

pseudorecombinant TGMV-A + ToYSV-B. **B.** PCR products were cleaved with specific restriction enzymes for each viral component, as indicated. Sizes of the expected fragments (in base pairs) are indicated at the right. Sizes of markers are indicated at the left.

Figure 1

A



B

		% nt	
		DNA-A	DNA-B
ToYSV	AGTC---CTTATGAATTGGTGACATTGGTGTACAATATATACTAGAAGTCT	--	--
TCrLYV	AACTCCGCTAGTCAATTGGTGAC--TGGTGTACAATATATAGTAGAAGCCTC	--	64
TGMV	AAAGT--TATATGAATTGGTAGTAA-GGTAGCTCTTATATATTAGAAGT-TC	76	62
ToRMV	AACT--CATATGAATTGGTAGTTATGGTAGCTCTTATATACTAGAAGTTC	77	63
ToCMoV-[MG-Bt1]	AACTTGCTCTAGCAATTGGGGAC--TGGGGTCCTATATATACTAGAACCCTC	75	--
ToCMoV-[MG-Ig1]	AACTTGCTCTAGCAATTGGGGAC--TGGGGTCCTATATATACTAGAACCCTC	74	58
ToCMoV-[BA-Seq]	AACT-CTAAAGCAATTGGGGAC--TGGGGTCCTATATATACTAGAACCCTC	75	60
SiYMV	ACTCTGTGATATGAACTGGGGAC--TGGGGTCTTATTTATAGCAG-AC--TC	83	--
SiMoV	AGTCT-CTAT-GAAATTGGAGT--ATGGAGTACAATATATAGTAGGAGTTC	87	--
	* * * * *		

C

		% aa
ToYSV	MPSAPKRFRIS SKNYFLTYPRCSLSKEETLSQLQTINTPTNKKFIKICRELHEDGEPHLH	--
TGMV	MPSHPKRFQINAKNYFLTYPQCSSLKESLSQLQALNTPINKKFIKICRELHEDGQPHLH	80
ToRMV	MPSATRFRQIKAKNYFLTYPKCSISKEEALSQKLNLTPTNKKFIKVCRELHENGEPHLH	80
ToCMoV-[MG-Bt1]	MP-PPKHFRVNSKNYFLTYPHCSLSKEEALSQILALNTPNKLII RVSRELHEDGQPHLH	72
ToCMoV-[MG-Ig1]	MP-PPKHFRVNSKNYFLTYPHCSLSKEEALSQLLAIQIPVNKLFIRVARELHEDGQPHLH	74
ToCMoV-[BA-Seq]	MP-LPRHFRVNSKNYFLTYPHCSLSKEEALSQLLALNTPNKLFI RVSRELHENGEPHLH	73
SiYMV	MP-SPRAFRINNSKNYFLTYPKCSLTKEEALSQKELNTPTSKKFIRVSRELHEDGSPHLH	74
SiMoV	MPSKPRFRVQAKNIFLTYPQCPLTKEEALSQIQAIQLPSNKKFIKICRELHEDGQPHLH	77
	** .: *::: ** *****: *::: *****: *::: * . * : *::: *****: * . *****	

Figure 2

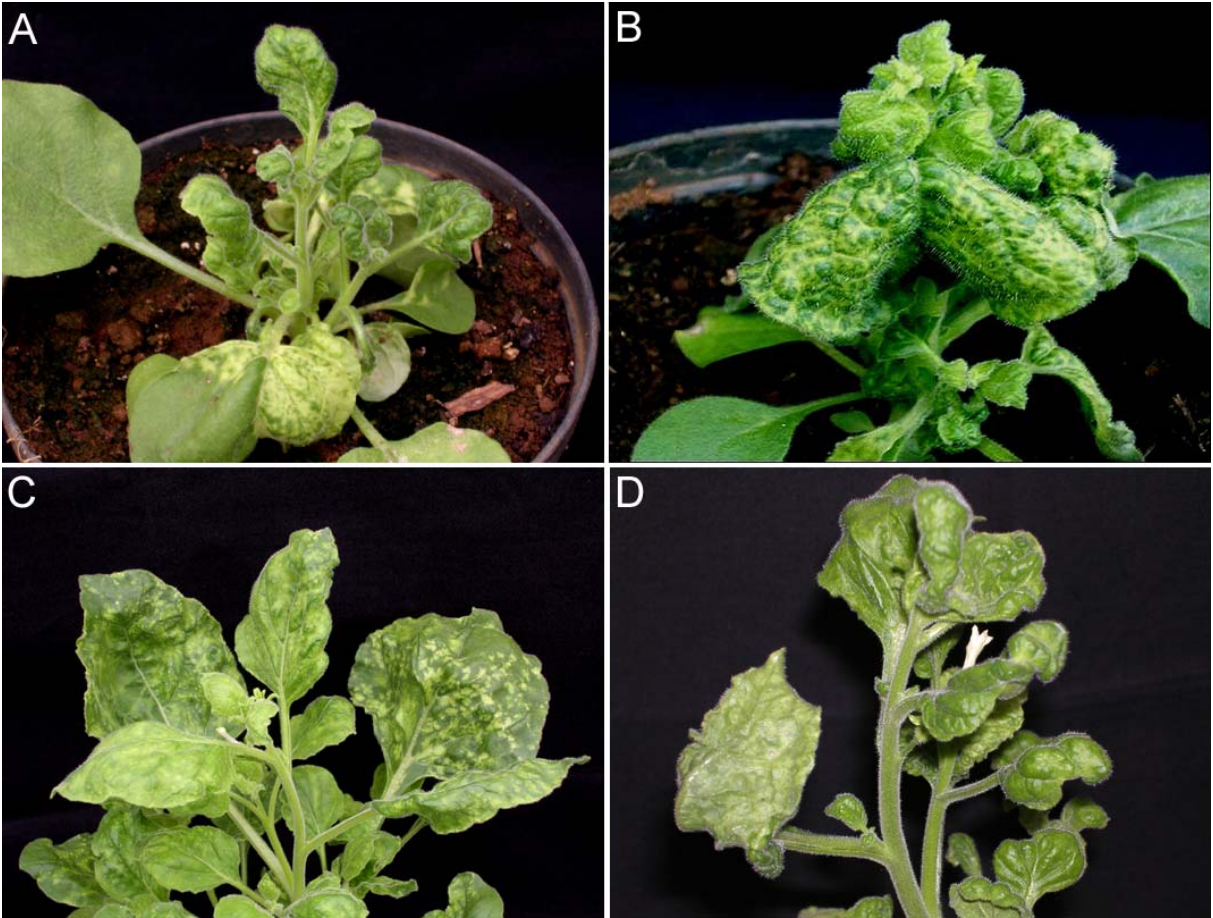
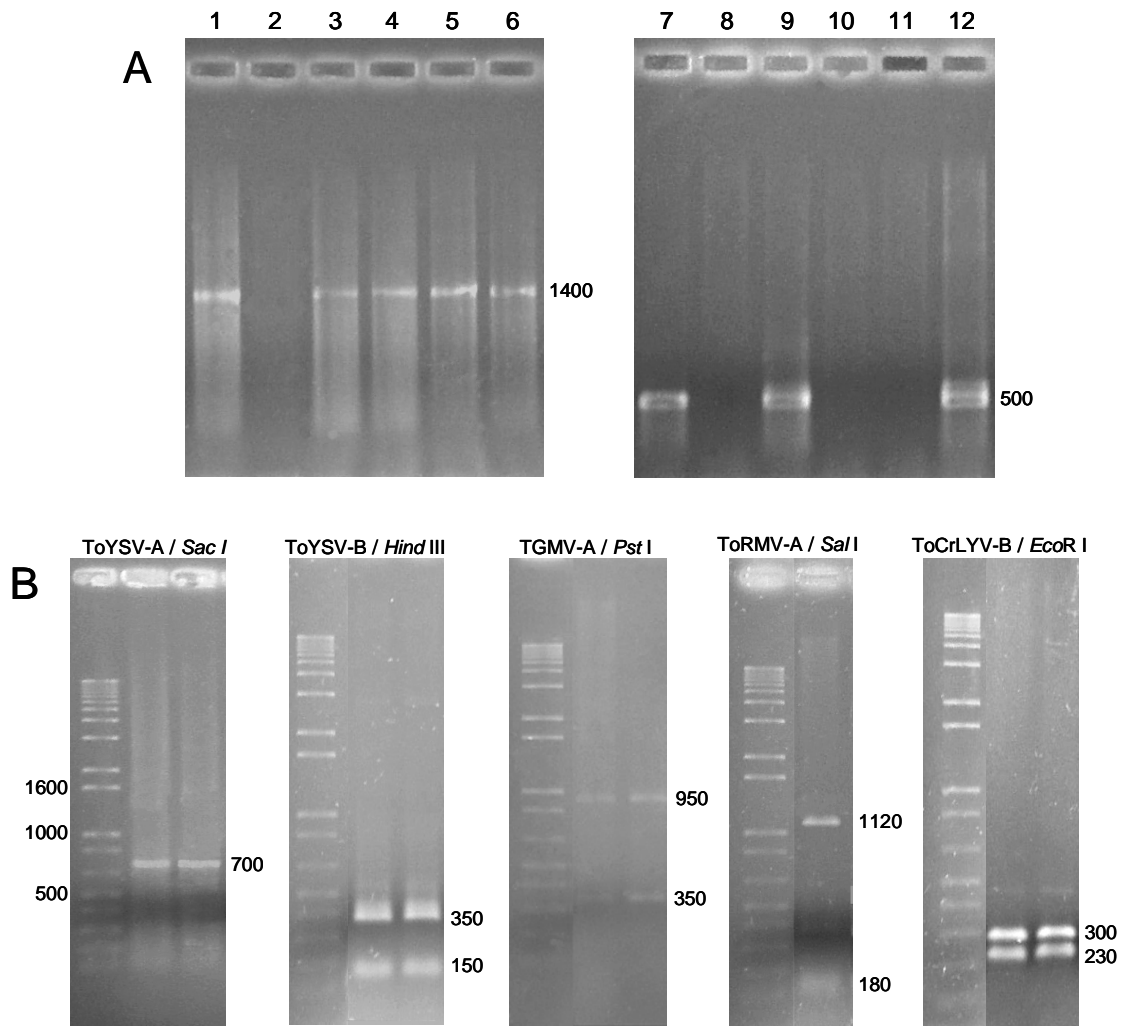


Figure 3



CAPÍTULO 2

INFLUÊNCIA DA TAXA DE REPLICAÇÃO VIRAL E DO TROPISMO DE TECIDO NA INDUÇÃO DIFERENCIAL DE SINTOMAS POR BEGOMOVÍRUS EM TOMATEIRO E *Nicotiana benthamiana*

Andrade, E.C., Manhani, G.G., Fontes, E.P.B. & Zerbini, F.M. Influência da taxa de replicação viral e do tropismo de tecido na indução diferencial de sintomas por begomovírus em tomateiro e *Nicotiana benthamiana*.

INFLUÊNCIA DA TAXA DE REPLICAÇÃO VIRAL E DO TROPISMO DE TECIDO NA INDUÇÃO DIFERENCIAL DE SINTOMAS POR BEGOMOVÍRUS EM TOMATEIRO E *Nicotiana benthamiana*

E.C. Andrade¹, G.G.Manhani¹, E.P.B.Fontes² & F.M. Zerbini¹

¹Departamento de Fitopatologia/BIOAGRO, e ²Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil, 36570-000

RESUMO

Os begomovírus possuem um genoma de DNA fita simples circular, compreendendo um ou dois componentes de aproximadamente 2.600 nucleotídeos encapsidados em uma partícula icosaédrica geminada, e causam sérias doenças em plantas em todo o mundo. No Brasil uma das principais culturas afetadas pelos begomovírus é o tomateiro, que atualmente é atacada por um complexo viral com pelo menos oito espécies. Dentre estas, o *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) e o *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) possuem características moleculares e biológicas distintas. Além de possuírem baixa identidade entre suas seqüências de nucleotídeos, os sintomas induzidos em tomateiro e *Nicotiana benthamiana* pelo ToYSV são mais precoces e severos em comparação ao ToRMV. O objetivo deste trabalho foi estudar o papel da taxa de replicação viral e tropismo de tecido na indução diferencial de sintomas. O acúmulo de DNA viral foi estimado em plantas aos 14 e 28 dias após a inoculação (dpi), e a replicação foi analisada em protoplastos a 36 e 48 horas após a inoculação. Em tomateiro, o acúmulo do ToYSV aos 14 dpi é superior ao do ToRMV, entretanto aos 28 dpi o acúmulo de ambos os vírus se torna semelhante. Em *N. benthamiana*, o acúmulo do ToYSV é superior ao do ToRMV tanto aos 14 como aos 28 dpi. A replicação viral em protoplastos foi semelhante para os dois vírus, em infecção simples ou mista. A análise do tropismo de tecido por meio de hibridização *in situ* indicou que ambos os vírus são restritos ao floema em tomateiro. Entretanto, o ToYSV infecta células do mesófilo de *N. benthamiana*, ao contrário do ToRMV. Sinergismo entre os dois vírus foi observado apenas em *N. benthamiana*, como resultado da modificação do tropismo de tecido do ToRMV, que passou a infectar células do mesófilo. Em conjunto, os resultados sugerem que a indução de sintomas mais severos pelo ToYSV em *N. benthamiana* pode ser consequência da diferença de tropismo de tecido entre os dois vírus. Em tomateiro, outros fatores que não a replicação viral e o tropismo de tecido devem ser responsáveis pelas diferenças nos sintomas.

ABSTRACT

Begomoviruses have a circular, single-stranded DNA genome with one or two components, each with approximately 2.600 nucleotides, encapsidated in twinned icosahedral particles, and cause serious diseases in crop plants worldwide. In Brazil, one of the most affected crops is the tomato, presently infected by a viral complex comprising with at least eight novel species. Two of these species, *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) and *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), have distinct biological and molecular properties. Their nucleotide sequences have low identity, and the symptoms induced by ToYSV in tomato and in the laboratory host *Nicotiana benthamiana* are more severe and appear earlier compared with those induced by ToRMV. The objective of this work was to study the role of the viral rate of replication and of tissue tropism in symptom induction by these two viruses. Viral DNA accumulation was estimated in inoculated plants at 14 and 28 days after inoculation (dpi), and viral replication was analyzed in protoplasts at 36 and 48 hours after inoculation. In tomato, ToYSV reached higher concentration than ToRMV at 14 dpi, but both viruses reached similar concentrations at 28 dpi. In *N. benthamiana*, ToYSV reaches a higher concentration than ToRMV at both time points. Viral replication in protoplasts is similar for both viruses, in either single or mixed infections. Analysis of tissue tropism by *in situ* hybridization indicated that both viruses are phloem-restricted in tomato. However, and unlike ToRMV, ToYSV infects mesophyll cells of *N. benthamiana*. Sinergism between the two viruses was observed only in *N. benthamiana*, as a result of change in tissue tropism of ToRMV, which became capable of invading the mesophyll. Together, these results indicate that the differential induction of symptoms by ToYSV and ToRMV in *N. benthamiana* could be a consequence of differences in tissue tropism between the two viruses. In tomato, factors other than replication rate and tissue tropism must be responsible for differences in symptoms.

INTRODUÇÃO

O gênero *Begomovirus* pertence a família *Geminiviridae*, e inclui as espécies economicamente mais importantes da família (Stanley *et al.*, 2005). Os geminivírus possuem um pequeno genoma de DNA fita simples circular, compreendendo um ou dois componentes de aproximadamente 2.600 nucleotídeos encapsidados em uma partícula icosaédrica geminada (Stanley *et al.*, 2005). São transmitidos pela “mosca-branca” *Bemisia tabaci* (Homoptera:Aleyrodidae) e infectam espécies dicotiledôneas. Possuem grande importância econômica, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, sendo uma das maiores ameaças à agricultura nestas regiões (Briddon, 2003; Legg & Thresh, 2000; Monci *et al.*, 2002; Morales & Anderson, 2001; Were *et al.*, 2004).

