

FÁBIO NASCIMENTO DA SILVA

**INTERAÇÕES INTRA- E INTERMOLECULARES DOS BEGOMOVÍRUS E SEUS
EFEITOS NA ADAPTAÇÃO VIRAL E NA MAQUINARIA CELULAR DO
HOSPEDEIRO**

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
2011

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

T

S586i
2011

Silva, Fabio Nascimento da, 1979-

Interações intra-e intermoleculares dos begomovírus e seus efeitos na adaptação viral e na maquinaria celular do hospedeiro / Fabio Nascimento da Silva. – Viçosa, MG, 2011. x, 115f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Francisco Murilo Zerbini Junior.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Geminivírus. 2. Begomovírus. 3. Vírus de plantas - Evolução. 4. Tomate. 5. Ciclo celular. 6. Arabidopsis. 7. Cabbage leaf curl virus. 8. Tomate yellow spot virus. 9. Proteômica. 10. Relação hospedeiro-parasita. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 632.8

FÁBIO NASCIMENTO DA SILVA

**INTERAÇÕES INTRA- E INTERMOLECULARES DOS BEGOMOVÍRUS E SEUS
EFEITOS NA ADAPTAÇÃO VIRAL E NA MAQUINARIA CELULAR DO
HOSPEDEIRO**

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: 28 de fevereiro de 2011.

Pesq. Poliane Alfenas Zerbini

(Co-orientadora)

Prof^ª Claudine Márcia Carvalho

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros

Prof. Paulo Cavalcanti Gomes Ferreira

Prof. Francisco Murilo Zerbini Junior

(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e a minha irmã, pelo amor, apoio incondicional, incentivo, compreensão e dedicação em todos os momentos da minha vida;

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo;

Ao Prof. Franciso Murilo Zerbini, pela orientação, oportunidade, amizade e por todos os ensinamentos;

À pesquisadora Poliane Alfenas Zerbini, pela co-orientação, colaboração e amizade;

Ao meu grande amigo Pablo, pela amizade e pelo apoio;

Aos meus amigos do Laboratório de Virologia Vegetal Molecular: Ana, André, Álvaro, Amanda, Antônio, César, Danizinha, Evando, Fernanda, Jorge, Joyce, Larissa, Marcelo, Márcio, Marcos, Miguel, Renan, Riane, Roberto, Sheila, Sílvia. Em especial: Alison, Carol, Dani, Gloria, Sarah e Tathiana pela amizade, ensinamentos e constante apoio em todos os momentos;

Aos funcionários Fizinho e Joaquim do DFP pela ajuda prestada no desenvolvimento deste trabalho e pela amizade;

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente. Minha sincera gratidão.

BIOGRAFIA

FÁBIO NASCIMENTO DA SILVA, filho de Celso Matos da Silva e Ana Maria da Silva, nasceu em 8 de agosto de 1979 em Lages, Santa Catarina.

Em 1999 iniciou o curso de Agronomia na Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), vindo a graduar-se em julho de 2004.

Em fevereiro de 2005 ingressou no curso de Mestrado em Produção Vegetal da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), defendendo tese em fevereiro de 2007. Em março de 2007, iniciou o curso de Doutorado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa (UFV), na cidade de Viçosa, Minas Gerais. Em 28 de fevereiro de 2011, concluiu o doutorado com a defesa da tese.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1. A família <i>Geminiviridae</i>	6
2.2. Replicação viral	9
2.3. Movimento do vírus na planta	10
2.4. Mecanismos de geração de variabilidade genética na família <i>Geminiviridae</i>	12
2.5. Interações geminivírus-hospedeiro	16
2.6. Interferência dos begomovírus no ciclo celular.....	20
2.7. Detecção de interação entre proteínas <i>in vivo</i> via purificação por afinidade em tandem (<i>Tandem affinity purification</i> , TAP).....	23
3. LITERATURA CITADA	26
Capítulo 1. Recombination and pseudorecombination driving the evolution of <i>Tomato severe rugose virus</i> (ToSRV) and <i>Tomato rugose mosaic virus</i> (ToRMV): Two recombinant DNA-A components sharing the same DNA-B	46
Abstract.....	47
Introduction	48
Material and Methods.....	51
<i>Viral isolates and plant material</i>	51

<i>Confirmation of viral infection and formation of viable pseudorecombinants</i>	51
<i>Phylogenetic analysis</i>	51
<i>Sequence comparisons and recombination analysis</i>	52
Results	52
<i>Latent period, symptoms and infectivity of the different combinations between ToSRV and ToRMV DNA-A and DNA-B</i>	52
<i>Nucleotide and deduced amino acid sequence comparisons</i>	53
<i>Phylogenetic analysis</i>	54
<i>Recombination analysis</i>	55
Discussion.....	55
References	61
Capítulo 2. Investigating the role of APC7 and APC10, two components of the Anaphase Promoting Complex, in begomovirus replication	74
Abstract.....	75
Introduction	76
Material and methods	79
<i>Viral isolate and plant material</i>	79
<i>Viral inoculation and confirmation of viral infection</i>	79
<i>Viral DNA accumulation in infected plants</i>	80
Results	81
Discussion.....	82
Literature Cited.....	86
Capítulo 3. Estudo da interação entre a proteína de movimento (MP) do begomovírus <i>Tomato yellow spot virus</i> (ToYSV) e proteínas do hospedeiro	91
1. RESUMO	92
2. INTRODUÇÃO.....	93
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	96
3.1. Construção do vetor pNTAPi-MP	96

3.2. Expressão e purificação da proteína MP a partir de <i>Escherichia coli</i>	96
3.3. Produção de anti-soro contra a proteína MP	97
3.4. Transformação de <i>Solanum lycopersicum</i> cv. ‘Moneymaker’	97
3.5. Avaliação da infectividade de ToYSV em <i>Arabidopsis thaliana</i>	99
3.6. Transformação de <i>Arabidopsis thaliana</i>	99
3.7. Expressão transiente em folhas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	100
3.8. Extração de proteínas totais e purificação por afinidade em tandem	100
4. RESULTADOS	102
4.1. Obtenção dos vetores pNTAP-GFP e pNTAPi-MP	102
4.2. Comprovação da especificidade do anti-soro contra a MP do ToYSV	103
4.3. Transformação de <i>Solanum lycopersicum</i> cv. ‘Moneymaker’	104
4.4. O ToYSV infecta sistemicamente plantas de <i>A. thaliana</i>	105
4.5. Transformação de <i>A. thaliana</i> com os transgenes NTAPi-MP ou NTAPi-GFP	107
4.6. Expressão transiente em folhas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	107
5. DISCUSSÃO	110
6. LITERATURA CITADA	112

RESUMO

SILVA, Fábio Nascimento da, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011.
Interações intra- e intermoleculares dos begomovírus e seus efeitos na adaptação viral e na maquinaria celular do hospedeiro. Orientador: Francisco Murilo Zerbini Júnior.
Co-orientadores: Elizabeth Pacheco Batista Fontes e Poliane Alfenas Zerbini.

Os begomovírus (família *Geminiviridae*) possuem um ou dois componentes genômicos, infectam plantas dicotiledôneas e são transmitidos naturalmente pela mosca-branca *Bemisia tabaci* (Homoptera:Aleyrodidae). Os begomovírus causam doenças de grande importância econômica em diversas culturas, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, um complexo viral composto por pelo menos oito espécies, incluindo o *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), é responsável por grandes perdas na cultura do tomateiro. A sequência completa dos DNAs-B do ToSRV e ToRMV apresenta identidade de 98%, e a elevada identidade de sequência da região comum (96,2%) indica que os dois vírus podem compartilhar o mesmo DNA-B. Para o estabelecimento de uma infecção viral é necessária uma série de interações entre proteínas dos begomovírus e do hospedeiro. Neste trabalho, foram conduzidos experimentos com os objetivos de: (1) analisar a importância da recombinação e da pseudo-recombinação na geração de variabilidade e na adaptação ao hospedeiro dos begomovírus ToRMV e ToSRV; (2) analisar o envolvimento de APC7 e APC10, dois componentes do complexo promotor da anáfase, na replicação de begomovírus; (3) detectar e caracterizar proteína(s) do hospedeiro que interagem com a MP do begomovírus ToYSV. Para o primeiro objetivo, plantas de *N. benthamiana* foram inoculadas com todas as

combinações possíveis entre o DNA-A e o DNA-B do ToRMV e do ToSRV. Análises de recombinação e das sequências de nucleotídeos e aminoácidos entre ToRMV e ToSRV também foram realizadas. Os resultados indicaram que o ToRMV apresenta uma origem recombinante e pseudo-recombinante, e que o ToRMV exerce uma interferência negativa sobre o ToSRV. Para o segundo objetivo, plantas de *Arabidopsis thaliana* superexpressando APC7 ou APC10 e diferentes mutantes para APC7 foram inoculadas com o begomovírus *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) e o acúmulo de DNA viral foi estimado em plantas infectadas, aos 14 e 28 dias pós-inoculação (dpi). Os resultados indicaram que APC7 e APC10 afetam o acúmulo do CaLCuV, e que tanto a região N-terminal quanto a C-terminal de APC7 estão envolvidas neste efeito. Para o terceiro objetivo, folhas de *N. benthamiana* foram agroinfiltradas com a construção "isca" NTAPi-MP, e 48 horas após a agroinfiltração estas folhas foram coletadas para extração e purificação do heterocomplexo protéico. Entretanto, esse ensaio de expressão transiente em folhas de *N. benthamiana* não permitiu detectar interações entre a proteína MP do ToYSV e proteína(s) do hospedeiro.

ABSTRACT

SILVA, Fábio Nascimento da, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. **Intra- and intermolecular interactions of begomoviruses and their effects on viral adaptation and on the host cellular machinery.** Adviser: Francisco Murilo Zerbini Júnior. Co-advisers: Elizabeth Pacheco Batista Fontes and Poliane Alfenas-Zerbini.

Begomoviruses (family *Geminiviridae*) have one or two genomic components, infect dicotyledonous plants and are naturally transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). Begomoviruses cause diseases of major economic importance in many crops, especially in tropical and subtropical regions. In Brazil, a viral complex composed of at least eight species, including *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) and *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), is responsible for losses in tomato. The complete DNA-B sequences of ToRMV and ToSRV show an identity of 98.2% and the high identity of their common region sequences (96.2%) indicates that the two viruses may share the same DNA-B. For the successful establishment of a viral infection, several interactions are required between begomovirus and host proteins. In this work, experiments were conducted with the following objectives: (1) to analyze the importance of recombination and pseudorecombination in the generation of variability and adaptation to the host of ToRMV and ToSRV; (2) to examine the involvement of two components of the anaphase-promoting complex (APC7 and APC10) in begomovirus replication; (3) to detect and characterize host proteins which interact with the ToYSV movement protein, MP. For the first objective, *Nicotiana benthamiana* plants were inoculated with all possible combinations of ToRMV and ToSRV DNA-A and DNA-B. Additionally, recombination and

nucleotide/amino acid sequence comparisons between ToRMV and ToSRV were performed. The results indicate that ToRMV has both a recombinant and pseudorecombinant origin, and that ToRMV exerts a negative interference over ToSRV. For the second objective, *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing APC7, APC10 and different APC7 mutants were inoculated with *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV), and viral DNA accumulation was estimated in plants at 14 and 28 days post-inoculation (dpi). The results indicate that APC7 and APC10 negatively affect CaLCuV DNA accumulation, and that both the N-terminal and C-terminal portions of the APC7 protein are involved in this effect. For the third objective, leaves of *N. benthamiana* were agroinfiltrated with the "bait" construct NTAPi-MP, and 48 hours after agroinfiltration the leaves were collected for extraction and purification of protein heterocomplexes. However, this transient expression assay in leaves of *N. benthamiana* failed to detect interactions between ToYSV MP and host proteins.

INTRODUÇÃO

A família *Geminiviridae* engloba vírus com genoma composto por uma ou duas fitas simples de DNA circular, encapsidados 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 um ou dois componentes genômicos, infectam plantas dicotiledôneas e são transmitidos naturalmente pela mosca-branca *Bemisia tabaci* (Homoptera:Aleyrodidae). Os begomovírus do "Velho Mundo" (Europa, Ásia e África) apresentam um ou dois componentes genômicos e frequentemente estão associados a DNAs satélites (Mansoor *et al.*, 2003). Por outro lado, begomovírus encontrados no "Novo Mundo" apresentam dois componentes genômicos (denominados DNA-A e DNA-B), e até recentemente acreditava-se que não estavam associados a DNAs satélites. Entretanto, dois trabalhos recentes relataram a associação entre begomovírus e alfassatélites no Brasil e na Venezuela (Paprotka *et al.*, 2010; Romay *et al.*, 2010).

Os begomovírus possuem grande importância econômica, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, sendo uma das maiores ameaças à agricultura nestas regiões (Morales & Anderson, 2001; Monci *et al.*, 2002; Briddon, 2003; Were *et al.*, 2004). No Brasil, a incidência e os danos causados por *B. tabaci* aumentaram exponencialmente 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, no México e em países da América Central e do Caribe 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 país (Lourenção & Nagai, 1994). A partir de então, sintomas típicos de infecção por begomovírus em tomateiros foram relatados no Distrito Federal (Ribeiro *et al.*, 1994), Triângulo Mineiro (Rezende *et al.*, 1996; Zerbini, 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 estirpes ou espécies mais adaptadas ao novo hospedeiro (Hou & Gilbertson, 1996; Pita *et al.*, 2001; Chakraborty *et al.*, 2008).

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) (Ribeiro *et al.*, 2007) e *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) (Calegario *et al.*, 2007), todas presentes no estado de Minas Gerais. Levantamentos realizados nos últimos cinco anos (Castillo-Urquiza *et al.*, 2007; Cotrim *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2008) indicam que determinadas espécies tornaram-se prevalentes em diferentes regiões do país. Por outro lado, Castillo-Urquiza *et al.* (2008) relataram seis novas espécies em tomateiros e em plantas daninhas, indicando que novas espécies continuam emergindo e reforçando a hipótese de que plantas silvestres ou daninhas são reservatórios naturais da diversidade genética de begomovírus no Brasil.

O surgimento de novas espécies está relacionado com eventos de mutação, recombinação e pseudo-recombinação. Infecções por mais de um begomovírus são comuns no campo, favorecendo a recombinação e a pseudo-recombinação (Padidam *et al.*, 1999; Pita *et al.*, 2001; Galvão *et al.*, 2003; Bull *et al.*, 2007; Chakraborty *et al.*, 2008; Davino *et al.*, 2009; Patil & Fauquet, 2009). Um recombinante entre o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) e o *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) apresentou uma maior gama de hospedeiros quando comparado aos parentais e tornou-se prevalente na Espanha (Monci *et al.*, 2002). Em Uganda, um recombinante entre *African cassava mosaic virus* (ACMV) e *East African cassava mosaic virus* (EACMV) apresentou maior agressividade e virulência quando comparado aos parentais. Este recombinante foi responsável por uma severa epidemia na cultura da mandioca nesta região ao longo da década de 1990 (Harrison *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1997).

No Brasil, o ToRMV e o *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) são frequentemente encontrados no campo infectando plantações de tomate. A sequência completa dos DNAs-B do ToSRV e ToRMV apresenta identidade de 98%, e a elevada identidade de sequência da região comum (97,5%) indica que os dois vírus podem compartilhar o mesmo DNA-B (Silva *et al.*, 2010). Ribeiro *et al.* (2007) sugerem que um evento de recombinação recente entre ToSRV e ToCMoV gerou o ToRMV, o qual teria capturado o DNA-B do ToSRV. Dessa forma, a origem do ToRMV envolveria tanto a recombinação quanto a pseudorecombinação.

Além do ToRMV e do ToSRV, um outro begomovírus descrito em tomateiros em Minas Gerais e que possui propriedades biológicas e moleculares interessantes é o ToYSV. 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) (Fernandes *et al.*, 1998; Jovel *et al.*, 2004; Andrade *et al.*, 2006). 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%. Essas observações sugerem que o ToYSV pode ser originalmente um vírus que infectava *Sida*, transferido para o tomateiro pelo inseto vetor. Além do seu papel direto no movimento viral, as proteínas MP e NSP estão envolvidas na adaptação de begomovírus ao hospedeiro e na indução de sintomas (Petty *et al.*, 1995; Schaffer *et al.*, 1995; Petty *et al.*, 2000). O ToYSV causa sintomas severos em tomateiro e em hospedeiros experimentais, como *Nicotiana benthamiana* e *Nicotiana glutinosa* (Ambrozevicius *et al.*, 2002; Andrade *et al.*, 2006). A severidade de sintomas pode estar associada, ao menos parcialmente, com o tropismo de tecido deste vírus, uma vez que em *N. benthamiana* o ToYSV é capaz de infectar, além do floema, as células do mesofilo (Alves-Junior *et al.*, 2009).

Assim como outros processos do ciclo de infecção viral, a replicação dos begomovírus é dependente de fatores do hospedeiro. Conforme revisado por Gutierrez *et al.* (2004), a proteína PCNA, envolvida na replicação de DNA, tem sua expressão aumentada em células expressando a proteína Rep do *Tomato golden mosaic virus* (TGMV). Este efeito pode ser devido à interferência no controle da transição da fase G1 para S do ciclo celular, pois a proteína Rep interage com a proteína retinoblastoma, a qual controla a transição da fase G1 para a fase S (Kong *et al.*, 2000). Além disso, fatores envolvidos na regulação do ciclo celular e replicação de DNA em *A. thaliana*, como por exemplo as cinases GRIK1 e GRIK2, a ciclina CYCD3;1, e os fatores transcricionais E2FB e E2FD/DEL2 (Shen *et al.*, 2009; Sozzani *et al.*, 2010) são diferencialmente expressos durante a infecção por begomovírus (Ascencio-Ibanez *et al.*, 2008).

A participação do complexo promotor da anáfase ("anaphase promoting complex", APC) na ubiquitinação para posterior degradação de proteínas regulatórias do ciclo celular (Eloy *et al.*, 2006; Fulop *et al.*, 2005) sugere um possível papel deste complexo na infecção por begomovírus. Estudos investigando o efeito deste complexo sobre a infecção por begomovírus são necessários e podem fornecer informações para a obtenção de plantas resistentes, e também reforçar a interação begomovírus/hospedeiro como uma ferramenta no estudo de processos celulares básicos como o ciclo celular.

Para o estabelecimento da infecção sistêmica é necessária também a interação entre fatores virais e do hospedeiro que possibilite os movimentos célula-a-célula e à longa distância (Sanderfoot & Lazarowitz, 1996). A proteína de movimento (MP) é essencial para o movimento célula-a-célula dos begomovírus com genoma bissegmentado (Noueiry *et al.*, 1994; revisado por Rojas *et al.*, 2005). No entanto, poucos trabalhos demonstraram interação direta desta proteína com fatores do hospedeiro (Krenz *et al.*, 2010; Lewis & Lazarowitz, 2010). A identificação e o estudo de proteínas da planta que interagem direta ou indiretamente com a MP contribuirão para o melhor entendimento do processo de infecção viral e da interação begomovírus-hospedeiro.