No Brasil, assim como em outros países das Américas, uma das culturas mais afetadas pela disseminação de begomovírus é o tomateiro (Morales & Jones, 2004; Polston & Anderson, 1997; Ribeiro *et al.*, 2003), atualmente infectado por um complexo viral composto por pelo menos oito espécies virais (Ambrozevicius *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2003). No estado de Minas Gerais já foram descritas três novas espécies: *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) (Fernandes *et al.*, 2006), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) (Andrade *et al.*, 2002) e *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) (Calegario *et al.*, 2006). Embora estas três espécies de begomovírus tenham sido originalmente isoladas de tomateiro, suas características moleculares e biológicas são distintas. Em termos moleculares, além da baixa identidade entre suas seqüências de nucleotídeos, o relacionamento filogenético é bastante distinto, principalmente comparando-se o ToYSV ao ToRMV e ToCMoV (Calegario *et al.*, 2006). A principal distinção em termos biológicos é o fato do ToYSV induzir sintomas mais precoces e severos em tomateiro e em *Nicotiana benthamiana*, em comparação ao ToRMV e ToCMoV. A variação na precocidade e na severidade dos sintomas pode ser devida a diferenças nas características moleculares relatadas acima, conferindo um maior grau de adaptação do vírus ao hospedeiro. Uma maior adaptação pode ser consequência de uma melhor interação entre as proteínas virais e componentes do hospedeiro. Um vírus mais adaptado a determinado hospedeiro pode ser capaz de se replicar em uma taxa maior, e/ou de se movimentar célula-a-célula e a longa distância de forma mais rápida e eficiente, invadindo diferentes tecidos além do floema, no qual o vírus é inicialmente introduzido pelo inseto vetor (uma propriedade conhecida como tropismo de tecido) (Morra & Petty, 2000; Tyler & Fields, 1996). A indução diferencial de sintomas também pode ser devida a uma melhor supressão dos mecanismos de defesa da planta (Fontes *et al.*, 2004; Vanitharani *et al.*, 2004).

Este trabalho teve como objetivo analisar o papel de alguns componentes da infecção pelo ToYSV e ToRMV em plantas de tomateiro e *N. benthamiana* (taxa de replicação viral e tropismo de tecido) na indução diferencial de sintomas.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados virais e material vegetal

Foram utilizados clones infecciosos correspondentes ao DNA-A e -B dos isolados ToYSV-[MG-Bi2] (Capítulo 1) e ToRMV-[MG-Ub1] (Fernandes *et al.*, 2006), mantidos a -80°C na forma de estoques em glicerol. Plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Santa Clara) e *Nicotiana benthamiana* foram inoculadas via biobalística (Aragão *et al.*, 1996), sempre utilizando-se 2 µg de cada componente genômico. As plantas inoculadas foram mantidas em casa-de-vegetação durante toda a duração dos experimentos.

Extração de DNA a partir de plantas infectadas

Cerca de 0,3 g de folhas apresentando sintomas de infecção viral, coletadas aos 14 e 28 dias pós-inoculação (dpi), foram maceradas em nitrogênio líquido e transferidos para um tubo ao qual foram adicionados 1 ml de tampão de extração (Tris-HCl 100 mM pH 8,0, NaCl 200 mM, EDTA 2 mM e β-mercaptoetanol 1%) e 50 µl de SDS 20%, incubando-se a 65°C por 10 minutos. Em seguida foi adicionado 1 ml de fenol/clorofórmio (1:1), seguido de agitação por 1 minuto e centrifugação a 10.000 g por 3 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado igual volume de fenol/clorofórmio, novamente centrifugando-se a 10.000 g por 3 minutos. O DNA foi precipitado adicionando-se 0,7 volumes de isopropanol, seguido de centrifugação a 10.000 g por 5 minutos e lavagem com etanol 70% (v/v). O “pellet” foi ressuspensionado em 200 µl de TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM).

Hibridização molecular

Cerca de 2 µg de DNA total foram separados por eletroforese em gel de agarose (0,7%), transferidos e covalentemente ligados a membrana de náilon (Hybond-N+, Amersham Biosciences). As membranas foram submetidas a hibridização com sondas específicas para cada espécie viral. A sonda para detecção do ToYSV corresponde ao DNA-A completo liberado do clone pToYSV-A 1.2 (Capítulo 1). A sonda para detecção do ToRMV corresponde aos nucleotídeos 1711-2147 do DNA-A, liberados a partir do clone pUb1-49 (Fernandes *et al.*, 2006) por meio da digestão com as enzimas *Cla* I e *Eco*R I. Ambas as sondas foram marcadas com α-[³²P]-dCTP utilizando-se o kit Prime-it II (Stratagene),

conforme instruções do fabricante. A mesma quantidade de DNA foi marcada para todas as hibridizações. As hibridizações e lavagens foram realizadas de acordo com técnicas padrão (Ausubel *et al.*, 1991), adotando-se condições de alta especificidade (hibridização a 42°C e lavagem a 65°C).

Isolamento e eletroporação de protoplastos

Protoplastos foram isolados de *Nicotiana tabacum* 'Xanthi'. Folhas do penúltimo e anti-penúltimo entrenós foram coletadas e desinfestadas em etanol 50% por 30 segundos e hipoclorito de sódio 1% por 15 minutos, seguido de lavagem em água estéril. A epiderme inferior dessas folhas foi retirada com o auxílio de uma pinça, e a região sem a epiderme foi cortada com bisturi e mantida por uma hora em solução CPW (KH₂PO₄ 0,2 mM pH 5,8, KNO₃ 0,1 mM, CaCl₂ 1mM, MgSO₄ 0,1mM, 0,16 mg/l de KI, 0,025 mg/l de CuSO₄ e manitol 13%). Em seguida a solução foi trocada por solução CPW adicionada de celulase R10 0,5%, macerozima 0,5% e driselase 0,1%, e incubada no escuro a temperatura ambiente por quatro horas a 40 rpm. Após a dissolução dos fragmentos foliares a solução foi filtrada em peneira 64 mesh e centrifugada a 50 g por 10 minutos. O "pellet" foi ressuspensionado em solução CPW com manitol 9%, centrifugando-se a 50 g por 10 minutos em almofada de sacarose 20% em solução CPW. Os protoplastos viáveis formaram uma banda na interface entre as duas soluções, que foi coletada e ressuspensionada em tampão de eletroporação (MOPS 200 µM pH 7,2, KCl 5 mM e manitol 9%). A concentração dos protoplastos foi ajustada para 5 x 10⁶ células/ml. Os protoplastos foram eletroporados (250 V, 500 µF) com 20 µg de cada componente genômico e 30 µg de DNA de esperma de salmão. Após a eletroporação os protoplastos foram mantidos no gelo por 10 minutos e posteriormente diluídos em 9 ml de meio de cultivo MSP1 (sais MS pH 5,8, suplementado com 5 µg/ml de benzil-aminopurina, 20 µg/ml de ácido naftalenoacético, sacarose 3% e manitol 9%) e incubados a 26°C no escuro. Os protoplastos foram coletados a 36 e 48 horas após a eletroporação, e o DNA total extraído (Junghans & Metziaff 1990). O acúmulo de DNA viral foi analisado por meio de hibridização, conforme descrito no item anterior.

Preparo de secções semifinas a partir de tecido foliar infectado

Folhas localizadas no penúltimo entrenó foram coletadas, cortadas em fragmentos de 1cm² e fixadas em paraformaldeído 4% em PBS (KH₂PO₄ 1,8 mM pH 7,2, Na₂HPO₄ 8 mM, NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM) por 12 horas. Após lavagem dos fragmentos em PBS, estes foram desidratados em série alcoólica crescente (10-100%), infiltrados com xilol:etanol (1:3,

1:1, 3:1) por uma hora em cada passagem, em xilol puro por uma hora e por último em xilol:parafina (1:1) a 68°C por toda a noite. A infiltração com parafina pura foi realizada a 68°C durante 3 dias, trocando-se a parafina a cada dia. A última inclusão foi realizada em parafina com 8% de cera de abelha. O tecido foi montado em um bloco de parafina com 8% de cera de abelha e solidificado em gelo. Seções de 30 µm foram obtidas em micrótomo de mesa (Spencer 820, American Optical), fixadas em lâminas cobertas com adesivo de Haupt e secas a temperatura ambiente. A parafina foi retirada com xilol puro, as seções foram re-hidratadas em série alcoólica decrescente (100, 95, 70 e 50%), lavadas em PBS e novamente fixadas em paraformaldeído 4% em PBS por 15 minutos. Por último, as seções foram tratadas com proteinase K (20 µg/ml) em PBS (pH 8,0) por 15 minutos a 37°C, seguido da lavagem com PBS (pH 7,2) acrescido de 2 mg/ml de glicina.

Hibridização *in situ*

Os fragmentos utilizados como sondas para detecção do ToYSV e ToRMV em seções de tecido foliar foram os mesmos utilizados para as hibridizações. A sonda controle consistiu do plasmídeo pBluescript II KS+ (pKS+, Stratagene) linearizado com a enzima *EcoR* I. As sondas foram marcadas utilizando o kit DIG DNA Labeling and Detection (Roche Applied Sciences), purificadas utilizando o kit Perfectprep Cleanup (Eppendorf) de acordo com instruções do fabricante, e ressuspendidas em 50 µl de água.

As seções foram pré-hibridizadas por 3 horas em 4× SSC, formamida 50%, solução de Denhardt e 500 µg/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado, em câmara úmida a 37°C. Em seguida a solução foi trocada, acrescentando-se 800 ng/ml de sonda e sulfato de dextran 4% (p/v), incubando-se em uma câmara úmida a 37°C por 24 horas. Após a hibridização as seções foram lavadas em 1× SSC a temperatura ambiente, 1× SSC a 55°C por 15 minutos (duas vezes), 0,5× SSC a 55°C por 15 minutos (duas vezes) e 0,5× SSC por 10 minutos a temperatura ambiente, e transferidas para TBS (Tris-HCl 100 mM pH 7,5, NaCl 150 mM). As seções foram bloqueadas com TBS acrescido de Triton X-100 0,1% e reagente de bloqueio 1% (Roche Applied Sciences), e posteriormente incubadas por 12 horas a 4°C em TBS com Triton X-100 0,1% e reagente de bloqueio 1% contendo anticorpo anti-DIG diluído 1:1000. Em seguida as seções foram lavadas três vezes em TBS e equilibradas em tampão de detecção (Tris-HCl 100mM pH 9,5, NaCl 100mM, MgCl₂ 50mM). Por fim, as seções foram incubadas em tampão de detecção contendo 300 µg/ml de NBT e 165 µg/ml BCIP (Promega) por 3-16 horas, sendo transferidos posteriormente para água.

As seções foram montadas em glicerol 50% e observadas em microscópio ótico. As imagens foram capturadas com o programa Spotbasic.

RESULTADOS

Replicação e acúmulo do ToYSV e ToRMV isoladamente ou em infecção mista em plantas de tomateiro e *N. benthamiana*

Plantas de tomateiro infectadas pelo ToYSV ou pelo ToRMV apresentam sintomas distintos, mais severos nas plantas infectadas pelo ToYSV em relação às infectadas pelo ToRMV. Os sintomas do ToYSV em tomateiro surgem aos 10 dpi, e incluem mosaico severo, manchas cloróticas e encarquilhamento foliar (Figura 2A, Tabela 1), além de redução acentuada do porte da planta. Em contrapartida, os sintomas do ToRMV surgem aos 14 dpi, incluindo mosaico e uma leve distorção foliar (Figura 2C, Tabela 1). Para determinar se a severidade dos sintomas observados pode ser correlacionada com diferenças no acúmulo de DNA viral, folhas com sintomas de infecção sistêmica foram coletadas aos 14 e 28 dpi, o DNA total extraído e a concentração de DNA viral estimada por meio de hibridização, utilizando sondas específicas para cada vírus. A avaliação do acúmulo de DNA viral indica que aos 14 dpi o acúmulo de DNA do ToYSV é superior ao do ToRMV, entretanto, aos 28 dpi o acúmulo de ambos os vírus se torna semelhante (Figura 3). É interessante notar que ambos os vírus apresentam maior acúmulo aos 14 dpi, em contraste com o baixo acúmulo observado aos 28 dpi. Isto pode ser devido a uma recuperação da planta à infecção viral, conforme demonstrado para outro patossistema envolvendo begomovírus (Vanitharani *et al.*, 2004).

Em *N. benthamiana* as diferenças entre o ToYSV e o ToRMV quanto à precocidade e severidade dos sintomas são ainda mais evidentes. Nas plantas inoculadas com o ToYSV os sintomas surgem aos 5 dpi, e se caracterizam por mosaico e encarquilhamento foliar severo, além de redução drástica no crescimento da planta (Figura 2D, Tabela 1). Já as plantas inoculadas com o ToRMV apresentam sintomas sistêmicos somente aos 14 dpi, caracterizados por mosaico e distorção foliar leves, sem uma aparente redução no crescimento da planta (Figura 2F, Tabela 1). A avaliação do acúmulo de DNA viral indica que tanto aos 14 quanto aos 28 dpi o acúmulo de DNA do ToYSV é bem superior ao do ToRMV (Figura 3), indicando que o ToRMV pode ser menos adaptado a replicar em *N. benthamiana* em comparação ao ToYSV, ou que seja incapaz de infectar certos tipos de células/tecidos. Assim como observado em tomateiro, ocorre uma redução no acúmulo de DNA viral do ToRMV aos

Tabela 1. Infectividade e período latente observado em plantas de tomateiro e *N. benthamiana* inoculadas com o ToYSV e ToRMV isoladamente ou em infecção mista.

	Tomateiro		<i>N. benthamiana</i>	
	Infectividade	Per. latente (dpi)	Infectividade	Per. latente (dpi)
ToYSV	21/30 ^a	10	20/20	5
ToRMV	22/30	14	19/20	14
ToYSV+ToRMV	24/30	10	20/20	5

^a Número de plantas inoculadas/ número de plantas infectadas.