Este trabalho teve como objetivos: (i) analisar a importância da recombinação e da pseudo-recombinação na geração de variabilidade e na adaptação ao hospedeiro dos begomovírus ToRMV e ToSRV; (ii) analisar o envolvimento de APC7 e APC10, dois componentes do complexo APC, na replicação de begomovírus; (iii); detectar e caracterizar proteína(s) do hospedeiro que interagem com a MP de begomovírus.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A família *Geminiviridae*

A família *Geminiviridae* é composta de vírus que infectam plantas caracterizados 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*, *Topocuvirus* e *Begomovirus*, que diferem entre si pelo número de componentes do genoma (um ou dois), tipo de inseto vetor (cigarrinha ou mosca-branca), gama de hospedeiros (monocotiledôneas ou dicotiledôneas) e relacionamento filogenético (Stanley *et al.*, 2005). O gênero *Mastrevirus* engloba os geminivírus que apresentam apenas um componente genômico e são transmitidos por diversas espécies de cigarrinhas (Homoptera:Cicadellidae) a plantas monocotiledôneas. A espécie tipo é o *Maize streak virus* (MSV). O gênero *Curtovirus* inclui geminivírus com um componente genômico transmitidos por diferentes espécies de cigarrinhas (Homoptera:Cicadellidae) a plantas dicotiledôneas. O *Beet severe curly top virus* (BSCTV) é a espécie-tipo e a mais importante economicamente. O gênero *Topocuvirus* possui apenas uma espécie, denominada *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV), com um componente genômico e transmitido pela cigarrinha *Micrutalis malleifera* (Homoptera:Auchenorrhyncha) a espécies dicotiledôneas. O gênero *Begomovirus* possui espécies que apresentam um ou dois componentes genômicos transmitidas pelos diferentes biótipos de *Bemisia tabaci* a plantas dicotiledôneas (Stanley *et al.*, 2005). Esse gênero apresenta o maior número de espécies da família *Geminiviridae*. Entre os begomovírus de maior importância econômica pode-se citar o *Bean golden mosaic virus* (BGMV), o *African cassava mosaic virus* (ACMV) e o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Pita *et al.*, 2001;

Monci *et al.*, 2002; Potter *et al.*, 2003). Atualmente, mais de 180 espécies de begomovírus já foram descritas, incluindo mais de 60 espécies que podem infectar o tomateiro (Fauquet *et al.*, 2008).

Os begomovírus, em sua maioria, possuem genoma dividido em dois componentes denominados DNA-A e DNA-B, ambos com aproximadamente 2.600 nucleotídeos. No DNA-A encontram-se os genes codificadores das proteínas responsáveis pela replicação viral e encapsidação. O DNA-B possui genes codificadores das proteínas de movimento célula-a-célula e a longa distância do vírus na planta (revisado por Rojas *et al.*, 2005). Ambos os componentes são necessários para a infecção sistêmica de plantas, e com exceção da região intergênica de aproximadamente 200 nucleotídeos, denominada região comum (RC), os dois componentes não apresentam identidade em suas sequências de nucleotídeos. A RC contém a origem de replicação (*ori*) dos begomovírus, que inclui diversos elementos de sequência altamente conservados entre as diferentes espécies do gênero e que são reconhecidos pela proteína Rep (Arguello-Astorga *et al.*, 1994a; Fontes *et al.*, 1994). A partir da região comum divergem os genes virais no sentido viral e complementar (Stanley, 1983). Desta forma, a transcrição é bidirecional em cada componente, com um gene sendo transcrito no sentido viral e três ou quatro no sentido complementar para o DNA-A, ao passo que no DNA-B um gene é transcrito no sentido viral e outro no sentido complementar (Figura 1).

As espécies do gênero *Begomovirus* têm o potencial de codificar quatro ou cinco proteínas no DNA-A: uma proteína associada à replicação (REP, "replication-associated protein", anteriormente denominada AC1 ou AL1), com propriedades de ligação a ácidos nucleicos, endonuclease, ATPase e iniciadora do mecanismo de replicação por círculo rolante; uma proteína transativadora (TrAP, "trans-activating protein", anteriormente denominada AC2 ou AL2) um fator transcricional que funciona *in trans* para ativar a transcrição dos genes CP e NSP e que também atua como supressora de silenciamento (Voinnet *et al.*, 1999); a proteína REN ("replication-enhancer protein", anteriormente denominada AC3 ou AL3), fator acessório (não essencial) 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. Alguns begomovírus codificam a proteína AC4, que também está envolvida na supressão de silenciamento gênico (Vanitharani *et al.*, 2004). O DNA-B codifica as proteínas MP ("movement protein", anteriormente BC1 ou BL1), envolvida no

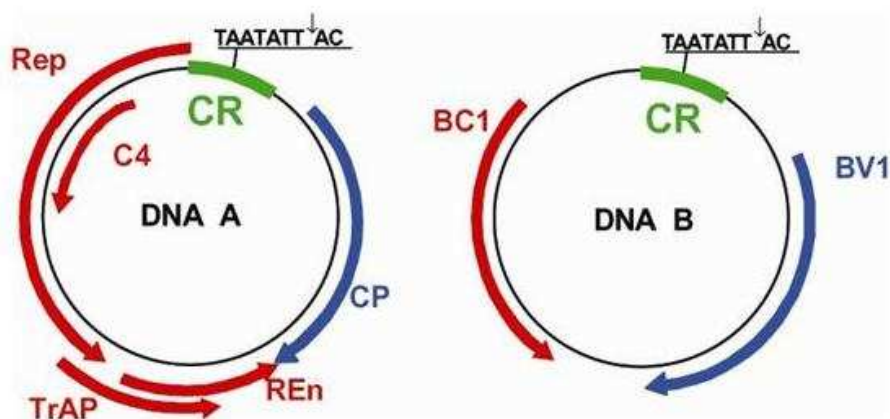


Figura 1. Representação esquemática do genoma do *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV), espécie-tipo do gênero *Begomovirus*. Os círculos representam o genoma viral, com dois componentes (DNA-A e DNA-B) de aproximadamente 2.600 nucleotídeos cada. Uma sequência de aproximadamente 200 nucleotídeos denominada região comum (CR) contém a origem de replicação viral, com uma estrutura em forma de grampo característica contendo a sequência invariável de nove nucleotídeos (TAATATT↓AC), conservada em todos os membros da família *Geminiviridae*. A seta (↓) indica o sítio de início da replicação do DNA viral por círculo rolante. As setas azuis e vermelhas indicam os genes virais e a direção em que ocorre a transcrição (viral e complementar, respectivamente). Reproduzido de Gutierrez *et al.* (2004).

movimento célula-a-célula do vírus por meio do aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas, e a proteína NSP ("nuclear shuttle protein", anteriormente denominada BV1 ou BR1), responsável pelo transporte do DNA através do envelope nuclear (revisado por Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999).

Até 1990 apenas begomovírus com genoma bissegmentado haviam sido descritos, porém, com a caracterização do *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), foi demonstrada a ocorrência de begomovírus com apenas um componente (Kheyr-Pour *et al.*, 1991; Navot *et al.*, 1991). Desde então cerca de 130 espécies de begomovírus monossegmentados foram descritas, todas ocorrendo no Velho Mundo (Briddon *et al.*, 2010). A grande maioria dos begomovírus monossegmentados encontram-se associados a um tipo de DNA satélite denominado betassatélite (Briddon *et al.*, 2008). Os betassatélites necessitam do vírus auxiliar para replicação, movimento e encapsidação, e não apresentam identidade de sequência com o vírus auxiliar (Briddon & Stanley, 2006). Outra classe de DNAs satélites associados a

begomovírus são os alfassatélites (anteriormente denominados "satélites tipo DNA-1"), os quais também não apresentam identidade de sequência com o vírus auxiliar e necessitam do vírus auxiliar para o movimento e transmissão, porém replicam-se autonomamente (Idris *et al.*, 2005). Os alfassatélites podem estar associados a begomovírus mono- ou bissegmentados no Novo e no Velho Mundo (Idris *et al.*, 2005; Paprotka *et al.*, 2010; Romay *et al.*, 2010).

2.2. Replicação viral

No processo de infecção dos geminivírus, incluindo-se os begomovírus, as partículas virais são inoculadas na planta por meio do inseto vetor, e o genoma viral (ssDNA) se desassocia provavelmente de forma espontânea do capsídeo (Lazarowitz, 1992; Palmer & Rybicki, 1998). Em seguida, o DNA viral é transportado para o núcleo da célula hospedeira, onde o ssDNA é convertido em um intermediário de fita dupla (dsDNA), designado forma replicativa, ou RF. A maneira como esta conversão ocorre não é conhecida, no entanto, evidências indiretas, como a necessidade de desestabilização local do dsDNA para iniciação da replicação por círculo rolante em procariontes por "strand-nicking enzymes", indicam que é realizada por fatores do hospedeiro (Stenger *et al.*, 1991). A RF serve como molde para síntese de novos ssDNA e para os mRNAs virais. O genoma viral é replicado por meio do mecanismo de círculo rolante, semelhante ao utilizado pelos bacteriófagos ϕ X174 e M13, utilizando a RF como molde (Stanley, 1995).

A origem de replicação está localizada na região intergênica, comum entre os dois componentes genômicos dos begomovírus bissegmentados. Nesta região está localizada uma sequência repetida e invertida composta predominantemente por guanina e citosina, que forma uma estrutura conservada ("structurally-conserved element", SCE) em forma de grampo, com uma alça contendo a sequência conservada 5'-TAATATTAC-3', encontrada em todos os geminivírus (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). É neste nonanucleotídeo que ocorre a clivagem (TAATATT↓AC) que inicia o processo de replicação por círculo rolante, realizada pela proteína REP, que funciona como uma endonuclease sítio-específica com requerimento de estrutura e de sequência (Laufs *et al.*, 1995; Orozco & Hanley-Bowdoin, 1998). Na região comum encontram-se também sequências específicas para a ligação da proteína REP (Fontes *et al.*, 1992; Fontes *et al.*, 1994) e regiões promotoras da RNA polimerase II, responsável pela síntese dos RNAs mensageiros virais.

O sítio de ligação de alta afinidade de REP ao DNA viral está localizado entre a caixa TATA do gene Rep e a SCE (Orozco & Hanley-Bowdoin, 1998), sendo constituído por duas

sequências em repetição direta e pelo menos uma repetição invertida denominadas 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). A proteína REP apresenta três motivos conservados em sua região N-terminal (I, II e III) que são essenciais para ligação e clivagem do DNA (Orozco & Hanley-Bowdoin, 1998). Recentemente foi descrito um quarto motivo, denominado GRS ("geminivirus Rep sequence"), o qual também se encontra na região N-terminal e é amplamente conservado na família *Geminiviridae* (Nash *et al.*, 2010). Mutantes no motivo GRS são capazes de se ligar a DNA de fita simples e de fita dupla, mas perdem a capacidade de clivar DNA de fita simples (Nash *et al.*, 2010).

O reconhecimento pela proteína REP é considerado vírus-específico (Arguello-Astorga *et al.*, 1994a; Harrison & Robinson, 1999; Ramos *et al.*, 2003), de modo que REP só inicia a replicação de DNAs cognatos. Entretanto, durante infecções mistas, eventualmente a proteína REP codificada por um vírus pode replicar o DNA-B de outro vírus, um fenômeno conhecido como pseudo-recombinação. A princípio, a pseudo-recombinação deveria ocorrer apenas entre vírus com iterons idênticos. Entretanto, diversas exceções a essa regra já foram relatadas (item 2.4).

2.3. Movimento do vírus na planta

Após a replicação viral na primeira célula infectada, é necessário que o vírus mova para outras células e se espalhe por toda planta para o estabelecimento de uma infecção sistêmica. 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 via floema para toda a planta hospedeira.

Para efetivar o movimento célula-a-célula os begomovírus codificam uma proteína não estrutural denominada MP. Essa proteína associa-se à membrana celular e altera o limite de exclusão dos plasmodesmas, possibilitando 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 pela proteína NSP (Palmer & Rybicki, 1998). Estas duas proteínas de movimento, atuando de maneira cooperativa (Sanderfoot & Lazarowitz, 1995), permitem ao vírus atingir o sistema vascular.

Os modelos propostos para o movimento célula-a-célula dos begomovírus bissegmentados enfatizam a interação física entre as proteínas MP e NSP (Rojas *et al.*, 2005). Foi demonstrado que NSP é re-localizada por MP do núcleo para a periferia em protoplastos de *Nicotiana tabacum* (Sanderfoot & Lazarowitz, 1995). A interação física direta entre as proteínas NSP e MP do TGMV foi demonstrada utilizando-se o sistema duplo-híbrido de levedura (Mariano *et al.*, 2004). Dois modelos foram propostos para o transporte intracelular de begomovírus (Levy & Tzfira, 2010). No primeiro modelo, denominado "couple-skating" (Kleinow *et al.*, 2008), NSP transporta o ssDNA ou dsDNA do núcleo para a periferia da célula. O complexo NSP-DNA presente no citoplasma terá seu movimento célula-a-célula mediado por MP (Sanderfoot & Lazarowitz, 1995; Frischmuth *et al.*, 2007; Kleinow *et al.*, 2008). No segundo modelo, denominado "relay-race", NSP transfere o dsDNA do núcleo para o citoplasma. No citoplasma, o dsDNA se associa a MP e se movimenta célula-a-célula através dos plasmodesmas (Noueiry *et al.*, 1994; Rojas *et al.*, 1998).

Mastrevírus e curtovírus são geralmente restritos aos tecidos vasculares, 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. Recentemente, foi demonstrado que a proteína C4 do BSCTV liga-se de maneira não específica a ssDNA e a dsDNA e, quando expressa em plantas infectadas por um BSCTV mutado para C4, facilita *in trans* o movimento sistêmico. Isto sugere o envolvimento desta proteína no movimento sistêmico deste vírus (Teng *et al.*, 2010). Nos begomovírus bissegmentados, tanto MP quanto NSP reconhecem o DNA viral de maneira específica em relação à forma e comprimento (Rojas *et al.*, 1998), o que a princípio eliminaria a necessidade da proteína capsidial para o movimento a longa distância. De fato, a proteína capsidial é dispensável para o estabelecimento de infecção sistêmica para a maioria dos begomovírus bissegmentados já estudados (Rojas *et al.*, 2005). Raras exceções, como o ToCMoV, são capazes de infectar alguns hospedeiros mesmo na ausência do DNA-B cognato (Galvão *et al.*, 2003). O mutante para o gene CP deste vírus não foi capaz de infectar sistemicamente *N. benthamiana* e *Chenopodium quinoa*, sugerindo que, na ausência das proteínas codificadas pelo DNA-B, a CP atua como uma proteína de movimento a longa distância (Fontenelle *et al.*, 2007).

2.4. Mecanismos de geração de variabilidade genética na família *Geminiviridae*

Na região comum dos dois componentes genômicos dos begomovírus bissegmentados encontram-se sequências específicas para a ligação da proteína REP (Fontes *et al.*, 1992; Fontes *et al.*, 1994), incluindo sítios de ligação de alta afinidade denominados iterons. A presença dos iterons mantém a integridade do genoma dividido em dois componentes, assegurando que a replicação dos dois componentes seja realizada pela proteína REP codificada pelo DNA-A (Fontes *et al.*, 1994). Apesar da existência desse mecanismo de manutenção da integridade do genoma bissegmentado, a troca de componentes entre diferentes estirpes ou mesmo espécies pode ocorrer. Esta troca de componentes é conhecida como pseudo-recombinação (Rojas *et al.*, 2005). A pseudo-recombinação ocorrerá durante infecções mistas envolvendo dois ou três vírus distintos (ou duas ou mais estirpes distintas do mesmo vírus). A ocorrência de infecções mistas é comum em condições naturais, uma vez que todos os begomovírus são transmitidos pelo mesmo vetor e muitos possuem hospedeiros comuns (Seal *et al.*, 2006).

Pita *et al.* (2001) demonstraram a formação de pseudo-recombinante viável entre *East African cassava mosaic virus* (EACMV-UG2) e EACMV-UG3, e também que o pseudo-recombinante formado entre o DNA-A do EACMV-UG2 e o DNA-B do EACMV-UG3 era o begomovírus predominante em plantios de mandioca em Uganda no início da década de 2000. Eventos de pseudo-recombinação envolvendo *African cassava mosaic virus* (ACMV), *Bean golden mosaic virus* (BGMV), *Squash leaf curl virus* (SqLCV), *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) e *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) já foram demonstrados experimentalmente (Stanley *et al.*, 1985; Lazarowitz, 1991; von Arnim & Stanley, 1992; Faria *et al.*, 1994; Andrade *et al.*, 2006).

Hou & Gilbertson (1996) demonstraram que em *N. benthamiana* um pseudo-recombinante formado entre o DNA-B do *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV) e o DNA-A do *Tomato mottle virus* (ToMoV) induzia sintomas mais atenuados quando comparado aos vírus parentais, e apresentava um menor acúmulo do DNA-B. Após cinco passagens consecutivas por inoculação via extrato vegetal tamponado, detectou-se um evento de recombinação intermolecular, com a transferência da região comum do DNA-A do ToMoV para o DNA-B do BDMV. O vírus resultante induzia sintomas comparáveis aos parentais e reestabeleceu o acúmulo do DNA-B a um nível normal (Hou & Gilbertson, 1996).

Chakraborty *et al.* (2008) demonstraram a ocorrência de um pseudo-recombinante entre duas espécies distintas de begomovírus, o *Tomato leaf curl New Delhi virus*

(ToLCNDV) e o *Tomato leaf curl Gujarat virus* (ToLCGV). O pseudo-recombinante formado pelo DNA-A do ToLCNDV e DNA-B do ToLCGV apresentava maior agressividade em relação aos vírus parentais, ao contrário do que normalmente é observado. Curiosamente o pseudo-recombinante recíproco não foi viável.

A replicação dos begomovírus inicia-se com a ligação da proteína REP a sequências específicas denominadas iterons (Gutierrez, 1999). Os iterons, geralmente, diferem em suas sequências de nucleotídeos entre diferentes espécies de begomovírus, e são os elementos mais importantes (mas não os únicos) na especificidade da replicação destes vírus (Arguello-Astorga *et al.*, 1994b; Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). A princípio, a formação de pseudo-recombinantes entre begomovírus distintos exige alta identidade de sequência na região comum (RC) dos dois componentes heterólogos (Lazarowitz *et al.*, 1992). A baixa compatibilidade entre componentes heterólogos pode refletir na ineficiência da replicação do DNA-B, resultando na alteração dos sintomas comparados àqueles induzidos pela combinação dos componentes cognatos (Hou & Gilbertson, 1996). De acordo com essa hipótese, quanto maior a divergência na RC entre o DNA-A e o DNA-B mais difícil é a formação de um pseudo-recombinante viável (Gilbertson *et al.*, 1993). De fato, na maioria dos casos, o sucesso na formação de um pseudo-recombinante corresponde a alta similaridade dos sítios de ligação da proteína REP (iterons). No entanto, já foi observada a formação de pseudo-recombinantes viáveis entre begomovírus que apresentavam divergência considerável na sequência dos iterons (Frischmuth *et al.*, 1997; Garrido-Ramirez *et al.*, 2000; Andrade *et al.*, 2006).

A proteína REP dos begomovírus apresenta determinantes de especificidade, denominados "specificity determinants" (SPDs), que conferem especificidade no reconhecimento dos iterons e na replicação de DNAs cognatos (Ramos *et al.*, 2003). A deleção ou mutação do domínio relacionado aos iterons ("iteron-related domain", IRD), um determinante de especificidade localizado adjacente ao motivo I (um dos três motivos conservados localizados na região N-terminal da REP), elimina a capacidade da REP de ligação sequência-específica ao DNA (Orozco *et al.*, 1997; Orozco & Hanley-Bowdoin, 1998). A divergência na sequência do IRD observada entre diferentes begomovírus está relacionada ao reconhecimento de diferentes iterons. Begomovírus com sequências de iterons iguais normalmente codificam proteínas REP com IRDs iguais (Arguello-Astorga & Ruiz-Medrano, 2001). Além do IRD, uma segunda região importante para a especificidade do reconhecimento da origem de replicação pela proteína REP dos begomovírus foi recentemente identificada adjacente ao motivo II, associada ao reconhecimento de iterons específicos

(Londono *et al.*, 2010). Assim, a viabilidade de um pseudo-recombinante é função não apenas da sequência dos iterons, mas também das sequências dos SPDs da proteína REP. Alguns autores sugerem que a presença de determinados aminoácidos nos SPDs pode conferir maior flexibilidade a REP, permitindo o reconhecimento de iterons com sequências distintas (Andrade *et al.*, 2006).

Ramos *et al.* (2003) demonstraram que ToMoV e *Tomato mottle Taino virus* (ToMoTV) não formam pseudo-recombinantes viáveis. Estes dois vírus são filogeneticamente relacionados e apresentam alta identidade na sequência de aminoácidos da REP (87%). No entanto, apresentam iterons distintos, e provavelmente isto foi o fator limitante na formação dos pseudo-recombinantes viáveis. Outra observação interessante foi a de que o ToMoTV é capaz de formar pseudorecombinante viável com o *Potato yellow mosaic virus* (PYMV). Neste caso, os dois vírus são mais distantes e apresentam uma menor identidade na sequência de aminoácidos da REP (78,7%), porém, a sequência dos iterons é a mesma. Apesar da alta identidade na sequência de aminoácidos da REP entre ToMoV e ToMoTV, estes vírus apresentam divergência nos SPDs. ToMoTV e PYMV, os quais apresentam uma menor identidade na sequência de aminoácidos da REP, apresentam os SPDs idênticos (Ramos *et al.*, 2003). Estes resultados confirmam a hipótese de que, mais do que o relacionamento filogenético, os principais determinantes na formação de pseudo-recombinantes viáveis são as sequências dos iterons e dos SPDs.

Outro componente importante na geração de variabilidade nos begomovírus é a recombinação. A recombinação entre begomovírus foi inicialmente relatada para o EACMV-UG (Zhou *et al.*, 1997), e atualmente é consenso que os begomovírus (assim como os demais geminivírus) apresentam altas taxas de recombinação (van der Walt *et al.*, 2009). A recombinação homóloga ocorre entre sequências relacionadas entre o doador e o receptor, enquanto a recombinação heteróloga envolve a troca de regiões com sequências distintas (Lai, 1992; Nagy & Simon, 1997). Mudanças genéticas através de recombinação propiciam ao vírus uma rápida evolução, podendo promover mudanças na virulência e na gama de hospedeiros (Garcia-Arenal *et al.*, 2001). Diversos estudos relacionados à análise de recombinação entre begomovírus já foram realizados, envolvendo os vírus TYLCV, TYLCSV, ACMV, EACMV, ICMV e SLCMV (Garcia-Andres *et al.*, 2007; Varsani *et al.*, 2008; Davino *et al.*, 2009; Patil & Fauquet, 2009; van der Walt *et al.*, 2009). Estes estudos demonstraram a importância dos eventos de recombinação na evolução destes patógenos e na geração de novos vírus mais virulentos e melhor adaptados (van der Walt *et al.*, 2009).

A distribuição dos sítios preferenciais de recombinação ("hot spots") não é aleatória ao longo do genoma viral. Para os mastrevírus, os sítios de recombinação encontram-se próximos à origem de replicação, na região intergênica menor e na porção 3' do gene que codifica a proteína capsidial (Varsani *et al.*, 2008; van der Walt *et al.*, 2009). No begomovírus monossegmentado TYLCV, todos os recombinantes detectados no trabalho de Garcia-Andres *et al.* (2007) apresentavam um dos sítios de recombinação na região intergênica maior, no interior da estrutura conservada em forma de grampo. Para os begomovírus bissegmentados, os "hot spots" incluem a RC, a região 5' do gene CP e a região 3' do gene Rep (Lefeuvre *et al.*, 2007a; Lefeuvre *et al.*, 2007b).

Além de eventos de recombinação e pseudo-recombinação, recentemente tem sido demonstrado que vírus de ssDNA que infectam plantas (incluindo os begomovírus) apresentam elevadas taxas de substituição de nucleotídeos (Duffy *et al.*, 2008; Duffy & Holmes, 2009), comparáveis às de vírus de ssDNA que infectam mamíferos e de vírus de RNA que infectam plantas. Essas observações sugerem que, além da frequente recombinação e da pseudo-recombinação, a elevada taxa de substituição de nucleotídeos pode ser um fator importante na emergência de novos begomovírus (Duffy *et al.*, 2008).

No Brasil, um centro de diversidade de begomovírus, já foram relatados eventos de recombinação e pseudo-recombinação envolvendo esses vírus (Galvão *et al.*, 2003; Andrade *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007). A origem recombinante do isolado MG-Bt1 do *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) foi demonstrada por Galvão *et al.* (2003). A ORF que codifica a proteína REP do isolado MG-Bt1 foi doada pelo isolado ToCMoV- [BA-Se1], e o restante do genoma foi doado pelo *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV). Apesar da alta identidade de sequência do ToCMoV-[MG-Bt1] com os seus parentais, este apresenta propriedades biológicas distintas: o DNA-A do ToCMoV-[MG-Bt1] pode infectar sistemicamente plantas de *Nicotiana benthamiana* na ausência do DNA-B cognato (Galvão *et al.*, 2003).

O pseudo-recombinante entre o DNA-A do ToYSV e o DNA-B do *Tomato crinkle leaf yellow virus* (ToCrLYV) induziu sintomas severos em *N. benthamiana*, o que foi atribuído, pelo menos em parte, ao fato de que a sequência de ligação a REP é idêntica entre os dois componentes virais (Andrade *et al.*, 2006). Outro pseudo-recombinante viável relatado por Andrade *et al.* (2006) foi formado pelo DNA-A do TGMV e o DNA-B do ToYSV. Neste caso, a sequência dos iterons é diferente entre os dois componentes. Com base na presença de aminoácidos distintos na IRD da proteína REP dos dois vírus, os autores sugerem que a

proteína REP do TGMV pode ser mais flexível no reconhecimento de DNAs comparada a REP do ToYSV. Essa hipótese é reforçada pelo fato de que o pseudo-recombinante recíproco não foi viável.

Ribeiro *et al.* (2007) caracterizaram biológica e molecularmente o ToCMoV-[BA-Se1] e verificaram uma série de eventos de recombinação envolvendo begomovírus do Brasil, com destaque para os vírus ToCMoV, ToSRV e o ToRMV. Os autores sugerem que um evento de recombinação entre ToCMoV e ToSRV originou o ToRMV.

2.5. Interações geminivírus-hospedeiro

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

Resultados obtidos por diferentes grupos de pesquisadores demonstram a multiplicidade de interações entre os begomovírus e seus hospedeiros. Essas interações incluem modificações na estrutura e função de plasmodesmas (Noueiry *et al.*, 1994; Gilbertson *et al.*, 2003), respostas a diferentes mecanismos de defesa da planta (Kjemtrup *et al.*, 1998; Vanitharani *et al.*, 2004; Trinks *et al.*, 2005), interação com proteínas envolvidas na regulação do desenvolvimento celular (Latham *et al.*, 1997; Xie *et al.*, 1999), e modificações no padrão de expressão gênica do hospedeiro, principalmente no sentido de ativar genes envolvidos na síntese de DNA e na divisão celular (Settlage *et al.*, 2001; Luque *et al.*, 2002; Arguello-Astorga *et al.*, 2004; Ascencio-Ibanez *et al.*, 2008).

O sucesso da disseminação do vírus pela planta implica na infecção de novas células hospedeiras e constante replicação viral nessas células. Os begomovírus são altamente dependentes de fatores do hospedeiro para sua proliferação. O genoma viral não codifica uma DNA polimerase, e diversos fatores acessórios codificados pelo hospedeiro são requeridos para replicação e movimento sistêmico do vírus (Gutierrez, 2000). Como os begomovírus infectam células vegetais diferenciadas, o vírus deve ser capaz de ativar a transcrição de genes do hospedeiro envolvidos no processo de síntese de enzimas e outros fatores necessários para a replicação de DNA. De fato, diversos trabalhos comprovaram que a proteína REP dos

begomovírus é responsável pela ativação da síntese de DNA em células totalmente diferenciadas. Essa ativação se dá pela indução do acúmulo de PCNA ("proliferating cell nuclear antigen"), uma proteína que está associada à síntese de DNA em plantas (Nagar *et al.*, 1995; Palmer *et al.*, 1998; Egelkrout *et al.*, 2001; Nagar *et al.*, 2002). Alguns membros da família *Geminiviridae* induzem não somente a expressão e acúmulo de PCNA, mas também interferem com a regulação do ciclo celular do hospedeiro (a interação entre REP e componentes reguladores do ciclo celular de plantas está descrita em detalhes no item 2.6). A outra proteína viral envolvida na replicação, REN, interage com a proteína SINAC1, pertencente à família de fatores de transcrição que possuem domínio NAC, o que está correlacionado com aumento no acúmulo de DNA viral (Selth *et al.*, 2005).

As plantas possuem diferentes mecanismos de defesa em resposta à infecção viral. Os begomovírus interferem em várias destas respostas de defesa (Wang *et al.*, 2003; Vanitharani *et al.*, 2004; Trinks *et al.*, 2005), provavelmente como uma forma de maximizar a replicação viral em termos quantitativos (permitindo o acúmulo de maiores quantidades de partículas virais na célula infectada) e temporais (diminuindo o tempo necessário para o estabelecimento da infecção sistêmica). Algumas dessas interações já foram identificadas, embora os mecanismos moleculares ainda não tenham sido totalmente elucidados.

Utilizando o sistema duplo-híbrido de levedura foi possível demonstrar que a proteína TrAP do TGMV inativa uma proteína cinase denominada SNF1 ("sucrose non-fermenting 1"). Essa inativação leva a um aumento da suscetibilidade da planta ao vírus, por ser a cinase SNF1 um regulador chave de respostas a estresses celulares que reduzem a disponibilidade de ATP (Hao *et al.*, 2003). TrAP também interage e inativa outra cinase, ADK ("adenosine kinase"), responsável pela síntese de 5'-AMP a partir de adenosina e ATP (Wang *et al.*, 2003). As duas interações provavelmente estão interligadas, pois a cinase SNF1 é ativada por 5'-AMP. O fato de TrAP interagir com SNF1 e ADK sugere que as respostas metabólicas mediadas por SNF1 são um componente importante da resposta de defesa a vírus, e que os begomovírus 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 sequência-específica de mRNAs alvos (Brodersen *et al.*, 2008). O silenciamento

de RNA constitui também um mecanismo eficiente de defesa de plantas contra vírus (Blevins *et al.*, 2006; Raja *et al.*, 2010). 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 (Voinnet *et al.*, 2000; Pfeffer *et al.*, 2002; Qu & Morris, 2002; Chapman *et al.*, 2004; Dunoyer *et al.*, 2004; Roth *et al.*, 2004; de Vries & Berkhout, 2008; Glick *et al.*, 2008). No caso dos begomovírus, as proteínas TrAP e AC4 já foram identificadas como supressoras de silenciamento (Voinnet *et al.*, 1999; van Wezel *et al.*, 2001; Vanitharani *et al.*, 2004; Trinks *et al.*, 2005). O papel diferenciado de TrAP e AC4 na supressão de silenciamento pode conferir características distintas ao desenvolvimento da doença causada por diferentes espécies de begomovírus (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 begomovírus suprimem a resposta de defesa via inibição de ADK.

Baliji *et al.* (2010) forneceram evidências de que a inibição de ADK também afeta a expressão de genes primários que respondem a citocinina. A expressão da TrAP do TGMV em folhas de *Nicotiana benthamiana* aumentou a atividade do promotor ARR5, o qual responde a citocinina. A aplicação de citocinina exógena levou a maior suscetibilidade à infecção viral. Estes resultados indicam que a alteração na expressão destes genes é importante para a infecção pelo TGMV e que a indução de sintomas pode ser condicionada, ao menos em parte, ao maior acúmulo do produto de genes que respondem a citocinina.

Além da ação de TrAP na supressão do silenciamento gênico e no aumento da expressão de genes que respondem a citocinina, esta proteína também atua como um transativador transcricional de genes requeridos tardiamente no ciclo de infecção viral (Sunter & Bisaro, 1991; Sunter & Bisaro, 1992; Lacatus & Sunter, 2008). Recentemente, foi demonstrada a interação do fator transcricional PEAPOD2 de *Arabidopsis thaliana* com TrAP e com a região promotora da CP, conduzindo à expressão deste gene (Lacatus & Sunter, 2009). Conjuntamente, estes resultados demonstram a multifuncionalidade desta proteína no ciclo de infecção viral.

Interações envolvendo as proteínas de movimento MP e NSP também já foram relacionadas. A interação entre as proteínas MP e NSP foi demonstrada por meio da relocalização de NSP por MP em protoplastos de *N. tabacum* e também pela interação física

demonstrada no sistema duplo-híbrido de levedura (Sanderfoot & Lazarowitz, 1995; Mariano *et al.*, 2004).

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 que também acetila a proteína capsidial viral, mas não a proteína NSP. Além disso, não atua como um coativador transcricional *in vitro*. Esta acetiltransferase regula o transporte núcleo-citoplasma do genoma viral e outros eventos nucleares não-transcricionais 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). Esta interação foi associada à hipótese do modelo guarda de resistência em plantas, ou seja, NSP seria um fator de virulência que se liga a NIK para que não ocorra a indução de uma resposta de resistência (Mariano *et al.*, 2004). A interação entre as proteínas NIK e NSP foi alvo de um estudo posterior com o objetivo de elucidar sua função no ciclo de infecção viral (Fontes *et al.*, 2004). Neste estudo demonstrou-se que as NIKs são proteínas com propriedades de receptores que se localizam em membranas, e que a interação com NSP inibe essa atividade. Dessa forma, a interação entre NSP e NIK seria uma forma de suprimir uma resposta de defesa da planta ao vírus. Rocha *et al.* (2008) demonstraram o envolvimento da proteína ribossomal L10 (rpL10) na sinalização antiviral mediada por NIK. A proteína transmembrana NIK é um receptor autêntico, que uma vez fosforilado desencadeia uma cascata de sinalização que tem como intermediário a proteína ribossomal L10, e como produto final a expressão de genes de defesa contra begomovírus (Santos *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2010). Florentino *et al.* (2006) demonstraram que NSP também interage com outra serina/treonina cinase celular, NsAK ("NSP-associated kinase"). Entretanto, ao contrário de NIK, NsAK seria uma proteína que contribui com a infecção viral. De fato, a inibição da atividade de NsAK atenua o desenvolvimento dos sintomas.

Recentemente foram relatadas interações entre a proteína MP e as proteínas sinaptotagmina de *Arabidopsis thaliana* (SYTA) (Lewis & Lazarowitz, 2010) e HSC70 ("heat shock cognate 70 Kda") (Krenz *et al.*, 2010). Utilizando o sistema de recrutamento SOS de levedura, Lewis & Lazarowitz (2010) demonstraram que a MP do begomovírus *Cabbage leaf*

curl virus (CaLCuV) interage com SYTA de *A. thaliana*. SYTA regula o transporte célula-a-célula da MP do CaLCuV e é necessária para o movimento sistêmico e infecção de *A. thaliana*. Em ensaio de duplo-híbrido verificou-se a interação entre HSC70 de *A. thaliana* e a MP do begomovírus *Abutilon mosaic virus* (AbMV). Esta interação foi confirmada *in vivo* utilizando-se o ensaio de complementação de fluorescência bimolecular (BiFC) (Krenz et al., 2010). Os resultados sugerem que a interação HSC70 e MP é importante para o transporte viral e indução de sintomas pelo AbMV.

2.6. Interferência dos begomovírus no ciclo celular

A divisão celular consiste basicamente de dois processos: replicação do DNA e a segregação dos cromossomos replicados dentro de duas células independentes (Vermeulen *et al.*, 2003). O ciclo celular é dividido em quatro fases: G₁, S, G₂ e M (Figura 2). A replicação do DNA ocorre na fase S, que é precedida pela fase G₁ na qual a célula se prepara para a síntese de DNA. Antes da replicação do DNA, durante a fase G₁, as células podem entrar em um estado de "repouso" denominado G₀. Na fase G₂, posterior à replicação do DNA, a célula se prepara para a mitose (M) (Vermeulen *et al.*, 2003). A transição de uma fase para outra ocorre de maneira ordenada e é regulada por diversas proteínas celulares. As cinases dependentes de ciclinas (CDK) são proteínas regulatórias requeridas em diferentes pontos do ciclo celular (Vermeulen *et al.*, 2003). De maneira geral as proteínas CDK acumulam de maneira estável durante o ciclo celular. Em contraste, as suas ativadoras (as ciclinas) tem seu acúmulo reduzido ou aumentado dependendo da fase do ciclo celular, e desta maneira ativam periodicamente diferentes CDKs, regulando o ciclo celular (Evans *et al.*, 1983; Pines, 1991). O ciclo celular pode sofrer modificações, onde determinadas fases podem ser alteradas ou bloqueadas. Dentre as modificações que ocorrem no ciclo celular incluem-se o endociclo, a re-replicação e a endomitose (Lee *et al.*, 2009).

O endociclo consiste de períodos alternados entre a fase S e a fase G (Figura 2), sem ocorrer a fase M, resultando em células com um único núcleo poliplóide (Lee *et al.*, 2009). Muitos organismos utilizam o endociclo para fornecer nutrientes e proteínas necessárias para o desenvolvimento do ovo ou do embrião. O endosperma de sementes de plantas e células do folículo de *Drosophila* são os exemplos mais estudados. A implicação lógica para o aumento no conteúdo de DNA é a necessidade de sustentar a produção de proteínas e a alta atividade metabólica necessária para embriogênese (Lee *et al.*, 2009). Em mamíferos, o crescimento do organismo é função principalmente do aumento no número de células, e o endociclo é restrito

a células especializadas. Em contraste, nas plantas, o endociclo é comum e está ligado ao crescimento, que pode ser definido como o aumento no número ou no tamanho das células. Muitas vezes o endociclo representa a fase final de replicação do DNA durante o desenvolvimento da planta, e por isso pode ser mais facilmente induzido por uma infecção viral (Ascencio-Ibanez *et al.*, 2008).