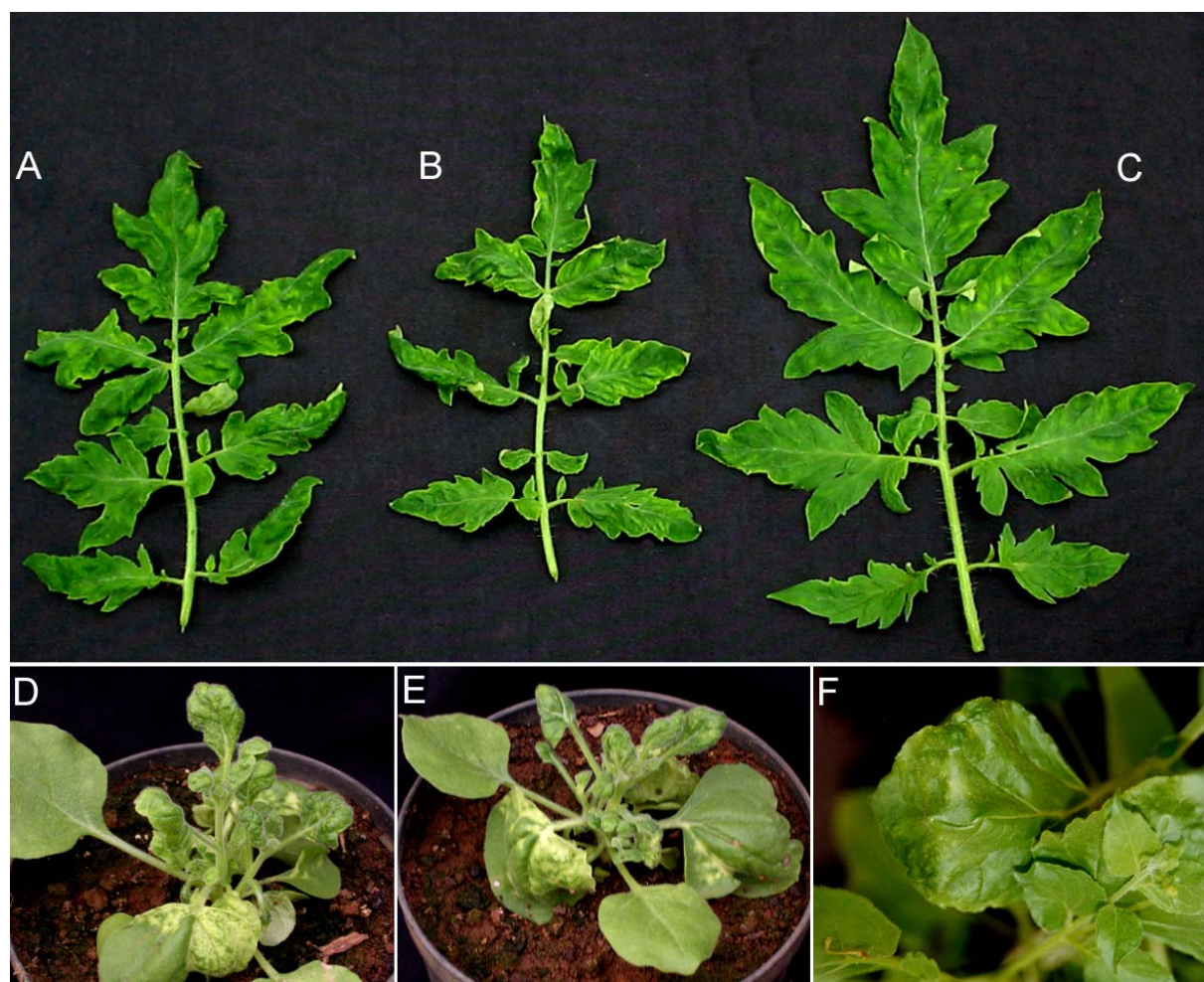


Figura 2. Sintomas induzidos pelo ToYSV e ToRMV em plantas de tomateiro e *Nicotiana benthamiana* aos 14 dpi. Plantas de tomateiro infectadas pelo ToYSV (**A**) apresentam mosaico e distorção foliar mais severos do que plantas infectadas pelo ToRMV (**C**). Plantas com infecção mista pelos dois vírus (**B**) apresentam sintomas ligeiramente mais severos em comparação aos induzidos pelo ToYSV isoladamente. Plantas de *N. benthamiana* infectadas pelo ToYSV (**D**) apresentam mosaico, distorção foliar e redução de crescimento acentuados, ao passo que plantas infectadas pelo ToRMV (**F**) apresentam mosaico leve e ligeira distorção foliar. Plantas com infecção mista (**E**) apresentam sintomas semelhantes aos induzidos pelo ToYSV isoladamente.

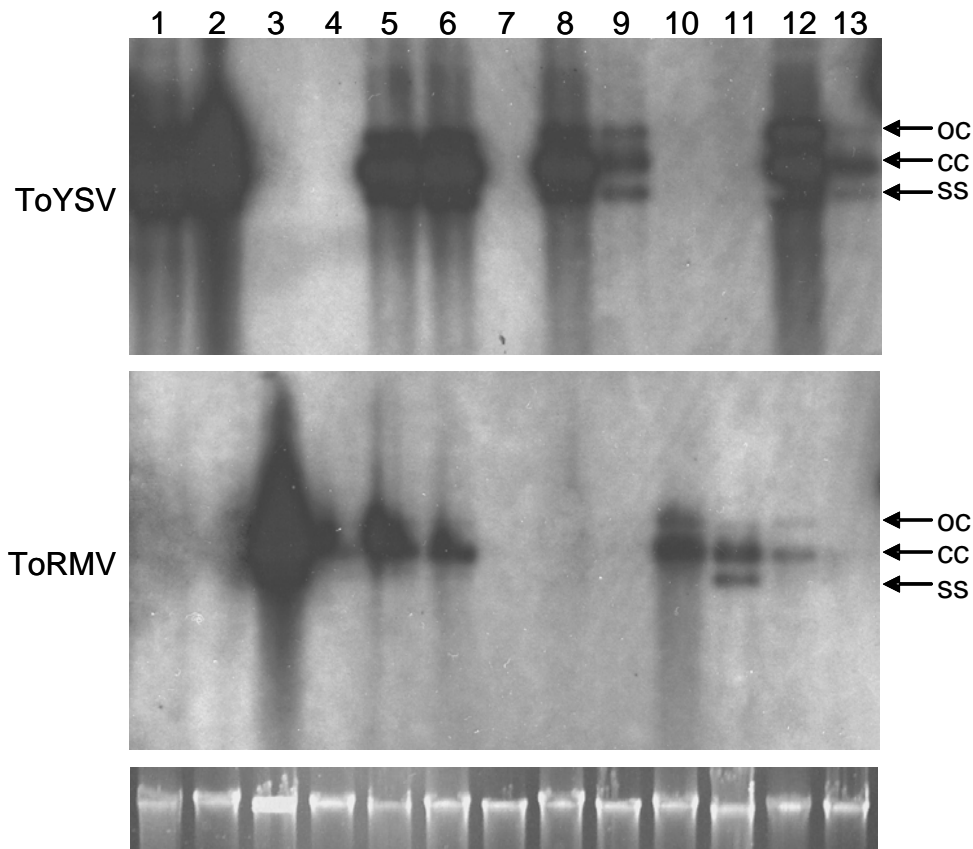


Figura 3. Acúmulo de DNA viral do ToRMV e ToYSV em plantas de tomateiro e *Nicotiana benthamiana* inoculados isoladamente ou em conjunto. DNA total foi extraído de folhas infectadas sistemicamente aos 14 e 28 dpi e o acúmulo de DNA viral foi analisado por meio de hibridização, utilizando sondas específica para cada vírus (indicada à esquerda). **1, 2.** DNA extraído de *N. benthamiana* infectada pelo ToYSV aos 14 e 28 dpi, respectivamente. **3, 4.** DNA extraído de *N. benthamiana* infectada pelo ToRMV aos 14 e 28 dpi, respectivamente, **5, 6.** DNA extraído de *N. benthamiana* infectada simultaneamente pelo ToYSV e ToRMV aos 14 e 28 dpi, respectivamente. **7.** DNA extraído de planta sadia. **8, 9.** DNA extraído de tomateiro infectado pelo ToYSV aos 14 e 28 dpi, respectivamente. **10, 11.** DNA extraído de tomateiro infectado pelo ToRMV aos 14 e 28 dpi, respectivamente. **12, 13.** DNA extraído de tomateiro infectado simultaneamente pelo ToYSV e ToRMV aos 14 e 28 dpi, respectivamente. As posições relativas as formas de DNA circular aberto (oc), fita simples (ss) e circular fechado (cc) estão indicados pelas setas. O painel inferior corresponde ao gel corado com brometo de etídeo para comparação das quantidades de DNA hibridizadas.

28 dpi. Entretanto, não se observa esta mesma redução no acúmulo de DNA viral do ToYSV aos 28 dpi, novamente indicando uma maior adaptação do ToYSV a *N. benthamiana*. Estes resultados também podem refletir uma menor capacidade do hospedeiro *N. benthamiana* em responder à infecção pelo ToYSV.

O fenômeno conhecido como sinergismo ocorre quando uma planta infectada por dois vírus simultaneamente apresenta sintomas mais severos em comparação aos sintomas induzidos por cada vírus separadamente. O sinergismo pode levar a um maior acúmulo de pelo menos um dos vírus envolvidos. Como ambos os begomovírus objeto deste estudo foram isolados de tomateiros em Minas Gerais e estão presentes no campo, é importante saber se no caso de infecções mistas entre eles pode ocorrer sinergismo, conforme já demonstrado para begomovírus que infectam mandioca (Fondong *et al.*, 2000; Vanitharani *et al.*, 2004). Para testar esta possibilidade, plantas de tomateiro e *N. benthamiana* foram inoculadas com os dois vírus simultaneamente, analisando-se a severidade dos sintomas e o acúmulo de DNA viral.

Plantas de tomateiro apresentando infecção mista pelo ToYSV e ToRMV apresentam sintomas aos 10 dpi (Figura 2B), da mesma forma que plantas infectadas apenas pelo ToYSV. Os sintomas induzidos aos 14 dpi foram um pouco mais severos quando comparados aos induzidos pelo ToYSV isoladamente, e muito mais severos quando comparado aos induzidos pelo ToRMV isoladamente. Os sintomas observados incluem mosaico e encarquilhamento foliar, da mesma forma que plantas infectadas pelos dois vírus isoladamente. Entretanto, apenas os tomateiros com infecção mista apresentaram um sintoma caracterizado pelo curvamento do folíolo (Figura 2B). Apesar da maior severidade dos sintomas, a estimativa da concentração de DNA viral por meio de hibridização indicou que a infecção mista não levou a um aumento no acúmulo de DNA viral para nenhum dos dois vírus (Figura 3). De modo semelhante ao observado nas infecções isoladas, o acúmulo de ambos vírus é reduzido aos 28 dpi a níveis semelhantes aos observados quando eles são inoculados isoladamente.

Os sintomas da infecção mista pelo ToYSV e ToRMV em *N. benthamiana* surgem aos 5 dpi, da mesma forma que na infecção simples pelo ToYSV. Os sintomas aos 14 dpi são tão severos quanto os induzidos pelo ToYSV isoladamente (Figura 2E). A estimativa da concentração de DNA viral demonstra que o acúmulo do ToYSV é semelhante quando inoculado isoladamente ou em conjunto com o ToRMV (Figura 3). Já o ToRMV apresenta maior acúmulo aos 14 dpi, porém aos 28 dpi a concentração de DNA viral é reduzida a níveis semelhantes aos da infecção simples (Figura 3).

Em conjunto, esses resultados indicam que não ocorre sinergismo entre o ToYSV e o ToRMV em tomateiro, pois a infecção mista resulta em sintomas pouco mais severos em comparação aos induzidos pelos vírus isoladamente e não leva a aumento na concentração de

DNA de nenhum dos dois vírus. Em *N. benthamiana*, os sintomas induzidos são semelhantes àqueles induzidos pelo ToYSV isoladamente, e não ocorre aumento na concentração do ToYSV. Entretanto, o acúmulo do ToRMV na infecção mista aos 14 dpi é superior em comparação à infecção isolada, indicando a ocorrência de sinergismo. Esta elevação ainda foi mantida aos 28 dpi, porém com menor acúmulo, sugerindo que a planta ainda é capaz de reduzir o acúmulo do ToRMV mesmo em uma infecção mista.

Replicação do ToYSV e do ToRMV em protoplastos de *N. tabacum*

Os begomovírus são totalmente dependentes da maquinaria de replicação celular do hospedeiro para replicar seu genoma. Com isso, o primeiro passo para o sucesso no processo de infecção é a capacidade das proteínas virais envolvidas diretamente na replicação (Rep e Ren) de interagirem com proteínas do hospedeiro. Uma interação mais eficiente entre as proteínas virais e do hospedeiro pode levar a uma maior taxa de replicação viral, caracterizando uma boa adaptação do vírus ao hospedeiro. É possível que diferenças nas taxas de replicação entre begomovírus em um determinado hospedeiro possam levar a indução de sintomas distintos, por dois motivos: (i) uma maior taxa de replicação leva a um maior consumo dos metabólitos celulares, e (ii) uma maior quantidade de DNA viral pode levar a um maior acúmulo de proteínas virais envolvidas na supressão dos mecanismos celulares de defesa anti-viral.

Para avaliar se existem diferenças na taxa de replicação do ToYSV e ToRMV, foi realizado um ensaio de replicação em protoplastos. Clones infecciosos correspondentes aos componentes A e B do ToYSV e do ToRMV foram introduzidos por eletroporação em protoplastos de *N. tabacum* 'Xanthi'. Foram feitas coletas de protoplastos nos intervalos de 36 e 48 horas após a eletroporação. O DNA total foi extraído e analisados por hibridização. Em ambos os intervalos analisados, o DNA viral do ToYSV e do ToRMV acumulam na mesma quantidade (Figura 4), refletindo uma taxa de replicação semelhante.

Com o intuito de verificar se o maior acúmulo do ToRMV observado em plantas de *N. benthamiana* com infecção mista pelo ToYSV e ToRMV pode ser devido a uma maior taxa de replicação, protoplastos foram eletroporados com os componentes A e B de ambos os vírus simultaneamente. Não houve diferença no acúmulo de DNA de nenhum dos dois vírus nos intervalos analisados, em comparação à infecção por cada vírus isoladamente (Figura 4).

Em conjunto, estes resultados demonstram que a taxa de replicação do ToYSV e ToRMV em *N. tabacum* são semelhantes em infecção simples ou mista, indicando que esta característica não é responsável pela indução diferencial de sintomas. Além disso, o maior

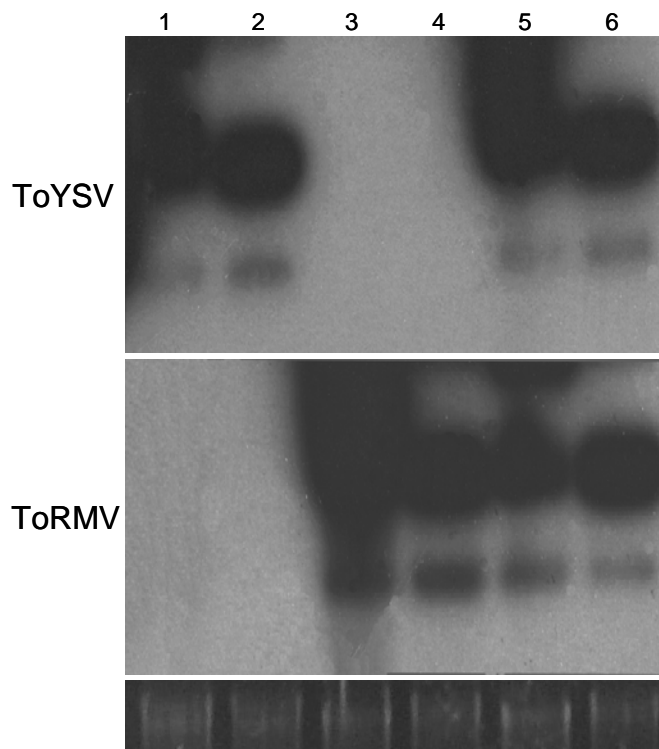


Figura 4. Replicação do ToYSV e do ToRMV em protoplastos de *Nicotiana tabacum*. Protoplastos foram eletroporados com plasmídeos contendo clones infecciosos dos componentes A e B do ToYSV e ToRMV, separadamente ou em conjunto. Os protoplastos foram coletados a 36 e 48 horas após a inoculação (hai), o DNA total foi extraído e analisado por meio de hibridização utilizando sondas específicas para cada vírus (indicado à esquerda). **1, 2.** DNA extraído de protoplastos eletroporados com o ToYSV, 36 e 48 hai, respectivamente. **3, 4.** DNA extraído de protoplastos eletroporados com o ToRMV, 36 e 48 hai, respectivamente. **5, 6.** DNA extraído de protoplastos eletroporados com o ToYSV e ToRMV simultaneamente, 36 e 48 hai, respectivamente.

acúmulo do ToRMV observado em *N. benthamiana* quando inoculado juntamente com o ToYSV provavelmente não é devido a maior taxa de replicação. Entretanto, esta hipótese não pode ser totalmente descartada, uma vez que os ensaios de replicação não foram realizados em protoplastos de tomateiro ou *N. benthamiana*.

Análise do tropismo de tecido do ToYSV e ToRMV em tomateiro e *N. benthamiana*

De modo geral, a infecção por geminivírus é restrita a células do tecido vascular (Horns & Jeske, 1991; Morilla *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 1996). Entretanto, algumas espécies de begomovírus são capazes de infectar outros tipos de células e tecidos, dependendo do hospedeiro (Morra & Petty, 2000; Wege *et al.*, 2000). Esta capacidade de invadir outros tecidos além do vascular indica uma maior adaptação do vírus a seu hospedeiro, e normalmente está associada a uma maior severidade de sintomas (Morra & Petty, 2000; Petty & Qin, 2001 ; Wege *et al.*, 2000).