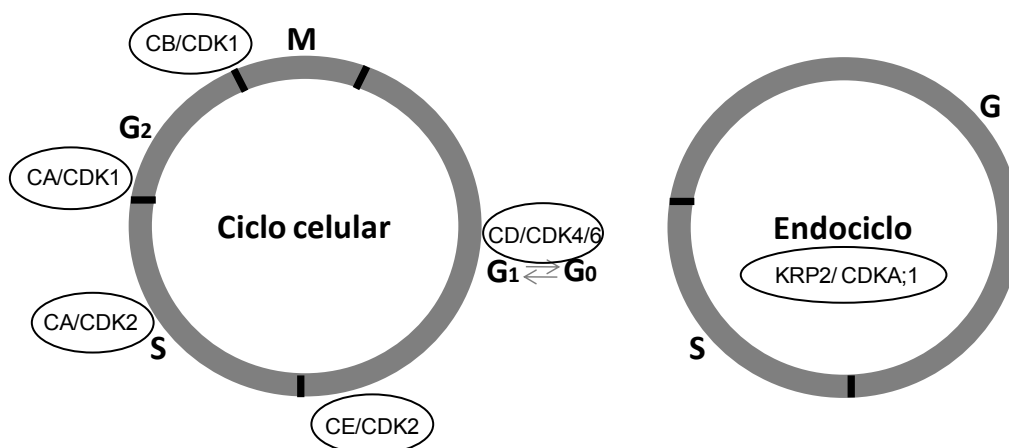


Figura 2. Modelo simplificado do ciclo celular e do endociclo. As diferentes fases do ciclo celular estão representadas por M (mitose), G₁ (período de preparação para a síntese de DNA), S (síntese de DNA), G₂ (preparação da célula para a mitose). Na fase G₁ as células podem entrar em um estado de "repouso" denominado G₀. O endociclo é representado por duas fases: a fase S e a fase G. Baixos níveis da ciclina D (CD) conduzem a célula a um estado de repouso (G₀). A progressão da fase G₁ para fase S é controlada pela presença das ciclinas D e E (CD e CE), que ativam suas respectivas CDKs promovendo o progresso para a fase S. A ciclina A (CA) atua na ativação de CDK2 e CDK1, promovendo a progressão da fase S e a transição da fase S para fase G₂, respectivamente. A transição da fase G₂ para fase M é controlada pela ativação de CDK1 pela ciclina B (CB). A proteína KRP2 inibe o complexo mitótico CDKA;1, promovendo o endociclo. Adaptado de Shackelford *et al.* (1999), Verkest *et al.* (2005) e Lee *et al.* (2009).

Em tecidos vegetais totalmente diferenciados, a maioria das células não se encontra replicando seu DNA. Para sobrepor esta barreira, os begomovírus reprogramam o ciclo celular para criar um ambiente favorável para a replicação (Nagar *et al.*, 1995). O padrão assimétrico na expressão de genes de *A. thaliana* associados ao ciclo celular sugere que a infecção pelo CaLCuV ativa genes da fase S e inibe genes da fase M. Isto pode ocorrer através do bloqueio na fase G₂ e conseqüentemente da fase M, ou pelo escape da fase M como parte de um endociclo (Ascencio-Ibanez *et al.*, 2008). A distinção entre estas duas

possibilidades se dá pela análise do conteúdo nuclear das células. A predominância de células 4C indica o bloqueio da fase G₂, enquanto a presença de células ≥ 8C indica que está ocorrendo o endociclo. Em células de *A. thaliana* infectadas pelo CaLCuV, Ascencio-Ibanez *et al.* (2008) observaram um incremento em núcleos 8C, 16C e 32C, e uma redução no número de núcleos 4C. Esses resultados indicam que a replicação do CaLCuV está associada a células que estão no endociclo, e que portanto a infecção por begomovírus induz o endociclo. No modelo proposto por Ascencio-Ibanez *et al.* (2008), o CaLCuV infecta preferencialmente células 4C predispostas ao endociclo. Neste modelo, a proteína REP dos begomovírus se liga à proteína retinoblastoma do hospedeiro, ativando os fatores transcricionais E2FC e E2FA para expressão de genes requeridos para a entrada na fase S do ciclo celular e para o endociclo.

Os efeitos da infecção por begomovírus na expressão de fatores envolvidos na regulação do ciclo celular, proliferação celular e replicação de DNA em *A. thaliana* refletem essa interação entre REP e retinoblastoma. Ascencio-Ibanez *et al.* (2008) verificaram que o nível dos transcritos dos genes CDKG;1, CKL5, e CKL6 (associados à saída da fase G₀ e re-entrada no ciclo celular) foi aumentado em tecidos de *A. thaliana* infectados pelo CaLCuV. Isto sugere que o CaLCuV induz as células em estado quiescente (fase G₀) à reentrada no ciclo celular. Os autores observaram também uma regulação negativa na expressão de genes associados à fase G₁, propondo que as células infectadas transitam dos estágios finais da fase G₁ para a fase S. Isto foi corroborado pela regulação negativa da expressão das ciclinas CYCD1;1 e CYCD3;2, as quais são ativadoras dos estágios iniciais da fase G₁, e pela superexpressão da ciclina CYCD4;2, a qual é requerida no estágio final da fase G₁ (Ascencio-Ibanez *et al.*, 2008).

A família de ciclinas D tem um papel importante na regulação da via RBR/E2F, pois ativam CDK, a qual fosforila RBR, desfazendo a interação com E2F (De Veylder *et al.*, 2007). Plantas de *A. thaliana* superexpressando CYCD3;1 e E2FB (promotores da fase M) apresentam maior resistência à infecção pelo CaLCuV (Ascencio-Ibanez *et al.*, 2008). Os autores propõem que a subfamília de ciclinas CYCD3 promove o ciclo mitótico e inibe o endociclo.

As cinases GRIKI e GRIK2 acumulam em tecidos jovens e tecidos maduros infectados por begomovírus e atuam regulando o desenvolvimento e coordenando a proliferação celular (Shen *et al.*, 2009). No contexto da infecção por begomovírus, essas cinases podem facilitar a

re-entrada no ciclo celular e a permanência das células no endociclo (Shen *et al.*, 2009), ações indispensáveis para a replicação do DNA viral.

O complexo promotor da anáfase ("anaphase promoting complex", APC), também conhecido como ciclossomo, tem papel importante na regulação do ciclo celular. Este complexo de proteínas atua na ubiquitinação de proteínas regulatórias do ciclo celular (como por exemplo, as ciclinas) para subsequente degradação pelo proteossomo 26S (Baker *et al.*, 2007). O APC é regulado por duas proteínas associadas, CDC20 e CCS52/CDH1, que atuam em pontos específicos do ciclo celular e conferem especificidade ao tipo de ciclina que será ubiquitinizada (Zachariae *et al.*, 1998; Kramer *et al.*, 2000). O APC de vertebrados apresenta pelo menos 12 subunidades, e é necessário para a saída da fase M do ciclo celular. Sua desativação é fundamental para que ocorra a transição da fase G1 para a fase S (Peters, 2006). Em vertebrados, as subunidades APC11 e APC2 são as subunidades catalíticas do complexo (Tang *et al.*, 2001).

Os poxvírus são vírus de DNA que replicam exclusivamente no citoplasma e apresentam certa independência do núcleo do hospedeiro por codificarem uma série de proteínas envolvidas na replicação e expressão do seu genoma (Johnston *et al.*, 2005). No entanto, codificam uma proteína que mimetiza a subunidade APC11 do ciclossomo. Esta proteína viral, denominada RING-H2, não apresenta atividade catalítica e com isso interfere com o processo de ubiquitinação de alvos regulatórios do ciclo celular por competir com APC11 na formação do complexo APC (Mo *et al.*, 2009; Mo *et al.*, 2010). Foi demonstrado também que os poxvírus manipulam a progressão do ciclo celular, e que na ausência da proteína viral que mimetiza APC11 o acúmulo viral é afetado negativamente (Mo *et al.*, 2009).

Em plantas, várias subunidades do APC vêm sendo caracterizadas em *A. thaliana*, *Oryza sativa* e *Populus trichocarpa* (Fulop *et al.*, 2005; Eloy *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2010). As plantas apresentam múltiplos ativadores do APC, que em associação com diferentes enzimas ligadas a ubiquitinação podem ter funções distintas ou complementares em estágios específicos do ciclo celular (Fulop *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2010).

2.7. Detecção de interação entre proteínas *in vivo* via purificação por afinidade em tandem ("tandem affinity purification", TAP)

No estudo proteômico, o método TAP ("tandem affinity purification") constitui uma ferramenta para a identificação da interação direta ou indireta entre proteínas *in vivo*. Este

método foi originalmente desenvolvido em leveduras para purificação de complexos de proteínas e identificação de interações proteína-proteína. Atualmente o método pode ser aplicado em mamíferos, plantas, bactérias e outros sistemas (Xu *et al.*, 2010). Este método apresenta diversas características atraentes: (i) a rápida purificação de complexos de proteínas sem necessidade de conhecimento da sua função ou estrutura; (ii) permite a purificação do complexo de proteínas em condições nativas; (iii) as etapas para purificação por afinidade em tandem são muito específicas, evitando problemas com contaminantes; (iv) todo o complexo de proteínas purificado pode ser processado sob as mesmas condições (Xu *et al.*, 2010). O método permite a purificação (por meio de dois procedimentos seguidos de cromatografia por afinidade) de proteínas complexadas a uma proteína etiquetada alvo (Figura 3). A etiqueta consiste de um domínio de proteína A, um sítio de clivagem da protease do potyvírus *Tobacco etch virus* (TEV) e um domínio CBP ("cauomodulin-binding protein") de ligação a calmodulina. O método tem sido utilizado para identificação de proteínas em heterocomplexos por meio de espectrometria de massa, em leveduras (Gavin *et al.*, 2002), células de mamíferos (Knuesel *et al.*, 2003), *Escherichia coli* (Gully *et al.*, 2003), células de insetos (Forler *et al.*, 2003) e plantas (Rohila *et al.*, 2004).

O método TAP apresenta aplicações similares ao sistema duplo híbrido de leveduras. Entretanto, apresenta a vantagem de identificar interações diretas e indiretas em um único experimento, sendo preferencialmente utilizado na identificação de heterocomplexos de proteínas *in vivo* (Rigaut *et al.*, 1999). Proteínas maiores, proteínas não estruturadas e proteínas com alto ponto isoelétrico são sub-representadas entre as interações detectadas pelo sistema duplo-híbrido de levedura (Jensen *et al.*, 2008). O método TAP é mais eficiente quando as proteínas são abundantes e citoplasmáticas (Jensen *et al.*, 2008). Em plantas, o método TAP vem sendo utilizado principalmente em *Arabidopsis thaliana* (Rubio *et al.*, 2005; Van Leene *et al.*, 2007; Dufresne *et al.*, 2008; Thivierge *et al.*, 2008), *Nicotiana benthamiana* (Rohila *et al.*, 2004) e *Oryza sativa* (Rohila *et al.*, 2006).

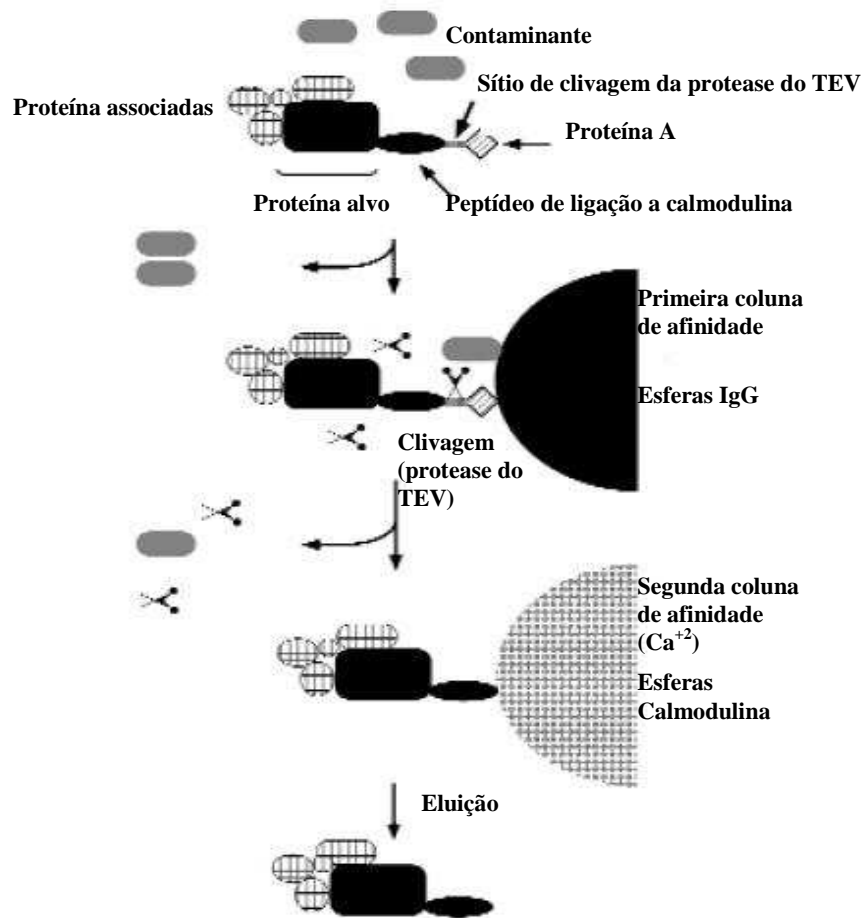


Figura 3. Representação esquemática do procedimento de purificação por afinidade em tandem (TAP). A proteína alvo etiquetada (Proteína A + sítio de clivagem da protease do potyvírus TEV + peptídeo de ligação a calmodulina) encontra-se complexada com proteínas associadas. Este heterocomplexo é então submetido à primeira cromatografia por afinidade, utilizando-se esferas de IgG às quais a proteína A irá se ligar. Posteriormente à clivagem pela protease do TEV, o heterocomplexo é submetido à segunda cromatografia por afinidade (esferas de calmodulina). Finalmente o heterocomplexo é recuperado pela eluição com EGTA. Adaptado de Rigaut *et al.* (1999).

Poucos trabalhos utilizando o método TAP associado à espectrometria de massas tem sido utilizados na identificação de proteínas de plantas que interagem com proteínas virais. No estudo da interação entre *A. thaliana* e o potyvírus *Turnip mosaic virus* (TuMV) foi possível detectar a interação entre as proteínas Hsp70 ("heat shock 70 KDa protein") e Eif1A ("eukaryotic elongation factor 1^a") com a RdRp ("RNA-dependent RNA polymerase") viral, sendo estas interações essenciais para infecção pelo vírus (Dufresne *et al.*, 2008; Thivierge *et al.*, 2008).

3. LITERATURA CITADA

- ABERLE H.J., RUTZ M.L., KARAYAVUZ M., FRISCHMUTH S., WEGE C., HULSER D., JESKE H. Localizing the movement proteins of Abutilon mosaic geminivirus in yeast by subcellular fractionation and freeze-fracture immuno-labelling. **Archives of Virology**, v. 147, p. 103-117, 2002.
- AKAD F., TEVEROVSKY E., DAVID A., CZOSNEK H., GIDONI D., GERA A., LOEBENSTEIN G. A cDNA from tobacco codes for an inhibitor of virus replication (IVR)-like protein. **Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 969-976, 1999.
- ALVES-JUNIOR M., ALFENAS-ZERBINI P., ANDRADE E.C., ESPOSITO D.A., SILVA F.N., CRUZ A.C.F., VENTRELLA M.C., OTONI W.C., ZERBINI F.M. Synergism and negative interference during co-infection of tomato and *Nicotiana benthamiana* with two bipartite begomoviruses. **Virology**, v. 387, p. 257-266, 2009.
- 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., MANHANI G.G., ALFENAS P.F., CALEGARIO R.F., FONTES E.P.B., ZERBINI F.M. *Tomato yellow spot virus*, a tomato-infecting begomovirus from Brazil with a closer relationship to viruses from *Sida* sp., forms pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from *Sida*. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 3687-3696, 2006.
- ARAGÃO F.J.L., BARROS L.M.G., BRASILEIRO A.C.M., RIBEIRO S.G., SMITH F.D., SANFORD J.C., FARIA J.C., 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.
- ARGUELLO-ASTORGA G., ASCENCIO-IBANEZ J.T., DALLAS M.B., OROZCO B.M., HANLEY-BOWDOIN L. High-frequency reversion of geminivirus replication protein mutants during infection. **Journal of Virology**, v. 81, p. 11005-11015, 2007.

- ARGUELLO-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, 1994a.
- 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., GUEVARA-GONZÁLEZ R.G., HERRERA-ESTRELLA L.R., RIVERA-BUSTAMANTE R.F. Geminivirus replication origins have a group-specific organization of interactive elements: a model for replication. **Virology**, v. 203, p. 90-100, 1994b.
- 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.
- ASCENCIO-IBANEZ J.T., SOZZANI R., LEE T.J., CHU T.M., WOLFINGER R.D., CELLA R., HANLEY-BOWDOIN L. Global analysis of *Arabidopsis* gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection. **Plant Physiology**, v. 148, p. 436-454, 2008.
- BAKER D.J., DAWLATY M.M., GALARDY P., VAN DEURSEN J.M. Mitotic regulation of the anaphase-promoting complex. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, p. 589-600, 2007.
- BALIJI S., LACATUS G., SUNTER G. The Interaction between geminivirus pathogenicity proteins and adenosine kinase leads to increased expression of primary cytokinin-responsive genes. **Virology**, v. 402, p. 238-247, 2010.
- BEZERRA-AGASIE I.C., FERREIRA G.B., ÁVILA A.C., INOUE-NAGATA A.K. First report of *Tomato severe rugose virus* in chili pepper in Brazil. **Plant Disease**, v. 90, p. 2006.
- 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.
- BLEVINS T., RAJESWARAN R., SHIVAPRASAD P.V., BEKNAZARIANTS D., SIAMMOUR A., PARK H.S., VAZQUEZ F., ROBERTSON D., MEINS F., HOHN T., POOGGIN M.M. Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. 6233-6246, 2006.
- BRIDDON R.W. Cotton leaf curl disease, a multicomponent begomovirus complex. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, p. 427-434, 2003.
- BRIDDON R.W., BROWN J.K., MORIONES E., STANLEY J., ZERBINI M., ZHOU X., FAUQUET C.M. Recommendations for the classification and nomenclature of the DNA-beta satellites of begomoviruses. **Archives of Virology**, v. 153, p. 763-781, 2008.

- BRIDDON R.W., PATIL B.L., BAGEWADI B., NAWAZ-UL-REHMAN M.S., FAUQUET C.M. Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, p. 2010.
- BRIDDON R.W., STANLEY J. Subviral agents associated with plant single-stranded DNA viruses. **Virology**, v. 344, p. 198-210, 2006.
- BRODERSEN P., SAKVARELIDZE-ACHARD L., BRUUN-RASMUSSEN M., DUNOYER P., YAMAMOTO Y.Y., SIEBURTH L., VOINNET O. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. **Science**, v. 320, p. 1185-1190, 2008.
- 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.
- BULL S.E., BRIDDON R.W., SSERUBOMBWE W.S., NGUGI K., MARKHAM P.G., STANLEY J. Infectivity, pseudorecombination and mutagenesis of Kenyan cassava mosaic begomoviruses. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 1624-1633, 2007.
- CALEGARIO R.F., FERREIRA S.S., ANDRADE E.C., ZERBINI F.M. Characterization of *Tomato yellow spot virus*, (ToYSV), a novel tomato-infecting begomovirus from Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1335-1343, 2007.
- CASTILLO-URQUIZA G.P., BESERRA JR. J.E.A., BRUCKNER F.P., LIMA A.T.M., VARSANI A., ALFENAS-ZERBINI P., ZERBINI F.M. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Archives of Virology**, v. 153, p. 1985-1989, 2008.
- CASTILLO-URQUIZA G.P., BESERRA JUNIOR J.E.A., ALFENAS-ZERBINI P., VARSANI A., LIMA A.T.M., BARROS D.R., ZERBINI F.M. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato in Paty do Alferes, Rio de Janeiro state, Brazil. **Virus Reviews and Research**, v. 12, p. 233, 2007.
- CHAKRABORTY S., VANITHARANI R., CHATTOPADHYAY B., FAUQUET C.M. Supervirulent pseudorecombination and asymmetric synergism between genomic components of two distinct species of begomovirus associated with severe tomato leaf curl disease in India. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 818-828, 2008.
- CHAPMAN E.J., PROKHNEVSKY A.I., GOPINATH K., DOLJA V.V., CARRINGTON J.C. Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. **Genes & Development**, v. 18, p. 1179-1186, 2004.
- 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.
- CHOI I.R., STENGER D.C. Strain-specific determinants of beet curly top geminivirus DNA replication. **Virology**, v. 206, p. 904-912, 1995.
- CLOUGH S.J., BENT A.F. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v. 16, p. 735-743, 1998.

- COSTA A.S. Increase in the populational density of *Bemisia tabaci*, a threat to widespread virus infection of legume crops in Brazil. In: Bird J, Maramorosch K (Eds.) **Tropical Diseases of Legumes**. New York. Academic Press. pp. 171. 1975.
- COTRIM M.A., KRAUSE-SAKATE R., NARITA N., ZERBINI F.M., PAVAN M.A. Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. **Summa Phytopathologica**, v. 33, p. 300-303, 2007.
- CUI L., WALL P.K., LEEBENS-MACK J.H., LINDSAY B.G., SOLTIS D.E., DOYLE J.J., SOLTIS P.S., CARLSON J.E., ARUMUGANATHAN K., BARAKAT A., ALBERT V.A., MA H., DEPAMPHILIS C.W. Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. **Genome Research**, v. 16, p. 738-749, 2006.
- DAVINO S., NAPOLI C., DELLACROCE C., MIOZZI L., NORIS E., DAVINO M., ACCOTTO G.P. Two new natural begomovirus recombinants associated with the tomato yellow leaf curl disease co-exist with parental viruses in tomato epidemics in Italy. **Virus Research**, v. 143, p. 15-23, 2009.
- DE VEYLDER L., BEECKMAN T., INZE D. The ins and outs of the plant cell cycle. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, p. 655-665, 2007.
- DE VRIES W., BERKHOUT B. RNAi suppressors encoded by pathogenic human viruses. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 40, p. 2007-2012, 2008.
- DELLAPORTA S.L., WOOD J., HICKS J.B. A plant DNA miniprep: Version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 1, p. 19-21, 1983.
- DEN ELZEN N., PINES J. Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase. **Journal of Cell Biology**, v. 153, p. 121-136, 2001.
- DUFFY S., HOLMES E.C. Validation of high rates of nucleotide substitution in geminiviruses: Phylogenetic evidence from East African cassava mosaic viruses. **Journal of General Virology**, v. 90, p. 1539-1547, 2009.
- DUFFY S., SHACKELTON L.A., HOLMES E.C. Rates of evolutionary change in viruses: Patterns and determinants. **Nature Reviews Genetics**, v. advanced online publication, p. 2008.
- DUFRESNE P.J., THIVIERGE K., COTTON S., BEAUCHEMIN C., IDE C., UBALIJORO E., LALIBERTE J.F., FORTIN M.G. Heat shock 70 protein interaction with Turnip mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase within virus-induced membrane vesicles. **Virology**, v. 374, p. 217-227, 2008.
- DUNOYER P., LECELLIER C.H., PARIZOTTO E.A., HIMBER C., VOINNET O. Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. **Plant Cell**, v. 16, p. 1235-1250, 2004.
- EGELKROUT E.M., ROBERTSON D., HANLEY-BOWDOIN L. Proliferating cell nuclear antigen transcription is repressed through an E2F consensus element and activated by geminivirus infection in mature leaves. **Plant Cell**, v. 13, p. 1437-1452., 2001.

- ELOY N.B., COPPENS F., BEEMSTER G.T., HEMERLY A.S., FERREIRA P.C.G. The Arabidopsis anaphase promoting complex (APC): Regulation through subunit availability in plant tissues. **Cell Cycle**, v. 5, p. 1957-1965, 2006.
- EVANS T., ROSENTHAL E.T., YOUNGBLOM J., DISTEL D., HUNT T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. **Cell**, v. 33, p. 389-396, 1983.
- 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., GILBERTSON R.L., HANSON S.F., MORALES F.J., AHLQUIST P.G., LONIELLO A.O., MAXWELL D.P. Bean golden mosaic geminivirus type II isolates from the Dominican Republic and Guatemala: Nucleotide sequences, infectious pseudorecombinants, and phylogenetic relationships. **Phytopathology**, v. 84, p. 321-329, 1994.
- FARIA J.C., 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., BRIDDON R.W., BROWN J.K., MORIONES E., STANLEY J., ZERBINI F.M., ZHOU X. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. **Archives of Virology**, v. 153, p. 783-821, 2008.
- 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 F.R., ALBUQUERQUE L.C., GIORDANO L.B., BOITEUX L.S., ÁVILA A.C., INOUE-NAGATA A.K. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. **Virus Genes**, v. 36, p. 251-258, 2008.
- FERNANDES J.J., CARVALHO M.G., ANDRADE E.C., BROMMONSCHENKEL S.H., FONTES E.P.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, p. 513-522, 2006.
- FLORENTINO L.H., SANTOS A.A., FONTENELLE M.R., PINHEIRO G.L., ZERBINI F.M., BARACAT-PEREIRA M.C., FONTES E.P.B. A PERK-like receptor kinase interacts with the geminivirus nuclear shuttle protein and potentiates viral infection. **Journal of Virology**, v. 80, p. 6648-6656, 2006.
- FONTENELLE M.R., LUZ D.F., GOMES A.P., FLORENTINO L.H., ZERBINI F.M., FONTES E.P. Functional analysis of the naturally recombinant DNA-A of the bipartite begomovirus *Tomato chlorotic mottle virus*. **Virus Research**, v. 126, p. 262-267, 2007.
- FONTES E.P.B., EAGLE P.A., SIPE P.S., LUCKOW V.A., HANLEY-BOWDOIN L. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 8459-8465, 1994.

- FONTES E.P.B., LUCKOW V.A., 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.
- FORLER D., KOCHER T., RODE M., GENTZEL M., IZAURRALDE E., WILM M. An efficient protein complex purification method for functional proteomics in higher eukaryotes. **Nature Biotechnology**, v. 21, p. 89-92, 2003.
- FRISCHMUTH S., KLEINOW T., ABERLE H.J., WEGE C., HULSER D., JESKE H. Yeast two-hybrid systems confirm the membrane association and oligomerization of BC1 but do not detect an interaction of the movement proteins BC1 and BV1 of Abutilon mosaic geminivirus. **Archives of Virology**, v. 149, p. 2349-2364, 2004.
- FRISCHMUTH S., WEGE C., HULSER D., JESKE H. The movement protein BC1 promotes redirection of the nuclear shuttle protein BV1 of Abutilon mosaic geminivirus to the plasma membrane in fission yeast. **Protoplasma**, v. 230, p. 117-123, 2007.
- 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, 1997.
- FULOP K., TARAYRE S., KELEMEN Z., HORVATH G., KEVEI Z., NIKOVICS K., BAKO L., BROWN S., KONDOROSI A., KONDOROSI E. *Arabidopsis* anaphase-promoting complexes - Multiple activators and wide range of substrates might keep APC perpetually busy. **Cell Cycle**, v. 4, p. 1084-1092, 2005.
- FURUNO N., DEN ELZEN N., PINES J. Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase. **Journal of Cell Biology**, v. 147, p. 295-306, 1999.
- 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. International Workshop on Bemisia and Geminiviral diseases. San Juan - Puerto Rico, 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.
- GARCIA-ANDRES S., TOMAS D.M., SANCHEZ-CAMPOS S., NAVAS-CASTILLO J., MORIONES E. Frequent occurrence of recombinants in mixed infections of tomato yellow leaf curl disease-associated begomoviruses. **Virology**, v. 365, p. 210-219, 2007.
- GARCIA-ARENAL F., FRAILE A., MALPICA J.M. Variability and genetic structure of plant virus populations. **Annual Review of Phytopathology**, v. 39, p. 157-186, 2001.
- GARRIDO-RAMIREZ E.R., SUDARSHANA M.R., LUCAS W.J., GILBERTSON R.L. Bean dwarf mosaic virus BV1 protein is a determinant of the hypersensitive response and

- avirulence in *Phaseolus vulgaris*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, p. 1184-1194., 2000.
- GAVIN A.C., BOSCHE M., KRAUSE R., GRANDI P., MARZIOCH M., BAUER A., SCHULTZ J., RICK J.M., MICHON A.M., CRUCIAT C.M., REMOR M., HOFERT C., SCHELDER M., BRAJENOVIC M., RUFFNER H., MERINO A., KLEIN K., HUDAK M., DICKSON D., RUDI T., GNAU V., BAUCH A., BASTUCK S., HUHSE B., LEUTWEIN C., HEURTIER M.A., COPLEY R.R., EDELMANN A., QUERFURTH E., RYBIN V., DREWES G., RAIDA M., BOUWMEESTER T., BORK P., SERAPHIN B., KUSTER B., NEUBAUER G., SUPERTI-FURGA G. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. **Nature**, v. 415, p. 141-147, 2002.
- 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., BATTIS L., HANLEY-BOWDOIN L. Two domains of the AL 1 protein mediate geminivirus origin recognition. **Virology**, v. 239, p. 186-197, 1997.
- GLICK E., ZRACHYA A., LEVY Y., METT A., GIDONI D., BELAUSOV E., CITOVSKY V., GAFNI Y. Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 157-161, 2008.
- GLOTZER M., MURRAY A.W., KIRSCHNER M.W. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. **Nature**, v. 349, p. 132-138, 1991.
- GULLY D., MOINIER D., LOISEAU L., BOUVERET E. New partners of acyl carrier protein detected in Escherichia coli by tandem affinity purification. **FEBS Letters**, v. 548, p. 90-96, 2003.
- GUTIERREZ C. Geminivirus DNA replication. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 56, p. 313-329, 1999.
- GUTIERREZ C. DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminiviruses. **EMBO Journal**, v. 19, p. 792-799, 2000.
- GUTIERREZ C., RAMIREZ-PARRA E., CASTELLANO M.M., SANZ-BURGOS A.P., LUQUE A., MISSICH R. Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. **Veterinary Microbiology**, v. 98, p. 111-119, 2004.
- 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.
- HARRISON B.D., ZHOU X., OTIM NAPE G.W., LIU Y., ROBINSON D.J. Role of a novel type of double infection in the geminivirus-induced epidemic of severe cassava mosaic in Uganda. **Annals of Applied Biology**, v. 131, p. 437-448, 1997.
- 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.
- 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.
- HSU J.Y., REIMANN J.D., SORENSEN C.S., LUKAS J., JACKSON P.K. E2F-dependent accumulation of hEmi1 regulates S phase entry by inhibiting APC(Cdh1). **Nature Cell Biology**, v. 4, p. 358-366, 2002.
- IDRIS A.M., BRIDDON R.W., BULL S.E., BROWN J.K. Cotton leaf curl Gezira virus-satellite DNAs represent a divergent, geographically isolated Nile Basin lineage: predictive identification of a satDNA REP-binding motif. **Virus Research**, v. 109, p. 19-32, 2005.
- ILYINA T.V., KOONIN E.V. Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes and archaeobacteria. **Nucleic Acids Research**, v. 20, p. 3279-3285, 1992.
- INOUE-NAGATA A.K., ALBUQUERQUE L.C., ROCHA W.B., NAGATA T. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi 29 DNA polymerase. **Journal of Virological Methods**, v. 116, p. 209-211, 2004.
- JEGANATHAN K.B., MALUREANU L., VAN DEURSEN J.M. The Rae1-Nup98 complex prevents aneuploidy by inhibiting securin degradation. **Nature**, v. 438, p. 1036-1039, 2005.
- JENSEN B.P., SHARP C.F., GARDINER S.J., BEGG E.J. Development and validation of a stereoselective liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for quantification of S- and R-metoprolol in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 865, p. 48-54, 2008.
- JOHNSTON J.B., BARRETT J.W., NAZARIAN S.H., GOODWIN M., RICUTTIO D., WANG G., MCFADDEN G. A poxvirus-encoded pyrin domain protein interacts with

- ASC-1 to inhibit host inflammatory and apoptotic responses to infection. **Immunity**, v. 23, p. 587-598, 2005.
- JOUBES J., CHEVALIER C., DUDITS D., HEBERLE-BORS E., INZE D., UMEDA M., RENAUDIN J.P. CDK-related protein kinases in plants. **Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 607-620, 2000.
- 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.
- KHEYR-POUR A., BENDAHMANE M., MATZEIT V., ACCOTTO G.P., CRESPI S., GRONENBORN B. Tomato yellow leaf curl virus from Sardinia is a whitefly-transmitted monopartite geminivirus. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 6763-6769, 1991.
- KING R.W., PETERS J.M., TUGENDREICH S., ROLFE M., HIETER P., KIRSCHNER M.W. A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. **Cell**, v. 81, p. 279-288, 1995.
- KJEMTRUP S., SAMPSON K.S., PEELE C., NGUYEN L., CONKLING M., THOMPSON W., ROBERSON D. Gene silencing from DNA carried by a geminivirus. **Plant Journal**, v. 14, p. 91-100, 1998.
- KLEINOW T., HOLEITER G., NISCHANG M., STEIN M., KARAYAVUZ M., WEGE C., JESKE H. Post-translational modifications of Abutilon mosaic virus movement protein (BC1) in fission yeast. **Virus Research**, v. 131, p. 86-94, 2008.
- KNUESEL M., WAN Y., XIAO Z., HOLINGER E., LOWE N., WANG W., LIU X. Identification of novel protein-protein interactions using a versatile mammalian tandem affinity purification expression system. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 2, p. 1225-1233, 2003.
- KONG L.J., OROZCO B.M., ROE J.L., NAGAR S., OU S., FEILER H.S., DURFEE T., MILLER A.B., GRUISSEM W., ROBERTSON D., HANLEY-BOWDOIN L. A geminivirus replication protein interacts with the retinoblastoma protein through a novel domain to determine symptoms and tissue specificity of infection in plants. **EMBO Journal**, v. 19, p. 3485-3495., 2000.
- KRAMER E.R., SCHEURINGER N., PODTELEJNIKOV A.V., MANN M., PETERS J.M. Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, p. 1555-1569, 2000.
- KRENZ B., WINDEISEN V., WEGE C., JESKE H., KLEINOW T. A plastid-targeted heat shock cognate 70 kDa protein interacts with the Abutilon mosaic virus movement protein. **Virology**, v. 401, p. 6-17, 2010.
- LACATUS G., SUNTER G. Functional analysis of bipartite begomovirus coat protein promoter sequences. **Virology**, v. 376, p. 79-89, 2008.

- LACATUS G., SUNTER G. The Arabidopsis PEAPOD2 transcription factor interacts with geminivirus AL2 protein and the coat protein promoter. **Virology**, v. 392, p. 196-202, 2009.
- LAI M.M.C. RNA recombination in animal and plant viruses. **Microbiological Reviews**, v. 56, p. 61-79, 1992.
- 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.
- LAZAROWITZ S.G. Molecular characterization of two bipartite geminiviruses causing squash leaf curl disease: role of viral replication and movement functions in determining host range. **Virology**, v. 180, p. 70-80, 1991.
- LAZAROWITZ S.G. Geminiviruses: Genome structure and gene function. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 11, p. 327-349, 1992.
- LAZAROWITZ S.G., WU L.C., ROGERS S.G., ELMER J.S. Sequence-specific interaction with the viral AL1 protein identifies a geminivirus DNA replication origin. **Plant Cell**, v. 4, p. 799-809, 1992.
- LEE H.O., DAVIDSON J.M., DURONIO R.J. Endoreplication: Polyploidy with purpose. **Genes & Development**, v. 23, p. 2461-2477, 2009.
- LEFEUVRE P., LETT J.M., REYNAUD B., MARTIN D.P. Avoidance of protein fold disruption in natural virus recombinants. **PLoS Pathogens**, v. 3, p. e181, 2007a.
- LEFEUVRE P., LETT J.M., VARSANI A., MARTIN D.P. Widely conserved recombination patterns among single-stranded DNA viruses. **Journal of Virology**, v. 83, p. 2697-2707, 2009.
- LEFEUVRE P., MARTIN D.P., HOAREAU M., NAZE F., DELATTE H., THIERRY M., VARSANI A., BECKER N., REYNAUD B., LETT J.M. Begomovirus 'melting pot' in the south-west Indian Ocean islands: Molecular diversity and evolution through recombination. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 3458-3468, 2007b.
- LEVY A., TZFIRA T. Bean dwarf mosaic virus: a model system for the study of viral movement. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, p. 451-461, 2010.
- LEWIS J.D., LAZAROWITZ S.G. Arabidopsis synaptotagmin SYTA regulates endocytosis and virus movement protein cell-to-cell transport. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, p. 2491-2496, 2010.
- LIMA M.F., ELOY N.B., PEGORARO C., SAGIT R., ROJAS C., BRETZ T., VARGAS L., ELOFSSON A., OLIVEIRA A.C., HEMERLY A.S., FERREIRA P.C.G. Genomic evolution and complexity of the anaphase-promoting complex (APC) in land plants. **BMC Plant Biology**, v. 10, p. 254, 2010.