Para verificar se o tropismo de tecido pode explicar a diferença nos sintomas induzidos por ToYSV e ToRMV, e se o maior acúmulo de DNA viral do ToYSV em relação ao ToRMV em tomateiro e *N. benthamiana* é devido a um maior número de células infectadas, foram realizados ensaios de hibridização *in situ*. Plantas de tomateiro e *N. benthamiana* foram inoculadas com cada vírus separado ou em conjunto. Folhas com sintomas de infecção sistêmica foram coletadas aos 21 dpi e utilizadas para o preparo de seções semifinas.

A hibridização de seções foliares obtidas de plantas de tomateiro infectadas pelo ToYSV detectou a presença de DNA viral apenas em células associadas aos feixes vasculares (Figura 5A). Da mesma forma, a infecção de plantas de tomateiro pelo ToRMV também se restringiu a células dos feixes vasculares (Figura 5B).

Em contraste ao observado em tomateiro, quando inoculado em *N. benthamiana* o ToYSV foi detectado em um grande número de células do mesófilo, além dos feixes vasculares (Figura 5C). Já o ToRMV permaneceu restrito às células dos feixes vasculares (Figura 5D). Quando seções foliares de plantas de *N. benthamiana* inoculadas com ambos os vírus foram analisadas utilizando a sonda específica para o ToRMV, o DNA viral foi detectado em células do mesófilo (Figura 5E), demonstrando que a infecção mista permitiu ao ToRMV invadir outros tecidos além do floema.

Em conjunto, estes resultados indicam que, em tomateiro, as diferenças observadas entre o ToYSV e ToRMV em termos de sintomas induzidos e acúmulo de DNA viral não são devidas a diferença na capacidade de infectar diferentes tecidos da planta, já que ambos os

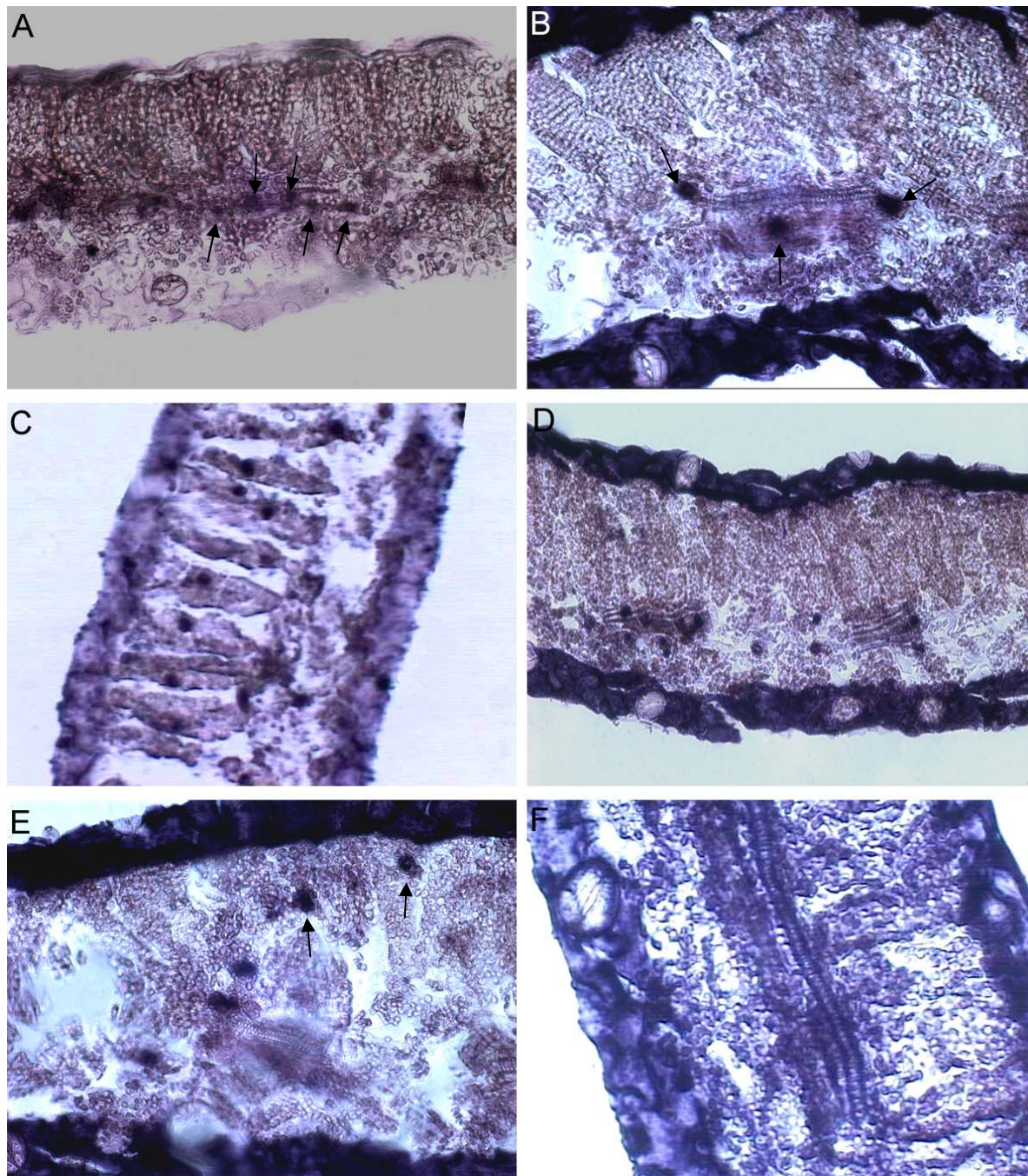


Figura 5. Localização do ToYSV e ToRMV em tomateiro e *N. benthamiana* por meio de hibridização *in situ* aos 21 dpi. Secções obtidas de plantas infectadas foram hibridizadas com sondas específicas para cada vírus e observadas em microscópio de luz. Em tomateiro infectado pelo ToYSV (A) ou ToRMV (B) o DNA viral é detectado apenas em células dos feixes vasculares (setas). Em *N. benthamiana* infectada pelo ToYSV (C) o DNA viral é detectado em células do parênquima paliçádico e lacunoso, porém o ToRMV (D) é detectado apenas em células do feixe vascular. Quando inoculado juntamente com o ToYSV, o ToRMV é detectado em células do mesófilo (setas) (E). Secção obtida de tomateiro sadio e hibridizado com sonda específica para ToYSV não apresentou sinal de hibridização (F).

vírus são restritos às células dos feixes vasculares. Entretanto, em *N. benthamiana* as diferenças entre ToYSV e ToRMV quanto a severidade dos sintomas e acúmulo de DNA viral podem estar relacionadas a diferenças no tropismo de tecido, pois o ToYSV é capaz de infectar um número bem maior de células e tecidos em comparação ao ToRMV. Assim como observado em outro estudo envolvendo dois begomovírus com diferente tropismo de tecido (Morra & Petty, 2000), a infecção conjunta do ToYSV e ToRMV resultou na capacidade do ToRMV em infectar outros tipos de células às quais normalmente ele não tem acesso em infecção simples, explicando o aumento no acúmulo de DNA viral observado na infecção mista.

DISCUSSÃO

Na natureza, os organismos devem se adaptar a diferentes ambientes e condições que surgem ao longo do tempo. Da mesma maneira, os patógenos são obrigados a se adaptar a seus hospedeiros, que constantemente evoluem buscando maior capacidade de resistência a fatores bióticos e abióticos. Essa co-evolução entre patógeno e hospedeiro leva a um aumento progressivo da variabilidade genética das populações do hospedeiro e do patógeno, e aqueles indivíduos mais adaptados tendem a prevalecer na população. No caso de vírus, a co-evolução e a consequente variabilidade genética que ela gera são fundamentais, pois sendo parasitas obrigatórios a probabilidade de extinção é maior caso percam a capacidade de infectar o hospedeiro.

Os vírus de plantas são transmitidos por vetores, em sua maioria insetos, que os introduzem diretamente no interior das células do hospedeiro. Dependendo da gama de hospedeiros do inseto vetor, os vírus podem ser introduzidos em espécies de plantas com características genéticas e moleculares diversas, sendo assim obrigados a se adaptar a diferentes hospedeiros. A capacidade de um determinado vírus em se adaptar rapidamente a um novo hospedeiros pode levá-lo a prevalecer na natureza, em comparação a outros vírus menos capazes.

No Brasil, os begomovírus são os principais vírus que afetam a cultura do tomateiro, atualmente infectado por um complexo com pelo menos oito espécies distintas (Ambrozevicius *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2003). A introdução recente de um novo biótipo do inseto vetor (biótipo B), que ao contrário do biótipo presente anteriormente (biótipo A) possui uma ampla gama de hospedeiros e coloniza eficientemente o tomateiro, permitiu a transferência de espécies nativas de begomovírus presentes em plantas silvestres e/ou daninhas para o tomateiro. Estas diferentes espécies virais se adaptaram de maneira distinta ao

novo hospedeiro, levando à prevalência de certas espécies nas diferentes regiões produtoras do país (Ambrozevicius *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2005b; Ribeiro *et al.*, 2003).

Duas espécies de begomovírus isoladas de tomateiro no estado de Minas Gerais, o ToYSV e o ToRMV, são exemplos do fenômeno descrito acima. O ToYSV, quando inoculado em tomateiro, induz sintomas mais severos e precoces em comparação ao ToRMV. Os sintomas do ToYSV em tomateiro surgem aos 10 dpi, e incluem mosaico severo, manchas cloróticas e encarquilhamento foliar, além de redução acentuada do porte da planta. Em contrapartida, os sintomas do ToRMV surgem aos 14 dpi, incluindo mosaico e uma leve distorção foliar. Estas diferenças indicam que o ToYSV é mais adaptado a infectar o tomateiro em relação ao ToRMV. Essa maior adaptação do ToYSV não se restringe apenas ao tomateiro, pois quando inoculado em *N. benthamiana* as diferenças na intensidade e precocidade dos sintomas induzidos são ainda mais evidentes.

Para verificar se a indução diferencial de sintomas entre o ToYSV e ToRMV está relacionada a diferentes concentrações de vírus na planta, plantas de tomateiro e *N. benthamiana* foram inoculadas separadamente com cada vírus, e a concentração de DNA viral foi estimada por meio de hibridização. Em tomateiro, o acúmulo de DNA viral do ToYSV é superior ao do ToRMV aos 14 dpi, entretanto aos 28 dpi o acúmulo de ambos os vírus se torna semelhante. O tomateiro exibe uma aparente capacidade de recuperação à infecção viral, pois ambos os vírus apresentam maior acúmulo aos 14 dpi, reduzido drasticamente aos 28 dpi. Resultados semelhantes foram obtidos em outro patossistema envolvendo begomovírus (Vanitharani *et al.*, 2004).

Quando se analisa o acúmulo viral em *N. benthamiana*, a diferença de sintomas é altamente correlacionada ao acúmulo de DNA viral. O acúmulo do ToYSV é bem superior ao do ToRMV tanto aos 14 quanto aos 28 dpi, pois a concentração de DNA do ToYSV permanece inalterada ao longo do tempo, enquanto a concentração de DNA do ToRMV é reduzida drasticamente. Estes resultados demonstram que as diferenças na precocidade e severidade dos sintomas induzidos por cada vírus tem uma correlação com o acúmulo viral. Entretanto, a metodologia utilizada não permite concluir se essa diferença é devida a uma maior taxa de replicação ou a uma maior proporção de células infectadas. Assim, o maior acúmulo de DNA viral pode indicar que o ToYSV possui uma maior taxa de replicação a nível celular em relação ao ToRMV, ou que o ToYSV possui um tropismo de tecido diferente do ToRMV, sendo capaz de infectar um maior número de célula e/ou tecidos.

Os ensaios de replicação em protoplastos de *N. tabacum* demonstraram que neste hospedeiro a taxa de replicação de ambos os vírus é similar, e que provavelmente a diferença

de acúmulo de DNA entre o ToYSV e ToRMV não é devida a diferenças na taxa de replicação viral.

Para testar a hipótese de diferente tropismo de tecido entre os dois vírus, ensaios de hibridização *in situ* foram realizados. A hibridização de secções foliares obtidas de plantas de tomateiro infectadas tanto pelo ToYSV como pelo ToRMV detectou a presença de DNA viral apenas em células associadas aos feixes vasculares, demonstrando que este componente da infecção não pode explicar as diferenças observadas entre os dois vírus neste hospedeiro. A hibridização *in situ* de tomateiro infectado por TYLCV também demonstrou que, apesar de induzir sintomas extremamente severos, o vírus fica restrito aos feixes vasculares (Morilla *et al.*, 2004).

Os sintomas da infecção pelo ToYSV em tomateiro surgem mais rapidamente em relação aos do ToRMV, e o ToYSV atinge maior concentração aos 14 dpi em relação ao ToRMV, provavelmente refletindo diferenças no início do processo infeccioso. Iniciando a infecção de forma mais rápida, o ToYSV será capaz de se replicar (atingindo maior concentração) antes de ser combatido pelos sistemas de defesa anti-viral ativados pela sua presença. Ao contrário, um maior atraso do ToRMV no início da infecção permite à planta montar uma resposta de defesa mais eficiente. Entretanto, em determinado ponto do processo de infecção os mecanismos de defesa do tomateiro afetam os dois vírus de maneira similar, pois aos 28 dpi ambos acumulam DNA viral na mesma proporção (embora os sintomas induzidos pelo ToYSV permaneçam mais severos em relação aos induzidos pelo ToRMV).

Considerando as semelhanças na taxa de replicação viral constatadas nos ensaios de replicação em protoplastos, as diferenças no início do processo de infecção podem ser devidas a características das proteínas codificadas pelo DNA-B, conforme observado em outros patossistemas (Ingham *et al.*, 1995; Saunders *et al.*, 2001). Trabalhos realizados com duas estirpes de TGMV identificaram uma região compreendendo a região 3' do gene codificador da proteína MP e a região intergênica do DNA-B como responsável pela diferença nos sintomas induzidos pelas duas estirpes (Saunders *et al.*, 2001). Uma outra hipótese bastante plausível é que o ToYSV codifique uma proteína com capacidade de supressão de silenciamento gênico mais eficiente do que aquela codificada pelo ToRMV, conforme constatado para o *African cassava mosaic virus* (ACMV) e o *East African cassava mosaic Cameroon virus* (EACMCV), dois begomovírus que infectam mandioca (Vanitharani *et al.*, 2004). Essas hipóteses devem ser testadas em estudos posteriores.

Em *N. benthamiana*, a hibridização de secções foliares detectou a presença do ToYSV em um grande número de células do mesófilo, enquanto nas secções obtidas de *N. benthamiana* infectadas pelo ToRMV o DNA viral foi detectado apenas nas células dos feixes

vasculares. Desta forma, apesar de replicarem em uma taxa similar em protoplastos, a capacidade do ToYSV em infectar um maior número de células em relação ao ToRMV pode explicar o maior acúmulo do ToYSV nesse hospedeiro. Ao iniciar o processo de infecção de forma mais eficiente e sendo capaz de infectar um número maior células, o ToYSV atinge maior concentração rapidamente, o que pode acarretar em uma maior quantidade de proteínas virais responsáveis pela supressão dos mecanismos de defesa anti-viral. Essa interpretação é sustentada pelo fato de que em *N. benthamiana* não se observou a redução no acúmulo de DNA do ToYSV entre 14 e 28 dpi. Já o menor acúmulo observado para o ToRMV pode ser devido ao início mais lento no processo de infecção e na capacidade de infectar um número menor de células, permitindo ao hospedeiro montar uma resposta de defesa mais rápida e eficiente.

A infecção mista pelo ToYSV e ToRMV em tomateiro induz sintomas aos 10 dpi, da mesma forma que a infecção simples pelo ToYSV. Aos 14 dpi os sintomas visualizados foram um pouco mais severos em relação aos induzidos pelo ToYSV isoladamente, e muito mais severos quando comparado aos induzidos pelo ToRMV isoladamente. Embora os sintomas sejam mais severos, a concentração de DNA viral por meio de hibridização indicou que a infecção mista não levou a um aumento no acúmulo de DNA viral para nenhum dos dois vírus. Fato semelhante foi observado em estudos de infecção mista de tomateiro com o TYLCV e TYLCSV (Morilla *et al.*, 2004), no qual a infecção simultânea induziu sintomas mais severos em relação a infecção isolada de cada vírus, no entanto não se observou aumento no acúmulo de nenhum dos vírus.

A inoculação simultânea do ToYSV e ToRMV em *N. benthamiana* induziu sintomas tão severos quanto os induzidos pelo ToYSV isoladamente. O acúmulo de DNA viral do ToYSV não foi alterado em comparação à infecção simples. Já o ToRMV apresentou um aumento na concentração aos 14 dpi em comparação à infecção simples, reduzido a níveis próximos aos observados na infecção simples aos 28 dpi. A hibridização *in situ* de secções foliares de *N. benthamiana* detectou a presença do ToRMV em células do mesófilo, demonstrando que a infecção mista entre o ToRMV e o ToYSV possibilita ao ToRMV invadir células do mesófilo e explicando o aumento de sua concentração viral em relação à infecção simples. Além disso, esse resultado demonstra que os fatores responsáveis pela capacidade do ToYSV em invadir o mesófilo também podem ser utilizados pelo ToRMV. A infecção mista entre *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), bem adaptado a *N. benthamiana* (induz sintomas severos e invade o mesófilo), e *Bean golden mosaic virus* (BGMV), pouco adaptado (assintomático e restrito aos feixes vasculares) também resultou na detecção do BGMV em células do mesófilo (Morra & Petty, 2000).

Embora o ToRMV quando inoculado juntamente com o ToYSV infecte maior número de células, isso não significa necessariamente que ambos os vírus estão presentes em todas as células infectadas. Assim, nas células infectadas apenas pelo ToRMV, com a ausência das proteínas codificadas pelo ToYSV (mais adaptadas a *N. benthamiana*), o ToRMV estará sujeito à ação dos mecanismos de defesa celular anti-viral, que neste ponto do processo de infecção estariam atuando mais eficientemente. Isso poderia explicar em parte a redução no acúmulo do ToRMV aos 28 dpi.

Como conclusão, os resultados confirmam que a maior severidade dos sintomas induzidos pelo ToYSV em tomateiro e *N. benthamiana* é devida à melhor adaptação do ToYSV em relação ao ToRMV nestes hospedeiros. Em tomateiro, a melhor adaptação do ToYSV pode estar associada à capacidade do ToYSV em iniciar o processo de infecção de forma mais rápida, atingindo concentrações mais elevadas em um período mais curto em comparação ao ToRMV. Este maior acúmulo de DNA viral pode levar a uma maior concentração das proteínas envolvidas na supressão de mecanismos de defesa anti-viral e na indução de sintomas. Em *N. benthamiana*, a maior adaptação do ToYSV está associada não apenas à rapidez no início do processo de infecção, mas também à capacidade do ToYSV de invadir tecidos do mesófilo foliar, enquanto o ToRMV é restrito ao floema. Estes resultados também refletem uma menor capacidade do hospedeiro (*N. benthamiana*) em responder à infecção pelo ToYSV, em comparação ao ToRMV.

LITERATURA CITADA

- AMBROZEVICIUS, L.P.; CALEGARIO, R.F.; FONTES, E.P.B.; CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 27, p. 372-377, 2002.
- ANDRADE, E.C.; AMBROZEVICIUS, L.P.; CALEGARIO, R.F.; FONTES, E.P.B.; ZERBINI, F.M. Molecular cloning and characterization of *Tomato chlorotic mottle virus* (TCMV), a new tomato-infecting begomovirus. *Virus Reviews and Research*, v. 7, p. 153, 2002.
- ARAGÃO, F.J.L.; BARROS, L.M.G.; BRASILEIRO, A.C.M.; RIBEIRO, S.G.; SMITH, F.D.; SANFORD, J.C.; FARIA, J.C.; RECH, E.L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 93, p. 142-150, 1996.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.D.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. (Eds.) *Current protocols in molecular biology*. New York: John Wiley and Sons. 1991.

- BRIDDON, R.W. Cotton leaf curl disease, a multicomponent begomovirus complex. *Molecular Plant Pathology*, v. 4, p. 427-434, 2003.
- CALEGARIO, R.F.; FERREIRA, S.S.; ANDRADE, E.C.; ZERBINI, F.M. Biological and molecular properties of *Tomato yellow spot virus*, (ToYSV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, submetido, 2006.
- FERNANDES, J.J.; CARVALHO, M.G.; ANDRADE, E.C.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; FONTES, E.P.B.; ZERBINI, F.M. Biological and molecular properties of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Plant Pathology*, v. 55, DOI 10.1111/j.1365-3059.2006.01395.x, 2006.
- FERREIRA, S.S.; FONTES, E.P.B.; ZERBINI, F.M. Occurrence of begomoviruses and satellite DNAs in weeds and tomato plants in Southeastern Brazil. In: 34th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (Abstracts on CD-Rom), Águas de Lindóia, SP. Anais. 2005.
- FONDONG, V.N.; PITA, J.S.; REY, M.E.C.; KOCHKO, A.; BEACHY, R.N.; FAUQUET, C.M. Evidence of synergism between African cassava mosaic virus and a new double-recombinant geminivirus infecting cassava in Cameroon. *Journal of General Virology*, v. 81, p. 287-297, 2000.
- FONTES, E.P.B.; SANTOS, A.A.; LUZ, D.F.; WACLAWOVSKY, A.J.; CHORY, J. The geminivirus nuclear shuttle protein is a virulence factor that suppresses transmembrane receptor kinase activity. *Genes & Development*, v. 18, p. 2545-2556, 2004.
- HORNS, T.; JESKE, H. Localization of abutilon mosaic virus (AbMV) DNA within leaf tissue by *in situ* hybridization. *Virology*, v. 181, p. 580-588, 1991.
- INGHAM, D.J.; PASCAL, E.; LAZAROWITZ, S.G. Both bipartite geminivirus movement proteins define viral host range, but only BL1 determines viral pathogenicity. *Virology*, v. 207, p. 191-204, 1995.
- JUNGHANS, H.; METZIAFF, M. A simple and rapid method for the preparation of total plant DNA. *BioTechniques*, v. 8, p. 176, 1990.
- LEGG, J.P.; THRESH, J.M. Cassava mosaic virus disease in East Africa: A dynamic disease in a changing environment. *Virus Research*, v. 71, p. 135-149, 2000.
- MONCI, F.; SANCHEZ-CAMPOS, S.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E. A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Virology*, v. 303, p. 317-326, 2002.
- MORALES, F.J.; ANDERSON, P.K. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology*, v. 146, p. 415-441, 2001.
- MORALES, F.J.; JONES, P.G. The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. *Virus Research*, v. 100, p. 57-65, 2004.
- MORILLA, G.; KRENZ, B.; JESKE, H.; BEJARANO, E.R.; WEGE, C. Tête à tête of tomato yellow leaf curl virus and tomato yellow leaf curl sardinia virus in single nuclei. *Journal of Virology*, v. 78, p. 10715-10723, 2004.
- MORRA, M.R.; PETTY, I.T.D. Tissue specificity of geminivirus infection is genetically determined. *Plant Cell*, v. 12, p. 2259-2270, 2000.
- QIN, Y., PETTY, I.T.D. Genetic analysis of bipartite geminivirus tissue tropism. *Virology*, v. 291, p. 311-323, 2001.

- POLSTON, J.E.; ANDERSON, P.K. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Disease*, v. 81, p. 1358-1369, 1997.
- RIBEIRO, S.G.; AMBROZEVICIUS, L.P.; ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; CALEGARIO, R.F.; FERNANDES, J.J.; LIMA, M.F.; MELLO, R.N.; ROCHA, H.; ZERBINI, F.M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology*, v. 148, p. 281-295, 2003.
- SAUNDERS, K.; WEGE, C.; VELUTHAMBI, K.; JESKE, H.; STANLEY, J. The distinct disease phenotypes of the common and yellow vein strains of Tomato golden mosaic virus are determined by nucleotide differences in the 3'-terminal region of the gene encoding the movement protein. *Journal of General Virology*, v. 82, p. 45-51, 2001.
- STANLEY, J.; BISARO, D.M.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; FAUQUET, C.M.; HARRISON, B.D.; RYBICKI, E.P.; STENGER, D.C. Family *Geminiviridae*. pp.301-326 In: FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. (Eds.) *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier Academic Press. 2005.
- TYLER, K.L.; FIELDS, B.N. Pathogenesis of viral infections. pp.173-218 In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Eds.) *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 1996.
- VANITHARANI, R.; CHELLAPPAN, P.; PITA, J.S.; FAUQUET, C.M. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology*, v. 78, p. 9487-9498, 2004.
- WANG, H.L.; GILBERTSON, R.L.; LUCAS, W.J. Spatial and temporal distribution of bean dwarf mosaic geminivirus in *Phaseolus vulgaris* and *Nicotiana benthamiana*. *Phytopathology*, v. 86, p. 1204-1214, 1996.
- WEGE, C.; GOTTHARDT, R.D.; FRISCHMUTH, T.; JESKE, H. Fulfilling Koch's postulates for *Abutilon mosaic virus*. *Archives of Virology*, v. 145, p. 2217-2225, 2000.
- WERE, H.K.; WINTER, S.; MAISS, E. Viruses infecting cassava in Kenya. *Plant Disease*, v. 88, p. 17-22, 2004.

CAPÍTULO 3

ANÁLISE PARCIAL DE REGIÕES DO GENOMA DE BEGOMOVÍRUS RESPONSÁVEIS PELA INDUÇÃO DIFERENCIAL DE SINTOMAS EM TOMATEIRO E *Nicotiana benthamiana*

Andrade, E.C., Manhani, G.G., Fontes, E.P.B. & Zerbini, F.M. Análise parcial de regiões do genoma de begomovírus responsáveis pela indução diferencial de sintomas em tomateiro e *N. benthamiana*.

ANÁLISE PARCIAL DE REGIÕES DO GENOMA DE BEGOMOVÍRUS RESPONSÁVEIS PELA INDUÇÃO DIFERENCIAL DE SINTOMAS EM TOMATEIRO E *Nicotiana benthamiana*

E.C. Andrade¹, G.G.Manhani¹, E.P.B.Fontes² and F.M. Zerbini¹

¹Departamento de Fitopatologia/BIOAGRO e ²Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil, 36570-000

RESUMO

O gênero *Begomovirus*, família *Geminiviridae*, engloba vírus que infectam plantas e possuem genoma de DNA fita simples circular constituído por um ou dois componentes, denominados DNA-A e DNA-B. Apesar de coletivamente infectarem uma ampla gama de hospedeiros, a gama de hospedeiros de cada begomovírus é normalmente restrita, indicando que diferentes espécies possuem adaptações específicas a determinados hospedeiros. Utilizando como critérios a severidade de sintomas e acúmulo de DNA viral em tomateiro e em *Nicotiana benthamiana*, o ToYSV é mais adaptado em relação ao ToRMV, pois em ambos os hospedeiros induz sintomas mais severos e precoces e atinge maior concentração viral. Com o objetivo de mapear os determinantes genéticos virais responsáveis pela maior adaptação do ToYSV em relação ao ToRMV, genomas híbridos entre os dois vírus foram construídos e avaliados quanto ao ganho ou perda das características analisadas. Foram construídos dois recombinante recíprocos, o primeiro baseado no ToRMV contendo os genes *MP* e *NSP* do ToYSV, e o segundo baseado no ToYSV porém contendo os genes *MP* e *NSP* do ToRMV. Em tomateiro, o ToRMV recombinante induziu sintomas e acumulou DNA de forma similar ao ToRMV. Em *N. benthamiana* o recombinante induziu sintomas mais severos e acumulou mais DNA em relação ao ToRMV, porém os sintomas foram menos severos em relação ao ToYSV. O ToRMV recombinante em *N. benthamiana* permaneceu restrito ao floema. O ToYSV recombinante, quando inoculado em tomateiro, induziu sintomas mais atenuados e acumulou menos DNA em comparação ao ToYSV, porém os sintomas foram mais severos em relação ao ToRMV. Similarmente, quando inoculado em *N. benthamiana* induziu sintomas menos severos do que o ToYSV. O ToYSV recombinante foi capaz de invadir e infectar células do mesófilo em *N. benthamiana*. Os resultados sugerem que os genes *MP* e *NSP* estão envolvidos na adaptação do ToYSV ao tomateiro e *N. benthamiana*, porém outros genes e/ou regiões reguladoras também devem estar envolvidos. Além disso a contribuição dos genes *MP* e *NSP* na adaptação de begomovírus é dependente do hospedeiro e do *background* genético do vírus.

ABSTRACT

The genus *Begomovirus* of the family *Geminiviridae* is comprised of plant viruses with a circular, single-stranded DNA genome with one or two components, named DNA-A and DNA-B. Although, collectively, member of the genus have a wide host range, the host ranges of individual viruses are usually narrow, indicating specific adaptations to certain hosts. Using as criteria for adaptation the severity of symptoms and viral accumulation, ToYSV is better adapted than ToRMV in tomato and *Nicotiana benthamiana*, since in both hosts it induces earlier and more severe symptoms and reaches a higher viral concentration. In order to map the viral genetic determinants responsible for host adaptation, recombinant viruses were constructed between ToYSV and ToRMV, and were evaluated in terms of gain or loss of functions. Two reciprocal recombinants were constructed, one based on ToRMV with the *MP* and *NSP* genes from ToYSV, and the other based on ToYSV with the *MP* and *NSP* genes from ToRMV. In tomato, the ToRMV-based recombinant behaved similarly to ToRMV in terms of symptom severity and DNA accumulation. In *N. benthamiana* the recombinant induced more severe symptoms and reached a higher concentration in comparison to ToRMV, but symptoms were less severe in relation to ToYSV. The ToRMV-based recombinant remained phloem-restricted in *N. benthamiana*. The ToYSV-based recombinant, when inoculated in tomato, induced attenuated symptoms and accumulated less DNA in comparison to ToYSV, however symptoms were more severe in relation to ToRMV. Similarly, when inoculated on *N. benthamiana* the recombinant induced attenuated symptoms in comparison to ToYSV. The ToYSV-based recombinant was capable of invading mesophyll cells of *N. benthamiana*. Together, the results indicate that the *MP* and *NSP* genes are involved in ToYSV adaptation to tomato and *N. benthamiana*, but other genes and/or regulatory regions must also be involved. Also, the contribution of the *MP* and *NSP* genes in begomovirus host adaptation is dependent on the host and on the genetic background of the virus.

INTRODUÇÃO

Geminiviridae constitui uma família de vírus de plantas que possui material genético composto de DNA de fita simples circular com 2.600 a 3.000 nucleotídeos, encapsidado em uma partícula icosaédrica geminada (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). A família é dividida em quatro gêneros (*Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus*) de acordo com o inseto vetor, gama de hospedeiros, organização do genoma e relacionamento filogenético (Stanley *et al.*, 2005). Os begomovírus são transmitidos pela “mosca-branca” *Bemisia tabaci*, infectam dicotiledôneas e possuem genoma constituído de um ou dois componentes (DNA-A e DNA-B). Concentram os mais importantes vírus desta família, principalmente porque coletivamente infectam culturas de grande importância econômica como o feijoeiro, a mandioca, o algodoeiro e o tomateiro (Briddon, 2003; Legg & Thresh, 2000; Monci *et al.*, 2002; Morales & Anderson, 2001; Polston & Anderson, 1997), acarretando grandes prejuízos e muitas vezes levando ao abandono do cultivo em certas regiões (Morales & Jones, 2004). No Brasil, problemas associados a begomovírus surgiram a partir da década de 1960 na cultura do feijoeiro (Costa, 1975; Faria *et al.*, 2000). A partir da década de 1990 passaram a afetar também a cultura do tomateiro, atualmente infectada por um complexo viral composto por pelo menos oito espécies virais disseminadas em praticamente todas as regiões produtoras do país (Ambrozevicius *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2003). O *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) e o *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) são duas dessas espécies, detectadas no estado de Minas Gerais e caracterizadas em termos biológicos e moleculares na UFV (Calegario *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2006).