- LITTLEPAGE L.E., RUDERMAN J.V. Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. **Genes & Development**, v. 16, p. 2274-2285, 2002.
- LOEBENSTEIN G. Local lesions and induced resistance. **Advances in Virus Research**, v. 75, p. 73-117, 2009.
- LONDONO A., RIEGO-RUIZ L., ARGUELLO-ASTORGA G.R. DNA-binding specificity determinants of replication proteins encoded by eukaryotic ssDNA viruses are adjacent to widely separated RCR conserved motifs. **Archives of Virology**, v. 155, p. 1033-1046, 2010.
- 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.
- MANSOOR S., BRIDDON R.W., ZAFAR Y., STANLEY J. Geminivirus disease complexes: An emerging threat. **Trends in Plant Sciences**, v. 8, p. 128-134, 2003.
- MARIANO A.C., ANDRADE M.O., SANTOS A.A., CAROLINO S.M.B., OLIVEIRA M.L., BARACAT-PEREIRA M.C., BROMMONSHENKEL S.H., 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.
- MARTIN D.P., LEMEY P., LOTT M., MOULTON V., POSADA D., LEFEUVRE P. RDP3: A flexible and fast computer program for analyzing recombination. **Bioinformatics**, v. 26, p. 2462-2463, 2010.
- 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.
- MCGARRY T.J., KIRSCHNER M.W. Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. **Cell**, v. 93, p. 1043-1053, 1998.
- MO M., FLEMING S.B., MERCER A.A. Cell cycle deregulation by a poxvirus partial mimic of anaphase-promoting complex subunit 11. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, p. 19527-19532, 2009.
- MO M., FLEMING S.B., MERCER A.A. Changing pace: viral mimicry of an anaphase promoting complex subunit. **Cell Cycle**, v. 9, p. 632-633, 2010.
- 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.
- MURASHIGE T., SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Plant Physiology**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NAGAR S., HANLEY-BOWDOIN L., ROBERTSON D. Host DNA replication is induced by geminivirus infection of differentiated plant cells. **Plant Cell**, v. 14, p. 2995-3007, 2002.
- NAGAR S., PEDERSEN T.J., CARRICK K.M., HANLEY-BOWDOIN L., 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.
- NAGY P.D., SIMON A.E. New insights into the mechanisms of RNA recombination. **Virology**, v. 235, p. 1-9, 1997.
- NARBONNE-REVEAU K., SENGER S., PAL M., HERR A., RICHARDSON H.E., ASANO M., DEAK P., LILLY M.A. APC/CFzr/Cdh1 promotes cell cycle progression during the *Drosophila* endocycle. **Development**, v. 135, p. 1451-1461, 2008.
- NASH T.E., DALLAS M.B., REYES M.I., BUHRMAN G.K., ASCENCIO-IBANEZ J.T., HANLEY-BOWDOIN L. Functional analysis of a novel motif conserved across geminivirus Rep proteins. **Journal of Virology**, v. 85, p. 1182-1192, 2010.
- NAVARATNAM D.S. Yeast two-hybrid screening to test for protein-protein interactions in the auditory system. **Methods in Molecular Biology**, v. 493, p. 257-268, 2009.
- NAVOT N., PICHERSKY E., ZEIDAN M., ZAMIR D., CZOSNEK H. Tomato yellow leaf curl virus: a whitefly-transmitted geminivirus with a single genomic component. **Virology**, v. 185, p. 151-161, 1991.
- NAWAZ-UL-REHMAN M.S., FAUQUET C.M. Evolution of geminiviruses and their satellites. **FEBS Letters**, v. 583, p. 1825-1832, 2009.
- NITSCH J.P., NITSCH C. Haploid plants from pollen grains. **Science**, v. 163, p. 85-87, 1969.
- NOUEIRY A.O., LUCAS W.J., GILBERTSON R.L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. **Cell**, v. 76, p. 925-932, 1994.
- OROZCO B.M., HANLEY-BOWDOIN L. Conserved sequence and structural motifs contribute to the DNA binding and cleavage activities of a geminivirus replication protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 24448-24456, 1998.
- OROZCO B.M., MILLER A.B., SETTLAGE S.B., HANLEY-BOWDOIN L. Functional domains of a geminivirus replication protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 9840-9846, 1997.
- PADIDAM M., SAWYER S., FAUQUET C.M. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. **Virology**, v. 265, p. 218-224, 1999.

- PAGE R.D.M. TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Biosciences**, v. 12, p. 357-358, 1996.
- PALMER K.E., RYBICKI E.P. The molecular biology of mastreviruses. **Advances in Virus Research**, v. 50, p. 183-234, 1998.
- PALMER K.E., SCHNIPPENKOETTER W.H., RYBICKI E.P. Geminivirus isolation and DNA extraction. **Methods in Molecular Biology**, v. 81, p. 41-52, 1998.
- PAPROTKA T., METZLER V., JESKE H. The first DNA 1-like alpha satellites in association with New World begomoviruses in natural infections. **Virology**, v. 404, p. 148-157, 2010.
- 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.
- PATIL B.L., FAUQUET C.M. Cassava mosaic geminiviruses: actual knowledge and perspectives. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, p. 685-701, 2009.
- PETERS J.M. The anaphase-promoting complex: Proteolysis in mitosis and beyond. **Molecular Cell**, v. 9, p. 931-943, 2002.
- PETERS J.M. The anaphase promoting complex/cyclosome: A machine designed to destroy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, p. 644-656, 2006.
- 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.
- PFEFFER S., DUNOYER P., HEIM F., RICHARDS K.E., JONARD G., ZIEGLER-GRAFF V. P0 of *Beet western yellows virus* is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. **Journal of Virology**, v. 76, p. 6815-6824, 2002.
- PFLEGER C.M., KIRSCHNER M.W. The KEN box: An APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. **Genes & Development**, v. 14, p. 655-665, 2000.
- PINES J. Cyclins: wheels within wheels. **Cell Growth and Differentiation**, v. 2, p. 305-310, 1991.
- 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.
- POTTER J.L., NAKHA M.K., MEJIA L., MAXWELL D.P. PCR and DNA hybridization methods for specific detection of bean-infecting begomoviruses in the Americas and Caribbean. **Plant Disease**, v. 87, p. 1205-1212, 2003.

- QU F., MORRIS T.J. Efficient infection of *Nicotiana benthamiana* by *Tomato bushy stunt virus* is facilitated by the coat protein and maintained by p19 through suppression of gene silencing. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 15, p. 193-202, 2002.
- RAJA P., WOLF J.N., BISARO D.M. RNA silencing directed against geminiviruses: Post-transcriptional and epigenetic components. **Biochimie Biophysical Acta**, v. 1799, p. 337-351, 2010.
- 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. Tomato mottle Taino virus pseudorecombines with PYMV but not with ToMoV: Implications for the delimitation of cis- and trans-acting replication specificity determinants. **Archives of Virology**, v. 148, p. 1697-1712, 2003.
- 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. VIII Encontro Nacional de Virologia (Resumos). São Lourenço, MG, 1996.
- RIBEIRO S.G., MARTIN D.P., LACORTE C., SIMÕES I.C., ORLANDINI D.R.S., INOUE-NAGATA A.K. Molecular and biological characterization of *Tomato chlorotic mottle virus* suggests that recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses. **Phytopathology**, v. 97, p. 702-711, 2007.
- RIBEIRO S.G., MELLO L.V., BOITEUX L.S., KITAJIMA E.W., FARIA J.C. Tomato infection by a geminivirus in the Federal District, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 19, p. 330, 1994.
- RIGAUT G., SHEVCHENKO A., RUTZ B., WILM M., MANN M., SERAPHIN B. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. **Nature Biotechnology**, v. 17, p. 1030-1032, 1999.
- ROCHA C.S., SANTOS A.A., MACHADO J.P.B., FONTES E.P.B. The ribosomal protein L10/QM-like protein is a component of the NIK-mediated antiviral signaling. **Virology**, v. 380, p. 165-169, 2008.
- ROHILA J.S., CHEN M., CERNY R., FROMM M.E. Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants. **Plant Journal**, v. 38, p. 172-181, 2004.
- ROHILA J.S., CHEN M., CHEN S., CHEN J., CERNY R., DARDICK C., CANLAS P., XU X., GRIBSKOV M., KANRAR S., ZHU J.K., RONALD P., FROMM M.E. Protein-

- protein interactions of tandem affinity purification-tagged protein kinases in rice. **Plant Journal**, v. 46, p. 1-13, 2006.
- ROJAS M.R., GILBERTSON R.L., RUSSELL D.R., MAXWELL D.P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease**, v. 77, p. 340-347, 1993.
- ROJAS M.R., 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.
- ROMAY G., CHIRINOS D., GERAUD-POUEY F., DESBIEZ C. Association of an atypical alphasatellite with a bipartite New World begomovirus. **Archives of Virology**, v. 155, p. 1843-1847, 2010.
- RONQUIST F., HUELSENBECK J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, p. 1572-1574, 2003.
- ROTH B.M., PRUSS G.J., VANCE V.B. Plant viral suppressors of RNA silencing. **Virus Research**, v. 102, p. 97-108, 2004.
- RUBIO V., SHEN Y.P., SAIJO Y., LIU Y.L., GUSMAROLI G., DINESH-KUMAR S.P., DENG X.W. An alternative tandem affinity purification strategy applied to *Arabidopsis* protein complex isolation. **Plant Journal**, v. 41, p. 767-778, 2005.
- SAMBROOK J., RUSSEL D. Molecular Cloning - A Laboratory Manual (3^a ed.). Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.
- 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.
- SANDERFOOT A.A., LAZAROWITZ S.G. Getting it together in plant virus movement: Cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. **Trends in Cell Biology**, v. 6, p. 353-358, 1996.
- SANTOS A.A., CARVALHO C.M., FLORENTINO L.H., RAMOS H.J.O., FONTES E.P.B. Conserved Threonine Residues within the A-Loop of the Receptor NIK Differentially Regulate the Kinase Function Required for Antiviral Signaling. **Plos One**, v. 4, p. 2009.
- SANTOS A.A., LOPES K.V.G., APFATA J.A.C., FONTES E.P.B. NSP-interacting kinase, NIK: a transducer of plant defence signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, p. 3839-3845, 2010.
- 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.

- SCHEUFLER C., BRINKER A., BOURENKOV G., PEGORARO S., MORODER L., BARTUNIK H., HARTL F.U., MOAREFI I. Structure of TPR domain-peptide complexes: Critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. **Cell**, v. 101, p. 199-210, 2000.
- 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.
- SEAL S.E., VAN DEN BOSCH F., JEGER M.J. Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: Implications for sustainable control. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 25, p. 23-46, 2006.
- 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.
- SHACKELFORD R.E., KAUFMANN W.K., PAULES R.S. Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. **Environmental Health Perspectives**, v. 107 Suppl 1, p. 5-24, 1999.
- SHEN W., REYES M.I., HANLEY-BOWDOIN L. Arabidopsis protein kinases GRIK1 and GRIK2 specifically activate SnRK1 by phosphorylating its activation loop. **Plant Physiology**, v. 150, p. 996-1005, 2009.
- SILVA F.N., LIMA A.T.M., ROCHA C.S., ALVES-JÚNIOR M., HALLWASS M., INOUE-NAGATA A.K., ZERBINI F.M. Recombination and pseudorecombination driving the evolution of *Tomato severe rugose virus* and *Tomato rugose mosaic virus*: Two distinct DNA-As sharing the same DNA-B. Program and Abstracts, 6th International Geminivirus Symposium and 4th International ssDNA Comparative Virology Workshop. Guanajuato, Mexico, 2010.
- SOZZANI R., MAGGIO C., GIORDO R., UMANA E., ASCENCIO-IBANEZ J.T., HANLEY-BOWDOIN L., BERGOUNIOUX C., CELLA R., ALBANI D. The E2FD/DEL2 factor is a component of a regulatory network controlling cell proliferation and development in Arabidopsis. **Plant Molecular Biology**, v. 72, p. 381-395, 2010.
- 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., BISARO D.M., BRIDDON R.W., BROWN J.K., FAUQUET C.M., HARRISON B.D., RYBICKI E.P., STENGER D.C. Family *Geminiviridae*. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (Eds.) *Virus Taxonomy*. Eighth

- Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego. Elsevier Academic Press. pp. 301-326. 2005.
- STANLEY J., TOWNSEND R., CURSON S.J. Pseudorecombinants between cloned DNAs of two isolates of Cassava Latent Virus. **Journal of General Virology**, v. 66, p. 1055-1061, 1985.
- STENGER D.C., REVINGTON G.N., STEVENSON M.C., BISARO D.M. Replicational release of geminivirus genomes from tandemly repeated copies: Evidence for rolling-circle replication of a plant viral DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 8029-8033, 1991.
- SUNTER G., BISARO D.M. Transactivation in a geminivirus: AL2 gene product is needed for coat protein expression. **Virology**, v. 180, p. 416-422, 1991.
- SUNTER G., BISARO D.M. Transactivation of geminivirus AR1 and BR2 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. **Plant Cell**, v. 4, p. 1321-1331, 1992.
- TAMURA K., DUDLEY J., NEI M., KUMAR S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.
- TANG Z.Y., LI B., BHARADWAJ R., ZHU H.H., OZKAN E., HAKALA K., DEISENHOFER J., YU H.T. APC2 cullin protein and APC11 RING protein comprise the minimal ubiquitin ligase module of the anaphase-promoting complex. **Molecular Biology of the Cell**, v. 12, p. 3839-3851, 2001.
- TENG K.L., CHEN H., LAI J.B., ZHANG Z.H., FANG Y.Y., XIA R., ZHOU X.P., GUO H.S., XIE Q. Involvement of C4 Protein of Beet Severe Curly Top Virus (Family Geminiviridae) in Virus Movement. **Plos One**, v. 5, p. 2010.
- THIVIERGE K., COTTON S., DUFRESNE P.J., MATHIEU I., BEAUCHEMIN C., IDE C., FORTIN M.G., LALIBERTE J.F. Eukaryotic elongation factor 1A interacts with Turnip mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase and VPg-Pro in virus-induced vesicles. **Virology**, v. 377, p. 216-225, 2008.
- TREJO-SAAVEDRA D.L., VIELLE-CALZADA J.P., RIVERA-BUSTAMANTE R.F. The infective cycle of Cabbage leaf curl virus (CaLCuV) is affected by CRUMPLED LEAF (CRL) gene in *Arabidopsis thaliana*. **Virology Journal**, v. 6, p. -, 2009.
- 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.
- VAN DER WALT E., RYBICKI E.P., VARSANI A., POLSTON J.E., BILLHARZ R., DONALDSON L., MONJANE A.L., MARTIN D.P. Rapid host adaptation by extensive recombination. **Journal of General Virology**, v. 90, p. 734-746, 2009.

- VAN LEENE J., STALS H., EECKHOUT D., PERSIAU G., DE SLIJKE E.V., VAN ISTERDAEL G., DE CLERCQ A., BONNET E., LAUKENS K., REMMERIE N., HENDERICKX K., DE VIJLDER T., ABDELKRIM A., PHARAZYN A., VAN ONCKELEN H., INZE D., WITTERS E., DE JAEGER G. A tandem affinity purification-based technology platform to study the cell cycle interactome in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 6, p. 1226-1238, 2007.
- VAN LEENE J., WITTERS E., INZE D., DE JAEGER G. Boosting tandem affinity purification of plant protein complexes. **Trends in Plant Science**, v. 13, p. 517-520, 2008.
- 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.
- 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.
- VARSANI A., SHEPHERD D.N., MONJANE A.L., OWOR B.E., ERDMANN J.B., RYBICKI E.P., PETERSCHMITT M., BRIDDON R.W., MARKHAM P.G., OLUWAFEMI S., WINDRAM O.P., LEFEUVRE P., LETT J.M., MARTIN D.P. Recombination, decreased host specificity and increased mobility may have driven the emergence of maize streak virus as an agricultural pathogen. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 2063-2074, 2008.
- VERKEST A., MANES C.L., VERCRUYSSSE S., MAES S., VAN DER SCHUEREN E., BEECKMAN T., GENSCHIK P., KUIPER M., INZE D., DE VEYLDER L. The cyclin-dependent kinase inhibitor KRP2 controls the onset of the endoreduplication cycle during *Arabidopsis* leaf development through inhibition of mitotic CDKA;1 kinase complexes. **Plant Cell**, v. 17, p. 1723-1736, 2005.
- VERMEULEN K., VAN BOCKSTAELE D.R., BERNEMAN Z.N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v. 36, p. 131-149, 2003.
- VOINNET O., LEDERER C., BAULCOMBE D.C. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. **Cell**, v. 103, p. 157-167, 2000.
- 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 of the United States of America**, v. 96, p. 14147-14152, 1999.
- VON ARNIM A., STANLEY J. Inhibition of *African cassava mosaic virus* systemic infection by a movement protein from the related geminivirus *Tomato golden mosaic virus*. **Virology**, v. 187, p. 555-564, 1992.
- 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. **Journal of Virology**, 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.
- WEI W., AYAD N.G., WAN Y., ZHANG G.J., KIRSCHNER M.W., KAELIN W.G., JR. Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex. **Nature**, v. 428, p. 194-198, 2004.
- WERE H.K., WINTER S., MAISS E. Viruses infecting cassava in Kenya. **Plant Disease**, v. 88, p. 17-22, 2004.
- WIEBUSCH L., BACH M., UECKER R., HAGEMEIER C. Human cytomegalovirus inactivates the G0/G1-APC/C ubiquitin ligase by Cdh1 dissociation. **Cell Cycle**, v. 4, p. 1435-1439, 2005.
- 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.
- XU X.L., SONG Y., LI Y.H., CHANG J.F., ZHANG H., AN L.Z. The tandem affinity purification method: An efficient system for protein complex purification and protein interaction identification. **Protein Expression and Purification**, v. 72, p. 149-156, 2010.
- YOON H.J., FEOKTISTOVA A., WOLFE B.A., JENNINGS J.L., LINK A.J., GOULD K.L. Proteomics analysis identifies new components of the fission and budding yeast anaphase-promoting complexes. **Current Biology**, v. 12, p. 2048-2054, 2002.
- ZACHARIAE W., SCHWAB M., NASMYTH K., SEUFERT W. Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. **Science**, v. 282, p. 1721-1724, 1998.
- ZERBINI F.M. **Aspects of the epidemiology of lettuce mosaic in the Salinas Valley of California, and the production of lettuce mosaic virus-resistant transgenic lettuce plants.** Dep. of Plant Pathology, University of California, Davis. 122 p. 1996.
- ZERBINI F.M., ANDRADE E.C., BARROS D.R., FERREIRA S.S., LIMA A.T.M., ALFENAS P.F., MELLO R.N. Traditional and novel strategies for geminivirus management in Brazil. **Australasian Plant Pathology**, v. 34, p. 475-480, 2005.
- ZHANG S.C., GHOSH R., JESKE H. Subcellular targeting domains of Abutilon mosaic geminivirus movement protein BC1. **Archives of Virology**, v. 147, p. 2349-2363., 2002.
- ZHOU X., LIU Y., CALVERT L., MUNOZ C., OTIM-NAPE G.W., ROBINSON D.J., HARRISON B.D. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 2101-2111, 1997.
- ZIELKE N., QUERINGS S., ROTTIG C., LEHNER C., SPRENGER F. The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) is required for rereplication control in endoreplication cycles. **Genes & Development**, v. 22, p. 1690-1703, 2008.

CAPÍTULO 1

RECOMBINAÇÃO E PSEUDO-RECOMBINAÇÃO ATUANDO NA EVOLUÇÃO DO *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) E *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV): DOIS COMPONENTES A RECOMBINANTES DIVIDINDO O MESMO COMPONENTE B

Silva, F.N., Lima, A.T.M., Rocha, C.S., Alves-Júnior, M. & Zerbini, F.M. Recombination and pseudorecombination driving the evolution of *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) and *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV): Two recombinant DNA-A components sharing the same DNA-B. *Virology Journal*, *in preparation*.

1 **Recombination and pseudorecombination driving the evolution of *Tomato severe***
2 ***rugose virus* (ToSRV) and *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV): Two**
3 **recombinant DNA-A components sharing the same DNA-B**

4
5 Fabio N. Silva^{a1}, Alison T.M. Lima^{a1}, Carolina S. Rocha^a, Miguel Alves-Júnior^{ab} & F.
6 Murilo Zerbini^{a*}

7
8 ^aDepartamento de Fitopatologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa,
9 MG, Brazil, 36570-000

10 *Corresponding author: Francisco Murilo Zerbini

11 Phone: (+55-31) 3899-2935; Fax: (+55-31) 3899-2240; E-mail: zerbini@ufv.br

12
13 Running title: Recombination and pseudorecombination between two begomoviruses in
14 Brazil

15
16 ^bCurrent address: Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Pará,
17 Altamira, PA, Brazil, 68372-040

18 ¹These authors contributed equally to this work.