Uma das razões para a rápida emergência e disseminação de begomovírus em tomateiro foi a introdução no Brasil do biótipo B de *B. tabaci*, no início da década de 1990 (França *et al.*, 1996; Melo, 1992). Em comparação ao biótipo A, até aquela data o único presente no país, o biótipo B possui maior capacidade reprodutiva e maior gama de hospedeiros, colonizando diversas solanáceas, como o tomateiro, e também diversas espécies de plantas daninhas e silvestres, possibilitando que vírus nativos presentes nestas plantas sejam transferidos para o tomateiro (Bellows *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1995). A coexistência em um mesmo hospedeiro de espécies virais pouco adaptadas favorece a ocorrência de recombinação e/ou pseudo-recombinação entre genomas virais, podendo levar ao surgimento de novas espécies mais adaptadas. Resultados obtidos por diversos grupos de pesquisadores sugerem que esse processo de evolução, adaptação e seleção de espécies de begomovírus pode ocorrer em períodos de tempo relativamente curtos, da ordem de 10 a 15 anos (Hou *et*

al., 1998; Monci *et al.*, 2002; Padidam *et al.*, 1999; Pita *et al.*, 2001; Sanz *et al.*, 2000; Schnippenkoetter *et al.*, 2001).

A adaptação de um vírus a seu hospedeiro é determinada por meio de interações entre proteínas virais e fatores do hospedeiro, que podem ser mais ou menos eficientes dependendo da combinação vírus-hospedeiro. Uma maior adaptação ao hospedeiro pode resultar em aumento da taxa de replicação e/ou acúmulo de DNA, movimento célula-célula e sistêmico mais eficiente, infecção de um maior número de células e ou tecidos (ampliação do tropismo de tecido) e supressão mais eficiente dos mecanismos de defesa da planta. Estes fatores, isolados ou em associação, podem levar o vírus a induzir sintomas mais severos em seu hospedeiro. Utilizando como critérios a severidade de sintomas e acúmulo de DNA viral em tomateiro e em *N. benthamiana*, o ToYSV seria mais adaptado em relação ao ToRMV, pois em ambos os hospedeiros o ToYSV induz sintomas mais severos e precoces e acumula mais DNA em relação ao ToRMV.

Uma estratégia que pode ser utilizada para mapear com precisão determinantes genéticos virais responsáveis pela maior adaptação de um vírus em relação a outro é a construção de genomas híbridos (quimeras) entre os dois vírus, testando as quimeras para ganho ou perda das características analisadas (Morra & Petty, 2000; Petty & Qin, 2001). Estudos anteriores utilizando diferentes espécies de begomovírus, ou estirpes distintas de uma mesma espécie, identificaram os produtos gênicos codificados pelo DNA-B (as proteínas MP e NSP) e suas respectivas regiões promotoras como responsáveis pela indução de sintomas e tropismo de tecido (Hussain *et al.*, 2005; Ingham *et al.*, 1995; Morra & Petty, 2000; Pascal *et al.*, 1993; Petty & Qin, 2001; Schaffer *et al.*, 1995). A proteína Trap, codificada pelo DNA-A e com funções de transativação da transcrição do gene NSP e supressão de silenciamento gênico, também é um fator de virulência de begomovírus (Petty & Qin, 2001; Vanitharani *et al.*, 2004). Entretanto, o mecanismo pelo qual essas proteínas modulam a infecção viral ainda não foi elucidado.

Este trabalho teve como objetivo identificar regiões do genoma viral responsáveis pela indução diferencial de sintomas por begomovírus em tomateiro e *N. benthamiana*, utilizando como modelos o ToYSV e o ToRMV.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados virais

Foram utilizados clones infecciosos correspondentes ao DNA-A e -B dos isolados ToYSV-[MG-Bi2] (Capítulo 1) e ToRMV-[MG-Ub1] (Fernandes *et al.*, 2006), mantidos a -80°C na forma de estoques em glicerol.

Construção de genomas recombinantes entre o ToYSV e ToRMV

A construção do recombinante baseado no ToYSV-B contendo os genes *MP* e *NSP* do ToRMV foi realizada em três etapas (Figura 1). Primeiramente foram desenhados oligonucleotídeos para amplificar um fragmento contendo a região promotora do gene *MP* (denominada BLi), a região intergênica e a região promotora do gene *NSP* (BRi) do ToYSV-B, contendo sítios para enzimas de restrição *Cla* I e *EcoR* I (Tabela 1). O fragmento amplificado foi inserido no plasmídeo pBluescript II KS- (pKS-, Stratagene), previamente clivado com as mesmas enzimas, gerando o clone pToY-BRi/BLi. Em seguida foi amplificada a região genômica do ToRMV que contém os genes *MP* e *NSP*, utilizando-se oligonucleotídeos com sítios para as enzimas *EcoR* I e *Sma* I. O fragmento amplificado foi inserido no clone pToY-BRi/BLi previamente clivado com as mesmas enzimas, gerando o clone pToY-BRi/BLi-(ToR-MP/NSP). Por fim, o fragmento contendo BLi e a região comum foi amplificado utilizando oligonucleotídeos e ligado diretamente ao clone pToY-BRi/BLi-(ToR-MP/NSP) previamente clivado com a enzima *Sma* I, gerando o clone pToY-BRi/BLi(1.2)-(ToR-MP/NSP).

O recombinante baseado no pToRMV contendo os genes *MP/NSP* do ToYSV foi construído utilizando-se a mesma estratégia (Figura 1). Um fragmento englobando a região promotora do gene *MP*, a região intergênica e a região reguladora do gene *NSP* (BRi) do ToRMV foi amplificado com oligonucleotídeos contendo sítios para as enzimas de restrição *Xho* I e *EcoR* I. O fragmento amplificado foi inserido no plasmídeo pBluescript II KS- (pKS-, Stratagene), previamente clivado com as mesmas enzimas, gerando o clone pToR-BRi/BLi. Em seguida a região contendo os genes *MP/NSP* do ToYSV foi amplificada utilizando-se oligonucleotídeos com sítios para as enzimas *EcoR* I e *Sma* I, e inserida no clone pToR-BRi/BLi previamente clivado com as mesmas enzimas, gerando o clone pToR-BRi/BLi-(ToY-MP/NSP). Por fim, o fragmento contendo BLi e a região comum foi amplificado utilizando oligonucleotídeos com sítios para as enzimas *Xho* I e *Sac* I. O amplicon foi clivado com a enzima *Xho* I e teve sua extremidade coesiva foi preenchida. Em seguida o fragmento

foi clivado com *Sac* I e inserido no clone pToR-BLi-(ToY-MP/NSP) previamente clivado com *Sma* I e *Sac* I, gerando o clone pToR-BRi/BLi(1.2)-(ToY-MP/NSP).

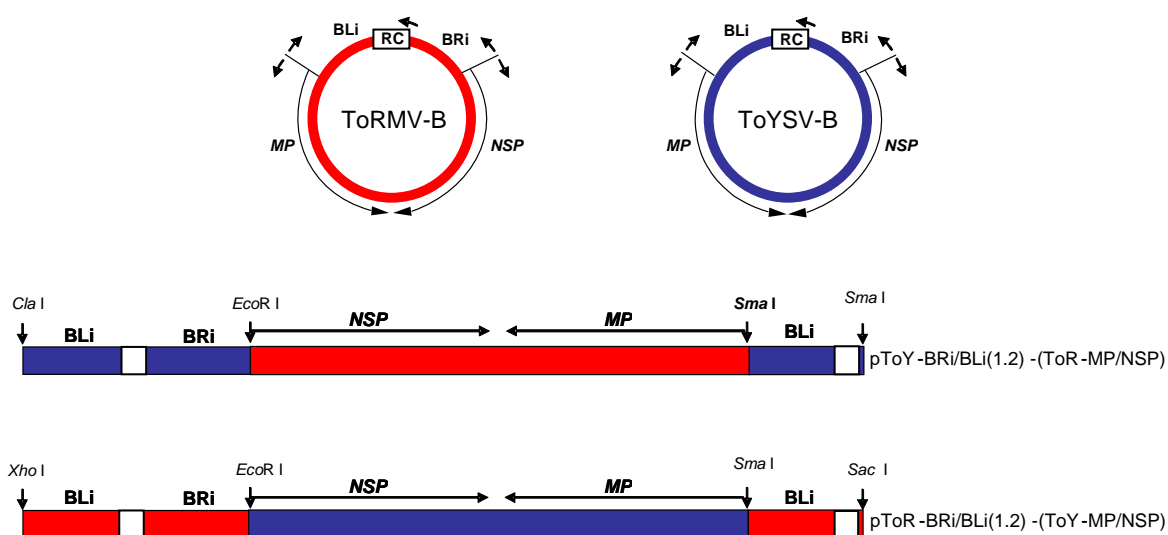


Figura 1. Representação esquemática do DNA-B do ToYSV e ToRMV e dos recombinantes pToR-BRi/BLi(1.2)-(ToY-MP/NSP) e pToY-BRi/BLi(1.2)-(ToR-MP/NSP). Genomas virais recombinantes foram construídos trocando-se os genes *MP/NSP* entre o ToYSV (azul) e o ToRMV (vermelho). Foram utilizados oligonucleotídeos (setas) contendo sítios para enzimas de restrição para amplificar cada uma das regiões codificadoras e não-codificadoras necessárias para a construção dos clones recombinantes infecciosos.

Inoculação dos componentes recombinantes

Os clones recombinantes, acompanhados do DNA-A cognato, foram inoculados via biobalística (Aragão *et al.*, 1996) em plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Santa Clara) e *Nicotiana benthamiana*, sempre utilizando-se 2 µg de cada componente genômico. As plantas inoculadas foram mantidas em casa-de-vegetação durante toda a duração dos experimentos.

Extração de DNA a partir de plantas infectadas

Cerca de 0,3 g de folhas apresentando sintomas de infecção viral, coletadas aos 14 e 28 dias pós-inoculação (dpi), foram maceradas em nitrogênio líquido e transferidos para um tubo ao qual foram adicionados 1 ml de tampão de extração (Tris-HCl 100 mM pH 8,0, NaCl 200 mM, EDTA 2 mM e β-mercaptoetanol 1%) e 50 µl de SDS 20%, incubando-se a 65°C por 10 minutos. Em seguida foi adicionado 1 ml de fenol/clorofórmio (1:1), seguido de agitação por 1 minuto e centrifugação a 10.000 g por 3 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado igual volume de fenol/clorofórmio, novamente centrifugando-se a 10.000 g por 3 minutos. O DNA foi precipitado adicionando-se 0,7 volumes de isopropanol, seguido de centrifugação a 10.000 g por 5 minutos e lavagem com etanol 70% (v/v). O “pellet” foi ressuscitado em 200 µl de TE (Tris-HCl 10mM pH 7,5, EDTA 1mM).

Hibridização molecular

Cerca de 2 µg de DNA total foram separados por eletroforese em gel de agarose (0,7%), transferidos e covalentemente ligados a membrana de náilon (Hybond-N+, Amersham Biosciences). As membranas foram submetidas a hibridização com sondas específicas para cada espécie viral. A sonda para detecção do ToYSV corresponde ao DNA-A completo liberado do clone pToYSV-A1.2 (Capítulo 1). A sonda para detecção do ToRMV corresponde aos nucleotídeos 1711-2147 do DNA-A, liberados a partir do clone pUb1-49 (Fernandes *et al.*, 2006) por meio da digestão com as enzimas *Cla* I e *Eco*R I. Ambas as sondas foram marcadas com α-[³²P]-dCTP utilizando-se o kit Prime-it II (Stratagene), conforme instruções do fabricante. A mesma quantidade de DNA foi marcada para todas as hibridizações. As hibridizações e lavagens foram realizadas de acordo com técnicas padrão (Ausubel *et al.*, 1991), adotando-se condições de alta especificidade (hibridização a 42°C e lavagem a 65°C).

Preparo de secções semifinas a partir de tecido foliar infectado

Folhas localizadas no penúltimo entrenó foram coletadas, cortadas em fragmentos de 1cm² e fixadas em paraformaldeído 4% em PBS (KH₂PO₄ 1,8 mM pH 7,2, Na₂HPO₄ 8 mM,

NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM) por 12 horas. Após lavagem dos fragmentos em PBS, estes foram desidratados em série alcoólica crescente (10-100%), infiltrados com xilol:etanol (1:3, 1:1, 3:1) por uma hora em cada passagem, em xilol puro por uma hora e por último em xilol:parafina (1:1) a 68°C por toda a noite. A infiltração com parafina pura foi realizada a 68°C durante 3 dias, trocando-se a parafina a cada dia. A última inclusão foi realizada em parafina com 8% de cera de abelha. O tecido foi montado em um bloco de parafina com 8% de cera de abelha e solidificado em gelo. Seções de 30 µm foram obtidas em micrótomo de mesa (Spencer 820, American Optical), fixadas em lâminas cobertas com adesivo de Haupt e secas a temperatura ambiente. A parafina foi retirada com xilol puro, as seções foram rehidratadas em série alcoólica decrescente (100, 95, 70 e 50%), lavadas em PBS e novamente fixadas em paraformaldeído 4% em PBS por 15 minutos. Por último, as seções foram tratadas com proteinase K (20 µg/ml) em PBS (pH 8,0) por 15 minutos a 37°C, seguido da lavagem com PBS (pH 7,2) acrescido de 2 mg/ml de glicina.

Hibridização *in situ*

Os fragmentos utilizados como sondas para detecção do ToYSV e ToRMV em seções de tecido foliar foram os mesmos utilizados para as hibridizações. A sonda controle consistiu do plasmídeo pKS- linearizado com a enzima *EcoR* I. As sondas foram marcadas utilizando-se o kit DIG DNA Labeling and Detection (Roche Applied Sciences), purificadas utilizando-se o kit Perfectprep Cleanup (Eppendorf) de acordo com instruções do fabricante, e ressuspensas em 50 µl de água.

As seções foram pré-hibridizadas por 3 horas em 4× SSC, formamida 50%, solução de Denhardt e 500 µg/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado, em câmara úmida a 37°C. Em seguida a solução foi trocada, acrescentando-se 800 ng/ml de sonda e sulfato de dextran 4%, incubando-se em uma câmara úmida a 37°C por 24 horas. Após a hibridização as seções foram lavadas em 1× SSC a temperatura ambiente, 1× SSC a 55°C por 15 minutos (duas vezes), 0,5× SSC a 55°C por 15 minutos (duas vezes) e 0,5× SSC por 10 minutos a temperatura ambiente, e transferidas para TBS (Tris-HCl 100 mM pH 7,5, NaCl 150 mM). As seções foram bloqueadas com TBS acrescido de Triton X-100 0,1% e reagente de bloqueio 1% (Roche Applied Sciences), e posteriormente incubadas por 12 horas a 4°C em TBS, Triton X-100 0,1% e reagente de bloqueio 1% contendo anticorpo anti-DIG diluído 1:1000. Em seguida as seções foram lavadas três vezes em TBS e equilibradas em tampão de detecção (Tris-HCl 100mM pH 9,5, NaCl 100mM, MgCl₂ 50mM). Por fim, as seções foram incubadas

em tampão de detecção contendo 300 µg/ml de NBT e 165 µg/ml BCIP (Promega) por 3-16 horas, sendo posteriormente transferidas para água.

As seções foram montadas em glicerol 50% e observadas em microscópio ótico. As imagens foram capturadas com o programa Spotbasic. Foram contados o número e tipo (mesófilo ou vascular) de células nas quais os vírus foram detectados.

RESULTADOS

Para avaliar o envolvimento dos genes *MP* e *NSP* na indução de sintomas em tomateiro e *N. benthamiana* foram construídos dois recombinantes recíprocos, o primeiro [pToR-BRi/BLi(1.2)-(ToY-MP/NSP)] baseado no ToRMV porém contendo os genes *MP* e *NSP* do ToYSV, e o segundo baseado no ToYSV porém contendo os genes *MP* e *NSP* do ToRMV [pToY-BRi/BLi(1.2)-(ToR-MP/NSP)]. Esses recombinantes, inoculados em conjunto com os componentes A cognatos, foram avaliados quanto a severidade de sintomas, acúmulo de DNA viral e tropismo de tecido em tomateiro e *N. benthamiana*, em comparação ao ToYSV e ToRMV selvagens.

Efeito dos genes *MP* e *NSP* do ToYSV na severidade de sintomas, acúmulo de DNA e tropismo de tecido em tomateiro e *Nicotiana benthamiana*

Plantas de tomateiro inoculadas com o recombinante pToR-BRi/BLi(1.2)-(ToY-MP/NSP) apresentaram sintomas aos 14 dpi, caracterizados por distorção foliar e mosaico semelhantes aos induzidos pelo ToRMV, e menos severos em relação aos induzidos pelo ToYSV (Figura 2). Para avaliar o acúmulo de DNA do recombinante em relação aos vírus selvagens, plantas com sintomas de infecção sistêmica tiveram seu DNA total extraído aos 14 e 28 dpi, e a concentração de DNA viral foi estimada por meio de hibridização. Semelhante ao observado quanto aos sintomas, o acúmulo de DNA do pToR-BRi/BLi(1.2)-(ToY-MP/NSP) em tomateiro foi semelhante ao do ToRMV (Figura 3).

Em *N. benthamiana* o pToR-BRi/BLi(1.2)-(ToY-MP/NSP) induziu sintomas aos 12 dpi, ao contrário do ToRMV que induz sintomas aos 14 dpi. Os sintomas sistêmicos induzidos pelo recombinante foram ligeiramente mais severos em relação ao ToRMV. As folhas apresentaram epinastia mais acentuada e pontos cloróticos espalhados pela folha (Figura 2). Estes sintomas são bem menos severos do que os induzidos pelo ToYSV neste hospedeiro (Figura 2). A avaliação do acúmulo de DNA viral indicou que aos 14 dpi o pToR-BRi/BLi(1.2)-(ToY-MP/NSP) acumula DNA de forma semelhante ao ToRMV, entretanto aos 28 dpi o acúmulo de DNA do recombinante é bem superior ao do vírus selvagem.

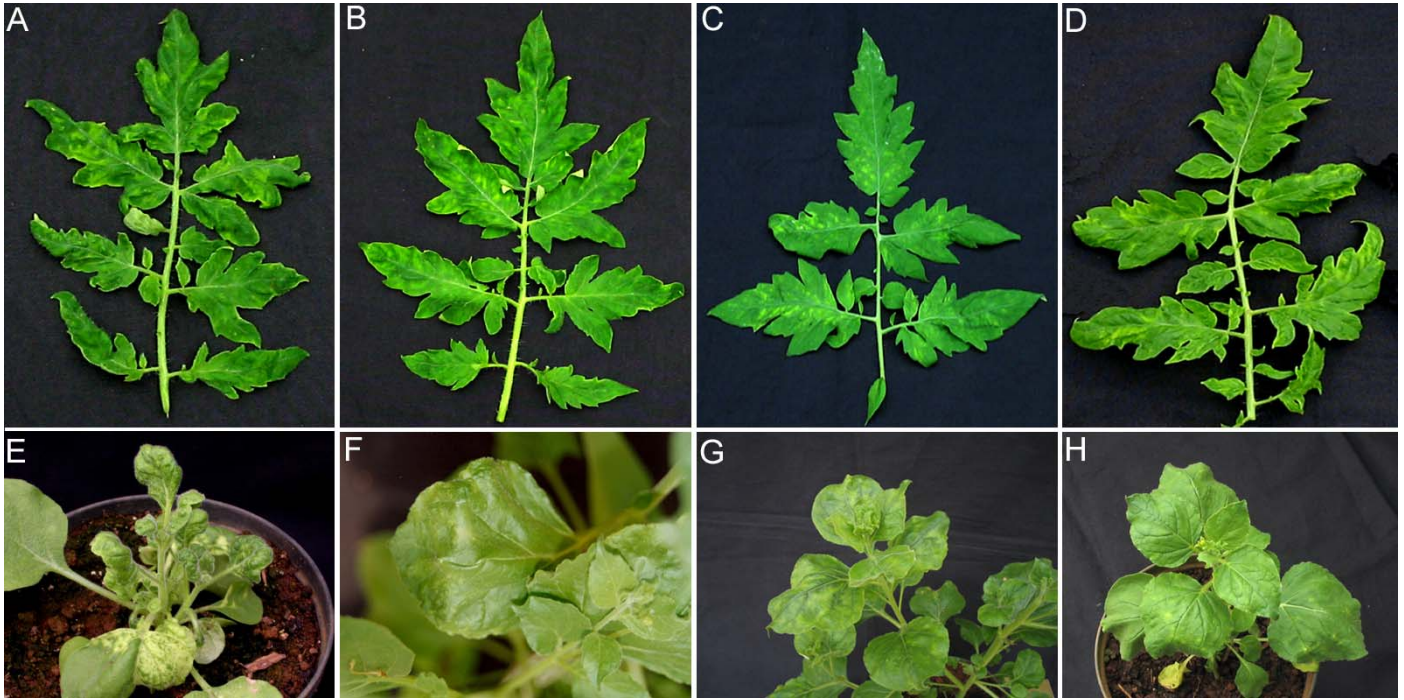


Figura 2. Sintomas induzidos pelo ToYSV, ToRMV e pelos vírus recombinantes em plantas de tomateiro e *Nicotiana benthamiana* aos 14 dpi. **A.** Tomateiro infectado pelo ToYSV, apresentando mosaico e distorção foliar severos. **B.** Tomateiro infectado pelo ToRMV, com sintomas mais atenuados. **C.** Tomateiro infectado pelo recombinante pToR-BRi/BLi(1.2)-(ToY-MP/NSP). **D.** Tomateiro infectado pelo recombinante pToY-BRi/BLi(1.2)-(ToR-MP/NSP). **E.** *N. benthamiana* infectada pelo ToYSV, apresentando mosaico, distorção foliar e redução de crescimento acentuados. **F.** *N. benthamiana* infectada pelo ToRMV, com mosaico leve e ligeira distorção foliar. **G.** *N. benthamiana* infectada pelo recombinante pToY-BRi/BLi(1.2)-(ToR-MP/NSP). **H.** *N. benthamiana* infectada pelo recombinante pToR-BRi/BLi(1.2)-(ToY-MP/NSP).

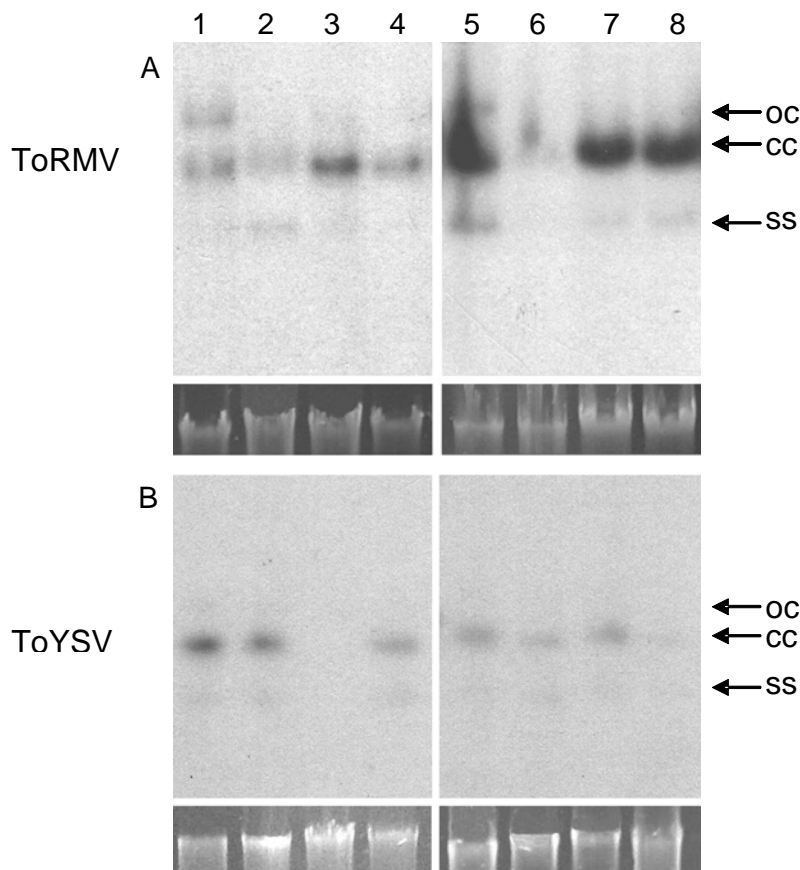


Figura 3. Acúmulo de DNA viral do ToRMV e ToYSV selvagens e dos recombinantes pToR-BRi/BLi(1.2)-(ToY-MP/NSP) e pToY-BRi/BLi(1.2)-(ToR-MP/NSP). Plantas de tomateiro e *N. benthamiana* foram inoculadas com o ToRMV e ToYSV e com os vírus recombinantes. O DNA total foi extraído de folhas infectadas sistemicamente aos 14 e 28 dpi e o acúmulo de DNA viral foi analisado por meio de hibridização. **A. 1, 2.** DNA extraído de tomateiro infectado pelo ToRMV aos 14 e 28 dpi, respectivamente. **3, 4.** DNA extraído de tomateiro infectado pelo pToR-BRi/BLi(1.2)-(ToY-MP/NSP) aos 14 e 28 dpi, respectivamente. **5, 6.** DNA extraído de *N. benthamiana* infectada pelo ToRMV aos 14 e 28 dpi, respectivamente. **7, 8.** DNA extraído de *N. benthamiana* infectada pelo pToR-BRi/BLi(1.2)-(ToY-MP/NSP) aos 14 e 28 dpi, respectivamente. **B. 1, 2.** DNA extraído de tomateiro infectado pelo ToYSV aos 14 e 28 dpi, respectivamente. **3, 4.** DNA extraído de tomateiro infectado pelo pToY-BRi/BLi(1.2)-(ToR-MP/NSP) aos 14 e 28 dpi, respectivamente. **5, 6.** DNA extraído de *N. benthamiana* infectada pelo ToYSV aos 14 e 28 dpi, respectivamente. **7, 8** DNA extraído de *N. benthamiana* infectada pelo pToY-BRi/BLi(1.2)-(ToR-MP/NSP) aos 14 e 28 dpi, respectivamente. As posições relativas às formas de DNA circular aberto (oc), fita simples (ss) e circular fechado (cc) estão indicados pelas setas. Os géis corados com brometo de etídeo são apresentados abaixo de cada painel para comparação das quantidades de DNA hibridizadas.

É interessante notar que essa diferença é devida a uma menor redução no acúmulo de DNA do recombinante de 14 para 28 dpi, em relação ao ToRMV (Figura 3). Em conjunto, os resultados indicam que as proteínas MP e NSP do ToYSV contribuem para a indução de sintomas em *N. benthamiana*, porém não são os únicos determinantes virais para essa característica. Por outro lado, o maior acúmulo de DNA viral do recombinante aos 28 dpi indica que de alguma forma as proteínas MP e NSP do ToYSV permitem ao vírus se contrapor a um possível mecanismo de defesa da planta que reduz o acúmulo de DNA viral no decorrer do processo infeccioso do ToRMV selvagem.

Para avaliar se o pToR-BRi/BLi(1.2)-(ToY-MP/NSP) teve seu tropismo de tecido alterado em relação ao ToRMV selvagem, estudos de hibridização *in situ* foram realizados. Os resultados demonstram que, apesar de possuir os dois genes responsáveis pelo movimento viral do ToYSV, o pToR-BRi/BLi(1.2)-(ToY-MP/NSP) permanece restrito à células do feixe vascular em *N. benthamiana*, assim como o ToRMV (Figura 4). Assim, as proteínas MP e NSP do ToYSV não são capazes de alterar o tropismo de tecido do ToRMV.

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

Efeito dos genes *MP* e *NSP* do ToRMV na severidade de sintomas, acúmulo de DNA e tropismo de tecido em tomateiro e *Nicotiana benthamiana*

Em tomateiro, o recombinante pToY-BRi/BLi(1.2)-(ToR-MP/NSP) induziu sintomas aos 12 dpi, mais tardiamente em relação ao ToYSV, que induz sintomas aos 10 dpi. Os sintomas induzidos pelo recombinante, que incluem manchas cloróticas e leve distorção foliar (Figura 2), são mais atenuados em relação ao ToYSV, porém mais severos que os induzidos pelo ToRMV. Para verificar se a menor severidade dos sintomas induzidos pelo pToY-BRi/BLi(1.2)-(ToR-MP/NSP) está correlacionada com menor acúmulo de DNA viral, DNA total de plantas infectadas sistemicamente foi extraído aos 14 e 28 dpi e analisados por hibridização (Figura 3). Os resultados demonstram que o acúmulo de DNA pelo pToY-BRi/BLi(1.2)-(ToR-MP/NSP) é bem inferior em relação ao do ToYSV.

Quando inoculado em *N. benthamiana*, o pToY-BRi/BLi(1.2)-(ToR-MP/NSP) induziu sintomas bem menos severos em relação aos induzidos pelo ToYSV, entretanto bem mais

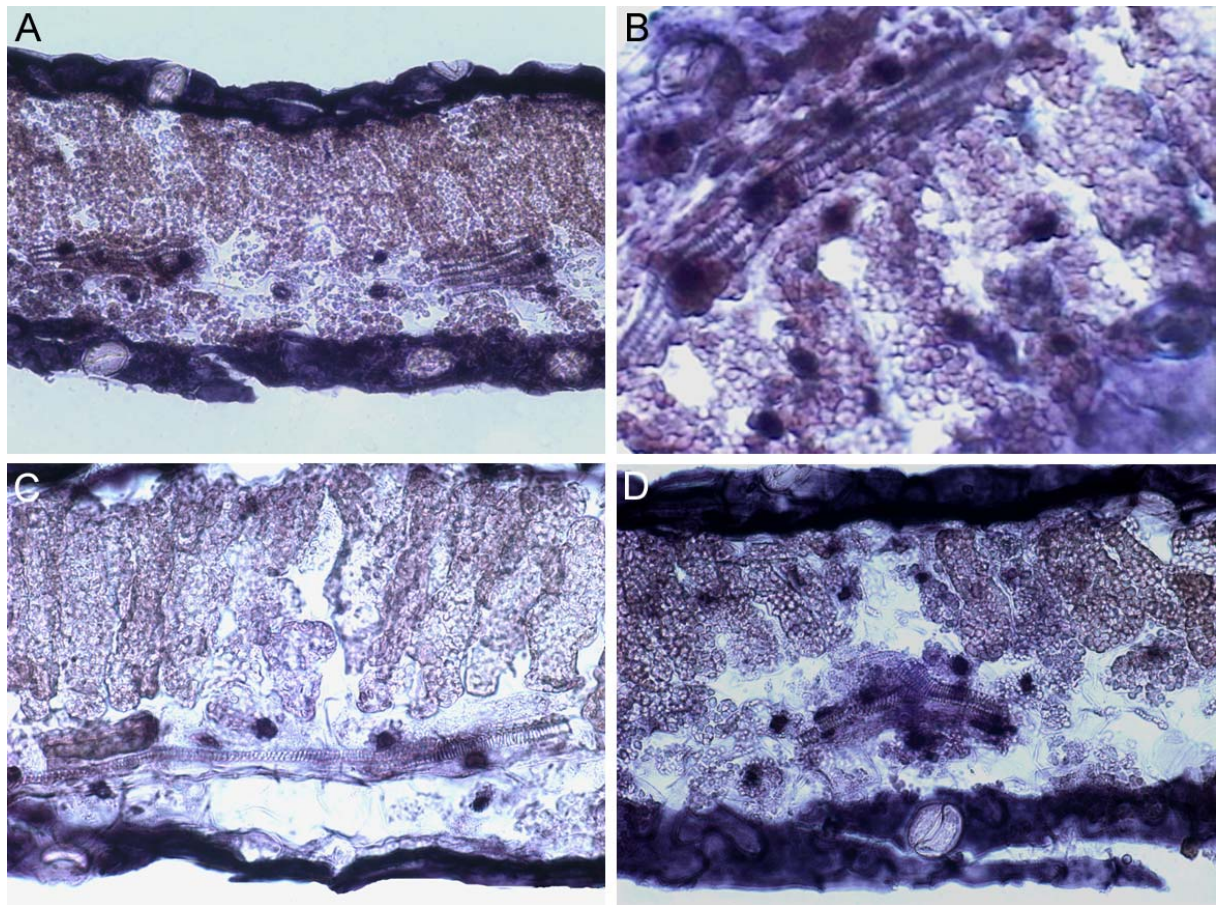


Figura 4. Localização *in situ* do ToRMV e ToYSV e dos vírus recombinantes em *Nicotiana benthamiana* aos 21 dpi. Secções obtidas de plantas de *N. benthamiana* infectadas foram hibridizadas com sondas específicas para cada vírus e observadas em microscópio ótico. **A.** Planta infectada com o ToRMV, verificando-se a presença de DNA viral apenas em células dos feixes vasculares. **B.** Planta infectada com o ToYSV, verificando-se a presença de DNA viral em células do mesófilo e dos feixes vasculares. **C.** Planta inoculada com o recombinante pToR-BRi/BLi(1.2)-(ToY-MP/NSP), verificando-se a presença de DNA viral apenas em células do feixe vascular. **D.** Planta infectada pelo recombinante pToY-BRi/BLi(1.2)-(ToR-MP/NSP), verificando-se a presença de DNA viral tanto em células dos feixes vasculares quanto em células do mesófilo.