1 **Abstract**

2 Begomoviruses are dicot-infecting, whitefly-transmitted viruses with a genome
3 comprised of one or two molecules of circular, single-stranded DNA. In Brazil, tomato-
4 infecting begomoviruses have emerged as serious pathogens in recent years due to the
5 introduction of a new biotype of the insect vector. *Tomato rugose mosaic virus*
6 (ToRMV) and *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) are often found in tomato fields.
7 The complete sequence of the DNA-B components of ToSRV and ToRMV show an
8 identity of 98.2%. Additionally, the high nucleotide identity (96.2%) between their
9 common regions indicates that these two viruses may share the same DNA-B. The
10 objective of this study was to assess the formation of viable pseudorecombinants
11 between ToRMV and ToSRV, and to study how recombination and
12 pseudorecombination modulated the evolution of these two begomoviruses. The results
13 presented here indicate that these two viruses share the same DNA-B and demonstrate
14 the importance of recombination and pseudorecombination for evolution and adaptation
15 of begomoviruses in Brazil.

16
17 Additional keywords: evolution; geminivirus; begomovirus; tomato.

Introduction

The genus *Begomovirus* (family *Geminiviridae*) contains viruses with a genome comprised of circular, single-stranded DNA, transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) to dicot plant species [1]. New World begomoviruses have bipartite genomes consisting of two ssDNA components named DNA-A and DNA-B, each with approximately 2600 nucleotides (nt). These components share a common region (CR) of approximately 200 nt with high sequence identity (>85%) [2]. The DNA-A encodes viral proteins associated with replication, control of gene expression, suppression of host defense responses and encapsidation, whereas the DNA-B encodes proteins associated with intra- and intercellular movement [3].

The CR includes the origin of replication as well as conserved sequences that are recognized by the Rep protein [4, 5]. Recognition by Rep is considered to be virus-specific [6], so that Rep only initiates replication of cognate DNA components. However, in some cases the Rep protein encoded by a given DNA-A will recognize the DNA-B of a different virus, a phenomenon known as pseudorecombination [3]. Pseudorecombinants are usually formed with DNA components from strains of the same viral species [7, 8], although, more rarely, they can also be formed with components from different species [9, 10].

The viability of a pseudorecombinant is, at least partially, a function of the conservation of the high affinity binding sites for the Rep protein. For most begomoviruses these binding sites include two direct repeats and one inverted repeat known as iterons [6]. DNA components with identical iterons will usually form viable pseudorecombinants, whereas those with different iterons will not [11, 12]. However, in both cases there are exceptions [9, 13], indicating that other, less understood factors also play a role in pseudorecombinant formation. The Rep protein of begomoviruses has

1 specificity determinants known as "SPDs", which confer specificity to the recognition
2 of iterons [12]. Mutation or deletion of SPDs located adjacent to motif 1, known as the
3 iteron-related domain (IRD) [14], eliminates the ability of the Rep protein to bind DNA
4 in a sequence-specific manner [15, 16].

5 Genetic exchanges through recombination allow for a rapid evolution of plant
6 viruses, in many cases promoting changes in virulence or host range [17]. The role of
7 recombination in the emergence and establishment of novel, better adapted
8 begomoviruses is well established [18-23]. In Spain, a recombinant between *Tomato*
9 *yellow leaf curl virus* (TYLCV) and *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV)
10 displayed a wider host range compared to both parental viruses, and became established
11 in the field [19]. In Uganda, a recombinant between *African cassava mosaic virus*
12 (ACMV) and *East African cassava mosaic virus* (EACMV) displayed increased
13 virulence and aggressiveness, and was single-handedly responsible for devastating
14 epidemics of cassava mosaic disease during the 1990's [22, 23].

15 The combined effect of pseudorecombination and recombination in the
16 emergence of novel begomoviruses was nicely demonstrated by the work of Hou &
17 Gilbertson [24]. Working with *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV) and *Tomato mottle*
18 *virus* (ToMoV), the authors showed that, after five consecutive passages in *Nicotiana*
19 *benthamiana*, a pseudorecombinant with ToMoV-A and BDMV-B underwent a
20 recombination event in which part of the ToMoV-A CR was transferred to BDMV-B.
21 This resulted in an increase in the titer of the DNA-B and in the induction of more
22 severe symptoms by the pseudorecombinant.

23 The incidence and severity of begomovirus epidemics in tomatoes has greatly
24 increased in Brazil since the mid-1990's, following the introduction and dissemination
25 of the B biotype of *B. tabaci* [25]. The initial characterization of begomoviruses

1 associated with these epidemics indicated a high degree of genetic diversity [26, 27].
2 Several new species have been described, including *Tomato rugose mosaic virus*
3 (ToRMV) [28], *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) [29] and *Tomato yellow spot*
4 *virus* (ToYSV) [30]. Surveys conducted over the past four years [31-33] indicated that
5 certain species have become prevalent in different regions of the country. Nevertheless,
6 three new begomoviruses have been recently reported in tomato [34], indicating that
7 new species continue to emerge. Mixed infections, a pre-requisite for the occurrence of
8 recombination and pseudorecombination events, are common in the field [31, 33].

9 ToRMV and *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) are often found in tomato
10 fields in Southeastern Brazil. The complete DNA-B sequences of ToRMV (GenBank
11 access number AF291705) and ToSRV (DQ207749) show an identity of 98.2%,
12 suggesting that the two viruses may share the same DNA-B. Additionally,
13 recombination analysis indicated that part of the common region and most of the gene
14 encoding the Rep protein were transferred from ToSRV to ToRMV [29].

15 The results presented here indicate that ToRMV and ToSRV isolates are capable
16 of forming viable pseudorecombinants in their natural host, tomato (*Solanum*
17 *lycopersicum*). Symptom severity was equivalent in single or mixed infections,
18 indicating that synergism does not occur between these two viruses. However, ToRMV
19 components were preferential replicated over ToSRV. These results further highlight
20 the importance of recombination and pseudorecombination in the emergence and
21 adaptation of begomoviruses, and lead us to the following question: To what extent
22 should a recombinant be considered a new species?

23
24
25

Material and Methods

Viral isolates and plant material

Infectious clones of the viral isolates ToRMV-[BR:Ub1:96] [28] and ToSRV-[BR:PG1:Pep:03] [35] were used in the experiments. Tomato (*S. lycopersicum* cv. 'Santa Clara') seedlings were biolistically inoculated [36] using 2 µg of each genomic component (DNA-A and DNA-B) in every possible combination of single or mixed infection. Inoculated plants were kept in a greenhouse with average daily temperatures of $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Confirmation of viral infection and formation of viable pseudorecombinants

Inoculated plants were evaluated for symptom expression for up to 35 days post-inoculation (dpi). DNA from all plants was extracted at 28 dpi as described [37] and the presence of each viral genomic component was examined by rolling circle amplification (RCA) [38], followed by digestion with component specific restriction enzymes: *Xho* I and *Bgl* II to detect ToRMV-A and -B, respectively; *Hind* III and *Bgl* II + *Sac* II to detect ToSRV-A and -B, respectively.

Phylogenetic analysis

The complete DNA-A sequences of ToRMV and ToSRV, plus sequences of 40 additional begomoviruses, were aligned using EMBOSS pairwise alignment algorithms (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/index.html>) and the Muscle option of multiple sequence comparisons (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/>). The alignments were visually inspected and adjusted using MEGA 4.0 [39].

Phylogenetic trees were constructed using Bayesian analysis performed with MrBayes 3.0b4 [40], with the model selected by MrModeltest 2.2 [41] in the Akaike Information Criterion (AIC) (GTR+I+G). Phylogenetic trees for each ORF were constructed using the same models indicated above. Two independent analysis were

1 carried out, each running 10,000,000 generations and excluding the first 1,000,000
2 generations as burn in. Trees were visualized using the TreeView program [42]. The
3 monopartite begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV, DQ358913) was used
4 as an outgroup.

5 *Sequence comparisons and recombination analysis*

6 Complete genomes, individual coding regions and the CRs of ToRMV and
7 ToSRV were compared using EMBOSS pairwise alignment algorithms, using the
8 EMBOSS needle (Global) with default settings. Seventeen New World begomovirus
9 DNA components (Table 1) that occur in weeds and tomato plants in Brazil were
10 aligned for analysis of recombination events involving ToRMV and ToSRV, using
11 RDP3 [43]. Recombination events detected by at least four of the analysis methods
12 available in the program were considered reliable. Alignments were scanned using
13 default settings for each analysis method using a Bonferroni-corrected *P* value cutoff of
14 0.05.

15 **Results**

16 *Latent period, symptoms and infectivity of the different combinations between ToSRV* 17 *and ToRMV DNA-A and DNA-B*

18 Symptoms in tomato plants inoculated with the different combinations of
19 ToRMV and ToSRV DNA-A and DNA-B first appeared at 14 dpi (Table 2), and
20 consisted of a typical mosaic in all combinations (Figure 1). In plants inoculated with
21 ToYSV (positive control) the first symptoms appeared at 10 dpi (Table 2), and included
22 yellow mosaic, yellow spots and leaf distortion (Figure 1). The presence of each
23 inoculated DNA component was verified by RCA followed by digestion with
24 component-specific enzymes (Table 2 and Supplementary Figure S1). In single
25 infections, infectivity of the two homologous combinations was 100%.

1 Pseudorecombinants were formed in both possible combinations with high infectivity
2 (100% and 86%). Interestingly, when two DNA-A or two DNA-B components were
3 inoculated simultaneously, the ToRMV component was detected preferentially in
4 relation to the ToSRV component (Table 2, underlined values). This was true even in
5 the two cases in which ToSRV-A and -B were inoculated with either ToRMV-A or -B,
6 indicating that the Rep protein encoded by ToSRV may have a higher affinity for the
7 ToRMV binding sites (Figure 4). Moreover, when all four components were inoculated,
8 the two ToRMV components were detected in 100% of the plants, but the ToSRV
9 components were detected in only 14% of the plants, thus suggesting a strong
10 preferential replication of ToRMV over ToSRV. These results are striking, considering
11 the extremely high identity between the DNA-B components of ToRMV and ToSRV,
12 including the CR (which have identical iterons) (Table 3 and Figure 2A).

13 Together, these results indicate that ToSRV and ToRMV form viable
14 pseudorecombinants in tomato plants and that synergism does not occur between these
15 two viruses. Quite the contrary, ToRMV exerts an indirect negative interference over
16 ToSRV, although ToSRV can replicate and induce symptoms as efficiently as ToRMV
17 in a single infection.

18 *Nucleotide and deduced amino acid sequence comparisons*

19 In an attempt to identify genomic differences that may explain the negative
20 interference of ToRMV over ToSRV, comparisons of their complete genomes and of
21 each encoded protein were carried out. The CRs of the two viruses show sequence
22 identities ranging from 95% (ToSRV-A vs. ToRMV-B, and ToSRV-B vs. ToRMV-A)
23 to 97.5% (ToSRV-A vs. -B), with identical iterons (Figure 2A). Alignment of the four
24 CRs indicated nine positions with nucleotide sequence divergence (Figure 2A). At
25 divergent positions 1, 5 and 6, the sequence is conserved between the cognate DNA

1 components of ToRMV and ToSRV. At other positions one component differs from the
2 other three: ToRMV-A at positions 4 and 7, ToRMV-B at positions 3 and 8, ToSRV-A
3 at position 2, and ToSRV-B at position 9 (Figure 2A).

4 The comparison of nucleotide and amino acid sequences of the Rep ORF
5 indicates identities of 95.3% and 93.5%, respectively (Table 3). This was expected since
6 the region involved in the recombination event comprises practically the entire Rep ORF.
7 The domains associated with sequence-specific recognition of the origin of replication,
8 named "iteron-related domain" (IRD) [14], "Motif 1", "Motif 2" and specificity
9 determinants (SPDs) [44], conserved in rolling-circle replication-initiator proteins
10 including geminivirus Rep proteins, are shown in Figure 2B. ToRMV has four amino
11 acid changes compared with ToSRV. Two changes are in the IRD (Pro → Thr and Lys
12 → Arg).

13 *Phylogenetic analysis*

14 Phylogenetic analysis based on DNA-A nt sequences clusters begomoviruses primarily
15 according to geographical region (Figure 3). ToSRV, ToRMV and ToCMoV were
16 placed in the same branch, with *a posteriori* probability of 0.85, indicating a close
17 phylogenetic relationship between these three viruses. The phylogenetic tree based on
18 DNA-B nt sequences supports the high sequence identity between ToRMV and ToSRV
19 DNA-B. The identical lengths of the ToRMV and ToSRV branches in the DNA-B tree
20 (Figure 3) indicates little divergence in their nucleotide sequences, suggesting that the
21 capture of the ToSRV DNA-B by ToRMV is a recent event. Comparison of the
22 phylogenetic trees based on the CP and Rep nt sequences shows topological
23 incongruence among the three viruses, suggesting the occurrence of recombination:
24 ToRMV grouped with ToCMoV in the CP tree, but with ToSRV in the Rep tree (Figure

1 3). Topological incongruence involving other begomoviruses in Brazil was also
2 observed, but is not detailed in this work.

3 *Recombination analysis*

4 To further investigate the occurrence of recombination events involving ToSRV
5 and ToRMV, recombination analysis was carried out using the RDP3 package. Besides
6 ToRMV and ToSRV, the analysis included fifteen viruses that occur in weeds and
7 tomato plants in Brazil. The selection of these viruses was based on their host ranges
8 and geographical location, so that only viruses with at least one known common host
9 were included.

10 A recombination event involving ToSRV and ToRMV previously proposed by
11 Ribeiro *et al.* [29] was confirmed by all detection methods contained in the RDP3
12 package (P -values: rdp = 9.41×10^{-15} , Geneconv = 5.32×10^{-25} , Bootscan = 7.85×10^{-29} ,
13 maximum χ^2 = 3.36×10^{-21} , Chimaera = 1.45×10^{-13} , Sister scan = 3.13×10^{-39} and 3Seq
14 = 7.04×10^{-3}). The transferred region comprises practically the entire Rep ORF as well
15 as part of the CR including the TATA box, G-box, the conserved nonanucleotide
16 (TAATATTAC) and the iterons (Figure 4). As previously reported [45], a recombinant
17 event was also detected in which ToCMoV received a fragment of ToRMV DNA-A
18 comprising the entire CP and Ren ORFs, as well as most of the Trap ORF. This event
19 was also detected by all detection methods (P -values: rdp = 6.17×10^{-44} , Geneconv =
20 1.82×10^{-40} , Bootscan = 3.63×10^{-43} , maximum χ^2 = 6.38×10^{-32} , Chimaera = $1.99 \times$
21 10^{33} , Sister scan = 6.69×10^{-40} and 3Seq = 3.61×10^{-54}).

22

23

Discussion

24

25

Here, we report the formation of pseudorecombinants between two distinct,
albeit closely related, begomoviruses. The reciprocal pseudorecombinants ToRMV-A +

1 ToSRV-B and ToRMV-B + ToSRV-A were both viable. Their viability is most likely
2 due to the high sequence identity of their CRs and Rep proteins, and well as to the
3 identical sequences of their iterons (GGTAG). The latent period and symptoms were the
4 same in all combinations compared to the parental viruses, which is not surprising since
5 the severity of symptoms is associated with the DNA-B, and these are almost identical
6 between the two viruses.

7 When ToSRV and ToRMV were co-inoculated, mosaic symptoms identical to
8 those induced by each virus alone appeared at 14 dpi (Figure 1 and Table 2). This
9 suggests that synergism does not occur between these two viruses. On the contrary,
10 ToRMV has an indirect negative interference over ToSRV. In most cases in which three
11 or four DNA components were inoculated, the ToRMV component replicated
12 preferentially in relation to the ToSRV component. Negative interference exerted by
13 ToRMV in mixed infection with ToYSV has already been reported [46]. Early in
14 infection ToRMV negatively affects the accumulation of ToYSV, but when the
15 infection is established the negative interference ceases. Interestingly, although ToRMV
16 negatively affects ToSRV, ToSRV behaves similarly to ToRMV in a single infection,
17 both in terms of latent period and symptoms.

18 In an attempt to identify genomic differences that could explain the preferential
19 replication of ToRMV over ToSRV, comparisons of their complete genomes and of
20 each encoded protein were carried out (Table 3 and Figure 2). Begomovirus iterons are
21 composed of an invariable GG sequence followed by three nucleotides identified as N1,
22 N2 and N3, which vary for each virus. The virus-specific recognition domain of the Rep
23 protein maps to its N-terminal region [47, 48] and includes the conserved motif 1 of
24 rolling-circle replication-initiator proteins [49]. The IRD sequence is conserved among
25 begomoviruses with identical iterons, but varies among species with different iteron

1 sequences. Predicted nt-aa pairing would occur between N1 and the eighth aa of the
2 IRD, N2 with the sixth IRD aa, and N3 with the first or third IRD aa, depending on the
3 iteron sequence [14].

4 Although ToRMV and ToSRV have the same iterons, their IRDs are different at
5 positions 2 and 3. The change of lysine to arginine at IRD position 3, which pairs with
6 N3, should not promote major changes in the protein, since the two amino acids have
7 similar properties. Therefore, it is reasonable to assume that this difference is not
8 responsible for the preferential replication of ToRMV over ToSRV. In fact, this change
9 does not affect iteron recognition, since the two Rep proteins have the ability to
10 replicate viral DNA. This is observed when any combination of one DNA-A and one
11 DNA-B component (cognate or pseudorecombinant) is inoculated: both components are
12 always detected (Table 2).

13 Additional analysis revealed small differences between ToRMV and ToSRV in
14 the CR and in the Rep protein. In the CR, nine nucleotide change occur among the four
15 components, with ToRMV having the largest number of modifications compared to
16 ToSRV.

17 However unlikely, we can not exclude the possibility that these slight changes in
18 the CR, as well as changes in IRD aa 2 and 3, have enabled the ToRMV Rep protein to
19 recognize the iteron sequence GGTAG with higher affinity compared to ToSRV. These
20 same differences could cause the ToSRV Rep protein to replicate the DNA-A and -B of
21 ToRMV preferentially. More likely is that the combination of minor changes in both
22 Rep and CR may be involved in the preferential replication of ToRMV components. A
23 detailed mutagenesis analysis of the IRD region and of the iterons of ToRMV and
24 ToSRV would be required to confirm these hypotheses.

1 Interestingly, ToSRV is more prevalent in the field compared to ToRMV [33].
2 This could be due to differences in transmission by the insect vector, since the coat
3 protein, which is considerably distinct between the two viruses, is the major viral
4 determinant of insect transmission.

5 The detection of a recombination event involving the DNA-A of the two viruses
6 was not surprising, since it is well established that begomoviruses are recombination-
7 prone. This recombination event between ToSRV and ToRMV was detected by Ribeiro
8 *et al.* [29], who proposed that ToRMV would be a recombinant between ToCMoV and
9 ToSRV.