severos em relação aos induzidos pelo ToRMV (Figura 2). Os sintomas surgiram aos 10 dpi, e foram caracterizados por mosaico e encarquilhamento foliar sem uma redução drástica no porte da planta, conforme observado nas plantas infectadas pelo ToYSV. O acúmulo de DNA do pToY-BRi/BLi(1.2)-(ToR-MP/NSP) foi analisado aos 14 e 28 dpi. De forma geral, o acúmulo de DNA do recombinante foi similar ao ToYSV tanto aos 14 quanto aos 28 dpi (Figura 3).

Hibridização *in situ* utilizando seções semifinas de folhas *N. benthamiana* infectadas pelo pToY-BRi/BLi(1.2)-(ToR-MP/NSP) demonstraram que, semelhante ao ToYSV e ao contrário do ToRMV, o recombinante foi capaz de invadir células do mesófilo (Figura 4).

Em conjunto, estes resultados indicam que as proteínas MP e NSP do ToRMV, quando introduzidos no *background* genético do ToYSV, reduzem sua adaptação ao tomateiro e a *N. benthamiana*. Esta perda de adaptação foi mais evidente em tomateiro, possivelmente devido a uma interação menos eficiente entre as proteínas MP e NSP do ToRMV e proteínas do tomateiro em relação à interação com proteínas de *N. benthamiana*. Alternativamente, é possível que em *N. benthamiana* esta perda de adaptação seja compensada pelas ação das demais proteínas codificadas pelo ToYSV.

DISCUSSÃO

Normalmente, vírus mais adaptados a seus hospedeiros induzem sintomas mais severos em relação a outros menos adaptados (Petty & Qin, 2001). Com o objetivo de identificar as regiões do genoma do ToYSV requeridas para a maior adaptação a tomateiro e *N. benthamiana* em relação ao ToRMV, foram construídos recombinantes entre os dois vírus. Estes vírus recombinantes foram avaliados quanto ao ganho ou perda de adaptação em tomateiro e *N. benthamiana*, utilizando como critérios as diferenças na severidade de sintomas (ToYSV, mais severo; ToRMV, menos severo), o acúmulo de DNA viral (ToYSV, maior; ToRMV, menor) e o tropismo de tecido (ToYSV, restrito ao floema em tomateiro, invade o mesófilo em *N. benthamiana*; ToRMV, restrito ao floema em ambos os hospedeiros). Considerando que nos begomovírus a indução de sintomas é determinada em parte pelos genes codificados a partir do DNA-B (Ingham *et al.*, 1995; Schaffer *et al.*, 1995; Unseld *et al.*, 2000b), foram construídos genomas recombinantes recíprocos trocando-se os genes *MP* e *NSP* entre os dois vírus.

O ToRMV recombinante contendo os genes *MP* e *NSP* do ToYSV induziu sintomas semelhantes aos induzidos pelo ToRMV em tomateiro (menos severos em relação ao ToYSV). A estimativa da concentração de DNA viral indicou que o recombinante atingiu

níveis semelhantes ao ToRMV, em concordância com a semelhança na severidade dos sintomas induzidos pelo ToRMV e o pelo recombinante. Quando inoculado em *N. benthamiana*, o ToRMV recombinante induziu sintomas mais severos e precoces em relação ao ToRMV selvagem, mas não tão precoces e severos que os induzidos pelo ToYSV. A estimativa da concentração viral indicou que aos 14 dpi o acúmulo de DNA foi semelhante entre o ToRMV e o recombinante. Entretanto, aos 28 dpi o acúmulo do ToRMV diminuiu drasticamente, enquanto o acúmulo do recombinante permaneceu praticamente inalterado. Este padrão de acúmulo do recombinante foi semelhante ao do ToYSV neste hospedeiro. A análise do tropismo de tecido indicou que apesar de possuir as proteínas responsáveis pelo movimento viral na planta provenientes do ToYSV, o ToRMV recombinante não foi capaz de invadir as células do mesófilo.

O ToYSV recombinante contendo os genes *MP* e *NSP* do ToRMV induziu sintomas mais atenuados e tardios em tomateiro em relação ao ToYSV, mas ainda mais severos do que os induzidos pelo ToRMV. Nestas plantas o acúmulo de DNA viral do recombinante foi bem inferior ao do ToYSV, indicando uma perda de adaptação. Da mesma forma, quando inoculado em *N. benthamiana* o recombinante induziu sintomas menos severos e mais tardios em relação ao ToYSV, porém mais severos e precoces em relação ao ToRMV. A análise da concentração viral indicou que o ToYSV recombinante atingiu concentrações semelhantes à do ToYSV. Esta similaridade no acúmulo viral entre o ToYSV selvagem e o recombinante é explicada pelo resultado da análise do tropismo de tecido, que demonstrou a capacidade do recombinante em invadir células do mesófilo, assim como o ToYSV selvagem.

Em conjunto, esses resultados indicam que a contribuição dos genes *MP* e *NSP* do ToYSV na adaptação do ToRMV é dependente do hospedeiro, pois em tomateiro não se observou um efeito positivo destes genes. É possível que os genes *MP* e *NSP* do ToYSV e do ToRMV sejam semelhantes em termos de interações com fatores da planta no tomateiro, e que a maior severidade dos sintomas induzidos pelo ToYSV seja determinada por outros genes e/ou regiões regulatórias, atuando de maneira aditiva. Essa hipótese é reforçada por outros trabalhos que demonstram que a adaptação de begomovírus ao hospedeiro é determinada de maneira cooperativa por regiões codificadoras e não codificadoras (Gillette *et al.*, 1998; Petty *et al.*, 2000). O menor acúmulo de DNA viral observado para o ToYSV recombinante em relação ao ToYSV selvagem pode ser reflexo de interações menos eficientes entre as proteínas *MP* e *NSP* heterólogas providas pelo ToRMV e as demais proteínas codificadas pelo ToYSV.

Em *N. benthamiana* os efeitos destes dois genes são mais evidentes, conferindo ao ToRMV recombinante uma melhor adaptação, refletida em sintomas mais severos e maior

acúmulo de DNA viral, porém não alterando seu tropismo de tecido. O ToYHSV recombinante induziu neste hospedeiro sintomas menos severos que o selvagem, porém acumulou níveis similares de DNA e manteve o mesmo tropismo de tecido

Como conclusão, os resultados demonstram que a adaptação ao hospedeiro é o resultado das características moleculares específicas de cada vírus, mas que o hospedeiro tem grande influência nesta característica. Hospedeiros que tenham maior capacidade de responder à infecção viral (neste caso o tomateiro) irão forçar o vírus a utilizar um número maior de estratégias para se adaptar e infectá-lo eficientemente, ao passo que em hospedeiros mais permissivos (neste caso, *N. benthamiana*) esta pressão sobre o patógeno será bem menor.

LITERATURA CITADA

- AMBROZEVICIUS, L.P.; CALEGARIO, R.F.; FONTES, E.P.B.; CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 27, p. 372-377, 2002.
- ARAGÃO, F.J.L.; BARROS, L.M.G.; BRASILEIRO, A.C.M.; RIBEIRO, S.G.; SMITH, F.D.; SANFORD, J.C.; FARIA, J.C.; RECH, E.L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 93, p. 142-150, 1996.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.D.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. (Eds.) *Current protocols in molecular biology*. New York: John Wiley and Sons. 1991.
- BELLOWS, T.S.; PERRING, T.M.; GILL, R.J.; HEADRICK, D.H. Description of a new species of *Bemisia*. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 87, p. 195-206, 1994.
- BRIDDON, R.W. Cotton leaf curl disease, a multicomponent begomovirus complex. *Molecular Plant Pathology*, v. 4, p. 427-434, 2003.
- BROWN, J.K.; COATS, S.; FROHLICH, D.R.; BEDFORD, I.D.; MARKHAM, P.G. Characterization and distribution of esterase electromorphs in the whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae). *Biochemistry and Genetics*, v. 33, p. 205-214, 1995.
- CALEGARIO, R.F.; FERREIRA, S.S.; ANDRADE, E.C.; ZERBINI, F.M. Biological and molecular properties of *Tomato yellow spot virus*, (ToYHSV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, submetido, 2006.
- COSTA, A.S. Increase in the populational density of *Bemisia tabaci*, a threat to widespread virus infection of legume crops in Brazil. pp.171 In: BIRD, J.; MARAMOROSCH, K. (Eds.) *Tropical Diseases of Legumes*. New York: Academic Press. 1975.
- FARIA, J.C.; BEZERRA, I.C.; ZERBINI, F.M.; RIBEIRO, S.G.; LIMA, M.F. Situação atual das geminiviruses no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 25, p. 125-137, 2000.
- FERNANDES, J.J.; CARVALHO, M.G.; ANDRADE, E.C.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; FONTES, E.P.B.; ZERBINI, F.M. Biological and molecular properties of *Tomato rugose*

- mosaic virus* (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Plant Pathology*, v. 55, DOI 10.1111/j.1365-3059.2006.01395.x, 2006.
- FRANÇA, F.H.; VILLAS-BOAS, G.L.; CASTELO-BRANCO, M. Ocorrência de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera:Aleyrodidae) no Distrito Federal. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v. 25, p. 369-372, 1996.
- GILLETTE, W.K.; MEADE, T.J.; JEFFREY, J.L.; PETTY, I.T. Genetic determinants of host-specificity in bipartite geminivirus DNA A components. *Virology*, v. 251, p. 361-369, 1998.
- HANLEY-BOWDOIN, L.; SETTLAGE, S.B.; OROZCO, B.M.; NAGAR, S.; ROBERTSON, D. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 18, p. 71-106, 1999.
- HOU, Y.M.; PAPLOMATAS, E.J.; GILBERTSON, R.L. Host adaptation and replication properties of two bipartite geminiviruses and their pseudorecombinants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 11, p. 208-217, 1998.
- HUSSAIN, M.; MANSOOR, S.; IRAM, S.; FATIMA, A.N.; ZAFAR, Y. The nuclear shuttle protein of Tomato leaf curl New Delhi virus is a pathogenicity determinant. *Journal of Virology*, v. 79, p. 4434-4439, 2005.
- INGHAM, D.J.; PASCAL, E.; LAZAROWITZ, S.G. Both bipartite geminivirus movement proteins define viral host range, but only BL1 determines viral pathogenicity. *Virology*, v. 207, p. 191-204, 1995.
- LEGG, J.P.; THRESH, J.M. Cassava mosaic virus disease in East Africa: A dynamic disease in a changing environment. *Virus Research*, v. 71, p. 135-149, 2000.
- 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.; MORIONES, E. A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Virology*, v. 303, p. 317-326, 2002.
- MORALES, F.J.; ANDERSON, P.K. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology*, v. 146, p. 415-441, 2001.
- MORALES, F.J.; JONES, P.G. The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. *Virus Research*, v. 100, p. 57-65, 2004.
- MORRA, M.R.; PETTY, I.T.D. Tissue specificity of geminivirus infection is genetically determined. *Plant Cell*, v. 12, p. 2259-2270, 2000.
- PADIDAM, M.; SAWYER, S.; FAUQUET, C.M. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology*, v. 265, p. 218-224, 1999.
- PASCAL, E.; GOODLOVE, P.E.; WU, L.C.; LAZAROWITZ, S.G. Transgenic tobacco plants expressing the geminivirus BL1 protein exhibit symptoms of viral disease. *Plant Cell*, v. 5, p. 795-807, 1993.
- PETTY, I.T.; CARTER, S.C.; MORRA, M.R.; JEFFREY, J.L.; OLIVEY, H.E. Bipartite geminivirus host adaptation determined cooperatively by coding and noncoding sequences of the genome. *Virology*, v. 277, p. 429-438, 2000.
- PETTY, I.T.D.; QIN, Y. Genetic analysis of bipartite geminivirus tissue tropism. *Virology*, v. 291, p. 311-323, 2001.

- PITA, J.S.; FONDONG, V.N.; SANGARE, A.; OTIM-NAPE, G.W.; OGWAL, S.; FAUQUET, C.M. Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. *Journal of General Virology*, v. 82, p. 655-665, 2001.
- POLSTON, J.E.; ANDERSON, P.K. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Disease*, v. 81, p. 1358-1369, 1997.
- RIBEIRO, S.G.; AMBROZEVICIUS, L.P.; ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; CALEGARIO, R.F.; FERNANDES, J.J.; LIMA, M.F.; MELLO, R.N.; ROCHA, H.; ZERBINI, F.M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology*, v. 148, p. 281-295, 2003.
- SANZ, A.I.; FRAILE, A.; GARCÍA-ARENAL, F.; ZHOU, X.; ROBINSON, D.J.; KHALID, S.; BUTT, T.; HARRISON, B.D. Multiple infection, recombination and genome relationships among begomovirus isolates found in cotton and other plants in Pakistan. *Journal of General Virology*, v. 81, p. 1839-1849, 2000.
- SCHAFFER, R.L.; MILLER, C.G.; PETTY, I.T.D. Virus and host-specific adaptations in the BL1 and BR1 genes of bipartite geminiviruses. *Virology*, v. 214, p. 330-338, 1995.
- SCHNIPPENKOETTER, W.H.; MARTIN, D.P.; WILLMENT, J.A.; RYBICKI, E.P. Forced recombination between distinct strains of *Maize streak virus*. *Journal of General Virology*, v. 82, p. 3081-3090, 2001.
- STANLEY, J.; BISARO, D.M.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; FAUQUET, C.M.; HARRISON, B.D.; RYBICKI, E.P.; STENGER, D.C. Family *Geminiviridae*. pp.301-326 In: FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. (Eds.) *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier Academic Press. 2005.
- UNSELD, S.; RINGEL, M.; KONRAD, A.; LAUSTER, S.; FRISCHMUTH, T. Virus-specific adaptations for the production of a pseudorecombinant virus formed by two distinct bipartite geminiviruses from Central America. *Virology*, v. 274, p. 179-188, 2000.
- VANITHARANI, R.; CHELLAPPAN, P.; PITA, J.S.; FAUQUET, C.M. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology*, v. 78, p. 9487-9498, 2004.