10 The region involved in the recombination event is an important aspect in the
11 maintenance and adaptation of the recombinant virus in the population. It is known that
12 the begomovirus genome has a number of recombination hot spots, including the CR,
13 the CP/Ren interface and the 3' region of the Rep gene, while the remaining coding
14 regions are recombination cold spots [50, 51]. The breakpoints of the recombination
15 event involving ToSRV and ToRMV map to two hotspots, the CR and to the 3' region
16 of the Rep gene, near the interface with Trap.

17 Recombination in coding regions probably occurs due to the conflict between
18 the machineries of transcription and replication [51, 52]. Lefeuvre *et al.* [53] suggest
19 that selection apparently disfavors recombinants with breakpoints in coding regions, and
20 suggest that the probability of such a recombinant to remain in the population is
21 dependent on the specific position of the breakpoint: the peripheries of coding regions
22 tend to be more favorable to recombination than central regions.

23 Recombination events involving DNA-A components are considered the main
24 source of molecular variation of begomoviruses and may result in a gain of virulence
25 [54, 55]. However, predicting the epidemiological outcome of a recombination event is

1 not a straightforward task. For example, van der Walt *et al.* [21] demonstrated that a
2 recombinant between different MSV isolates increased the severity of symptoms in
3 maize, indicating greater adaptation of the recombinant. On the other hand, Davino *et*
4 *al.* [18] demonstrated that a recombinant between TYLCV and TYLCSV coexists with
5 the parental viruses and has a lower replicative capacity, a fact that might help to
6 explain why plants infected only by the recombinant have not been found. In the case of
7 recombinant ToRMV, there was an adaptive advantage over the parental ToSRV
8 (reflected in the negative interference of ToRMV over ToSRV), but nevertheless
9 ToSRV is more prevalent in the field compared to ToRMV. We suggest that ToSRV is
10 maintained in nature by infecting plants in the absence of ToRMV. If the occurrence of
11 mixed infection between ToRMV and ToSRV was frequent, ToRMV would be the
12 prevalent virus. However, the role of the insect vector in disseminating each virus in
13 nature must be assessed in order to confirm this hypothesis.

14 Another interesting aspect is that the two DNA-B components are almost
15 identical (98.2% identity). This supports the hypothesis that, following the transfer of
16 practically the entire Rep ORF as well as part of the CR from ToSRV to ToRMV,
17 ToRMV captured the DNA-B of ToSRV. According to the criteria established by the
18 ICTV, a begomovirus is considered to represent a new species when its DNA-A
19 sequence is less than 89% identical to that of other begomoviruses [56]. ToSRV and
20 ToRMV have nucleotide sequence identity of the DNA-A of 86.3%, which clearly
21 separates them as members of different species based on this criterion. However, these
22 two viruses are very similar in terms of biological and molecular properties, leading us
23 to the following question: to what extent can a recombinant be considered a new species?
24 The features that make ToSRV and ToRMV very closely related include: (i) high
25 sequence identity of the CR and the Rep coding region; (ii) nearly identical Rep binding

1 sites in the CR, with identical iterons; (iii) the same DNA-B; and (iv) induction of
2 similar symptoms in tomato, with the same latent period.

3 The fact that begomovirus taxonomy ignores the DNA-B was addressed by
4 Briddon *et al.* [2], who performed a hypothetical taxonomy based on the DNA-B
5 sequence alone. The authors show that 85% of the sequences analyzed remain unaltered
6 in their classification based on the DNA-A, providing good support for a taxonomy
7 based only on the DNA-A. However, in specific cases such as the one presented here,
8 the criterion based on the DNA-A could be less restrictive and/or the DNA-B could be
9 considered in the analysis for species assignment. We thus propose that ToRMV and
10 ToSRV should be considered to be members of the same viral species, named ToRMV
11 since this virus was the one first characterized.

12 In summary, the recombination analysis together with the formation of viable
13 pseudorecombinants between ToSRV and ToRMV support the hypothesis that ToRMV
14 captured the DNA-B of ToSRV after acquiring the DNA-A region that includes the Rep
15 ORF and the CR. Therefore, the emergence of ToRMV involves both recombination
16 and pseudorecombination events with ToSRV.

17

18

19

20

References

1. Stanley J, Bisaro DM, Briddon RW, Brown JK, Fauquet CM, Harrison BD, Rybicki EP, Stenger DC: **Family Geminiviridae**. In *Virus Taxonomy Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Edited by Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005: 301-326
2. Briddon RW, Patil BL, Bagewadi B, Nawaz-ul-Rehman MS, Fauquet CM: **Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses**. *BMC Evolutionary Biology* 2010, **10**.
3. Rojas MR, Hagen C, Lucas WJ, Gilbertson RL: **Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses**. *Annual Review of Phytopathology* 2005, **43**:361-394.
4. Fontes EPB, Eagle PA, Sipe PS, Luckow VA, Hanley-Bowdoin L: **Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication**. *Journal of Biological Chemistry* 1994, **269**:8459-8465.
5. Chatterji A, Padidam M, Beachy RN, Fauquet CM: **Identification of replication specificity determinants in two strains of tomato leaf curl virus from New Delhi**. *Journal of Virology* 1999, **73**:5481-5489.
6. Arguello-Astorga G, Herrera-Estrella L, Rivera-Bustamante R: **Experimental and theoretical definition of geminivirus origin of replication**. *Plant Molecular Biology* 1994, **26**:553-556.
7. Pita JS, Fondong VN, Sangare A, Otim-Nape GW, Ogwal S, Fauquet CM: **Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda**. *Journal of General Virology* 2001, **82**:655-665.
8. Faria JC, Gilbertson RL, Hanson SF, Morales FJ, Ahlquist PG, Loniello AO, Maxwell DP: **Bean golden mosaic geminivirus type II isolates from the Dominican Republic and Guatemala: Nucleotide sequences, infectious pseudorecombinants, and phylogenetic relationships**. *Phytopathology* 1994, **84**:321-329.
9. Andrade EC, Manhani GG, Alfenas PF, Calegario RF, Fontes EPB, Zerbini FM: **Tomato yellow spot virus, a tomato-infecting begomovirus from Brazil with a closer relationship to viruses from *Sida* sp., forms pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from *Sida***. *Journal of General Virology* 2006, **87**:3687-3696.
10. Gilbertson RL, Hidayat SH, Paplomatas EJ, Rojas MR, Hou Y-H, Maxwell DP: **Pseudorecombination between infectious cloned DNA components of tomato mottle and bean dwarf mosaic geminiviruses**. *Journal of General Virology* 1993, **74**:23-31.
11. Bull SE, Briddon RW, Sserubombwe WS, Ngugi K, Markham PG, Stanley J: **Infectivity, pseudorecombination and mutagenesis of Kenyan cassava mosaic begomoviruses**. *Journal of General Virology* 2007, **88**:1624-1633.
12. Ramos PL, Guevara-Gonzalez RG, Peral R, Ascencio-Ibanez JT, Polston JE, Arguello-Astorga GR, Vega-Arreguin JC, Rivera-Bustamante RF: **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* 2003, **148**:1697-1712.

13. Chakraborty S, Vanitharani R, Chattopadhyay B, Fauquet CM: **Supervirulent pseudorecombination and asymmetric synergism between genomic components of two distinct species of begomovirus associated with severe tomato leaf curl disease in India.** *Journal of General Virology* 2008, **89**:818-828.
14. Arguello-Astorga GR, 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* 2001, **146**:1465-1485.
15. Orozco BM, 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* 1998, **273**:24448-24456.
16. Orozco BM, Miller AB, Settlege SB, Hanley-Bowdoin L: **Functional domains of a geminivirus replication protein.** *Journal of Biological Chemistry* 1997, **272**:9840-9846.
17. Garcia-Arenal F, Fraile A, Malpica JM: **Variability and genetic structure of plant virus populations.** *Annual Review of Phytopathology* 2001, **39**:157-186.
18. Davino S, Napoli C, Dellacroce C, Miozzi L, Noris E, Davino M, Accotto GP: **Two new natural begomovirus recombinants associated with the tomato yellow leaf curl disease co-exist with parental viruses in tomato epidemics in Italy.** *Virus Research* 2009, **143**:15-23.
19. 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* 2002, **303**:317-326.
20. Patil BL, Fauquet CM: **Cassava mosaic geminiviruses: actual knowledge and perspectives.** *Molecular Plant Pathology* 2009, **10**:685-701.
21. van der Walt E, Rybicki EP, Varsani A, Polston JE, Billharz R, Donaldson L, Monjane AL, Martin DP: **Rapid host adaptation by extensive recombination.** *Journal of General Virology* 2009, **90**:734-746.
22. Harrison BD, Zhou X, Otim Nape GW, Liu Y, Robinson DJ: **Role of a novel type of double infection in the geminivirus-induced epidemic of severe cassava mosaic in Uganda.** *Annals of Applied Biology* 1997, **131**:437-448.
23. Zhou X, Liu Y, Calvert L, Munoz C, Otim-Nape GW, Robinson DJ, Harrison BD: **Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination.** *Journal of General Virology* 1997, **78**:2101-2111.
24. Hou YM, Gilbertson RL: **Increased pathogenicity in a pseudorecombinant bipartite geminivirus correlates with intermolecular recombination.** *Journal of Virology* 1996, **70**:5430-5436.
25. Zerbini FM, Andrade EC, Barros DR, Ferreira SS, Lima ATM, Alfenas PF, Mello RN: **Traditional and novel strategies for geminivirus management in Brazil.** *Australasian Plant Pathology* 2005, **34**:475-480.
26. Ambrozevicus LP, Calegario RF, Fontes EPB, Carvalho MG, Zerbini FM: **Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil.** *Fitopatologia Brasileira* 2002, **27**:372-377.
27. Ribeiro SG, Ambrozevicus LP, Ávila AC, Bezerra IC, Calegario RF, Fernandes JJ, Lima MF, Mello RN, Rocha H, Zerbini FM: **Distribution and genetic**

- diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil.** *Archives of Virology* 2003, **148**:281-295.
28. Fernandes JJ, Carvalho MG, Andrade EC, Brommonschenkel SH, Fontes EPB, Zerbini FM: **Biological and molecular properties of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil.** *Plant Pathology* 2006, **55**:513-522.
 29. Ribeiro SG, Martin DP, Lacorte C, Simões IC, Orlandini DRS, Inoue-Nagata AK: **Molecular and biological characterization of *Tomato chlorotic mottle virus* suggests that recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses.** *Phytopathology* 2007, **97**:702-711.
 30. Calegario RF, Ferreira SS, Andrade EC, Zerbini FM: **Characterization of *Tomato yellow spot virus*, (ToYSV), a novel tomato-infecting begomovirus from Brazil.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 2007, **42**:1335-1343.
 31. Castillo-Urquiza GP, Beserra Junior JEA, Alfenas-Zerbini P, Varsani A, Lima ATM, Barros DR, Zerbini FM: **Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato in Paty do Alferes, Rio de Janeiro state, Brazil.** *Virus Reviews and Research* 2007, **12**:233.
 32. Cotrim MA, Krause-Sakate R, Narita N, Zerbini FM, Pavan MA: **Diversidade genética de begomovirus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista.** *Summa Phytopathologica* 2007, **33**:300-303.
 33. Fernandes FR, Albuquerque LC, Giordano LB, Boiteux LS, Ávila AC, Inoue-Nagata AK: **Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes.** *Virus Genes* 2008, **36**:251-258.
 34. Castillo-Urquiza GP, Beserra Jr. JEA, Bruckner FP, Lima ATM, Varsani A, Alfenas-Zerbini P, Zerbini FM: **Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil.** *Archives of Virology* 2008, **153**:1985-1989.
 35. Bezerra-Agasie IC, Ferreira GB, Ávila AC, Inoue-Nagata AK: **First report of *Tomato severe rugose virus* in chili pepper in Brazil.** *Plant Disease* 2006, **90**.
 36. Aragão FJL, Barros LMG, Brasileiro ACM, Ribeiro SG, Smith FD, Sanford JC, Faria JC, Rech EL: **Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment.** *Theoretical and Applied Genetics* 1996, **93**:142-150.
 37. Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB: **A plant DNA miniprep: Version II.** *Plant Molecular Biology Reporter* 1983, **1**:19-21.
 38. Inoue-Nagata AK, Albuquerque LC, Rocha WB, Nagata T: **A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi 29 DNA polymerase.** *Journal of Virological Methods* 2004, **116**:209-211.
 39. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S: **MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.** *Molecular Biology and Evolution* 2007, **24**:1596-1599.
 40. Ronquist F, Huelsenbeck JP: **MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models.** *Bioinformatics* 2003, **19**:1572-1574.
 41. Nylander JAA: **MrModeltest v2.** In *Program distributed by the author Evolutionary Biology Centre, Uppsala University*; 2004.
 42. Page RDM: **TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers.** *Computer Applications in the Biosciences* 1996, **12**:357-358.

43. Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefevre P: **RDP3: A flexible and fast computer program for analyzing recombination.** *Bioinformatics* 2010, **26**:2462-2463.
44. Londono A, Riego-Ruiz L, Arguello-Astorga GR: **DNA-binding specificity determinants of replication proteins encoded by eukaryotic ssDNA viruses are adjacent to widely separated RCR conserved motifs.** *Archives of Virology* 2010, **155**:1033-1046.
45. Galvão RM, Mariano AC, Luz DF, Alfenas PF, Andrade EC, Zerbini FM, Almeida MR, Fontes EPB: **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* 2003, **84**:715-726.
46. Alves-Junior M, Alfenas-Zerbini P, Andrade EC, Esposito DA, Silva FN, Cruz ACF, Ventrella MC, Otoni WC, Zerbini FM: **Synergism and negative interference during co-infection of tomato and *Nicotiana benthamiana* with two bipartite begomoviruses.** *Virology* 2009, **387**:257-266.
47. Choi IR, Stenger DC: **Strain-specific determinants of beet curly top geminivirus DNA replication.** *Virology* 1995, **206**:904-912.
48. Gladfelter HJ, Eagle PA, Fontes EPB, Batts L, Hanley-Bowdoin L: **Two domains of the AL 1 protein mediate geminivirus origin recognition.** *Virology* 1997, **239**:186-197.
49. Ilyina TV, Koonin EV: **Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes and archaeobacteria.** *Nucleic Acids Research* 1992, **20**:3279-3285.
50. Lefevre P, Lett JM, Reynaud B, Martin DP: **Avoidance of protein fold disruption in natural virus recombinants.** *PLoS Pathogens* 2007, **3**:e181.
51. Lefevre P, Martin DP, Hoareau M, Naze F, Delatte H, Thierry M, Varsani A, Becker N, Reynaud B, Lett JM: **Begomovirus 'melting pot' in the south-west Indian Ocean islands: Molecular diversity and evolution through recombination.** *Journal of General Virology* 2007, **88**:3458-3468.
52. Varsani A, Shepherd DN, Monjane AL, Owor BE, Erdmann JB, Rybicki EP, Peterschmitt M, Briddon RW, Markham PG, Oluwafemi S, et al: **Recombination, decreased host specificity and increased mobility may have driven the emergence of maize streak virus as an agricultural pathogen.** *Journal of General Virology* 2008, **89**:2063-2074.
53. Lefevre P, Lett JM, Varsani A, Martin DP: **Widely conserved recombination patterns among single-stranded DNA viruses.** *Journal of Virology* 2009, **83**:2697-2707.
54. Padidam M, Sawyer S, Fauquet CM: **Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination.** *Virology* 1999, **265**:218-224.
55. Nawaz-UI-Rehman MS, Fauquet CM: **Evolution of geminiviruses and their satellites.** *Febs Letters* 2009, **583**:1825-1832.
56. Fauquet CM, Briddon RW, Brown JK, Moriones E, Stanley J, Zerbini FM, Zhou X: **Geminivirus strain demarcation and nomenclature.** *Archives of Virology* 2008, **153**:783-821.

Table 1. Begomoviruses used in the recombination analysis involving ToRMV and ToSRV.

Virus	GenBank access number (DNA-A)
<i>Bean golden mosaic virus</i> (BGMV)	M88686
<i>Blainvillea yellow spot virus</i> (BIYSV)	EU710756
<i>Cleome leaf crumple virus</i> (CILCrV)	FN435999
<i>Okra mottle virus</i> (OMoV)	EU914817
<i>Sida Brazil virus</i> (SiBV)	FN436001
<i>Sida common mosaic virus</i> (SiCmMV)	EU710751
<i>Sida micrantha mosaic virus</i> (SimMV)	AJ557451
<i>Sida mottle virus</i> (SiMoV)	AY090555
<i>Sida yellow mosaic virus</i> (SiYMV)	AY090558
<i>Tomato golden mosaic virus</i> (TGMV)	K02029
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i> (ToCMV)	AY090557
<i>Tomato leaf distortion virus</i> (ToLDV)	EU710749
<i>Tomato mild mosaic virus</i> (ToMIMV)	EU710752
<i>Tomato rugose mosaic virus</i> (ToRMV)	AF291705
<i>Tomato severe rugose virus</i> (ToSRV)	DQ207749
<i>Tomato yellow spot virus</i> (ToYSV)	DQ336350
<i>Tomato yellow vein streak virus</i> (ToYVSV)	EF417915

Table 2. Infectivity and latent period of pseudorecombinants formed between ToRMV and ToSRV in tomato plants.

Combination	Latent period (days) ^a	Infected/Inoculated (%) ^b				
		ToRMV-A	ToRMV-B	ToSRV-A	ToSRV-B	ToYSV
ToRMV A+B	14	7/7 (100)	7/7 (100)	-	-	-
ToSRV A+B	14	-	-	7/7 (100)	7/7 (100)	-
ToRMV A+ToSRV B	14	7/7 (100)	-	-	7/7 (100)	-
ToRMV B+ToSRV A	14	-	6/7 (86)	6/7 (86)	-	-
ToRMV A+B+ToSRV A	14	6/7 (86)	6/7 (86)	<u>1/7(14)</u>	-	-
ToRMV A+B+ToSRV B	14	7/7 (100)	7/7 (100)	-	<u>0/7 (0)</u>	-
ToRMV A+ToSRV A+B	14	7/7 (100)	-	<u>0/7 (0)</u>	7/7 (100)	-
ToRMV B+ToSRV A+B	14	-	6/7 (86)	6/7 (86)	<u>1/7 (14)</u>	-
ToRMV A+B+ToSRV A+B	14	7/7 (100)	7/7 (100)	<u>1/7 (14)</u>	<u>1/7 (14)</u>	-
ToYSV A+B	10	-	-	-	-	7/7(100)

^a Number of days elapsed between inoculation and the appearance of symptoms.

^b Number of infected plants/number of inoculated plants, verified by visual observation of symptoms and confirmed by RCA following specific restriction enzymes to each DNA component. Underlined values indicate the low detection of ToSRV components when inoculated with ToRMV components.

Table 3. Percent nucleotide and deduced amino acid sequence identities between the full length DNA components and each open reading frame of ToRMV and ToSRV.

Identity	DNA		Open reading frames*						
	A	B	Rep	Trap	Ren	AC4	CP	MP	NSP
Nucleotide	86.3	98.2	95.3	83.1	86.6	97.0	81.1	99.1	98.7
Amino acid	-	-	93.5	77.7	81.2	90.8	90.1	99.0	97.7

* Rep (replication-associated protein); AC4 (function not attributed); Trap (transcriptional activator protein); Ren (Replication enhancer protein); CP (coat protein); MP (movement protein); and NSP (nuclear shuttle protein).

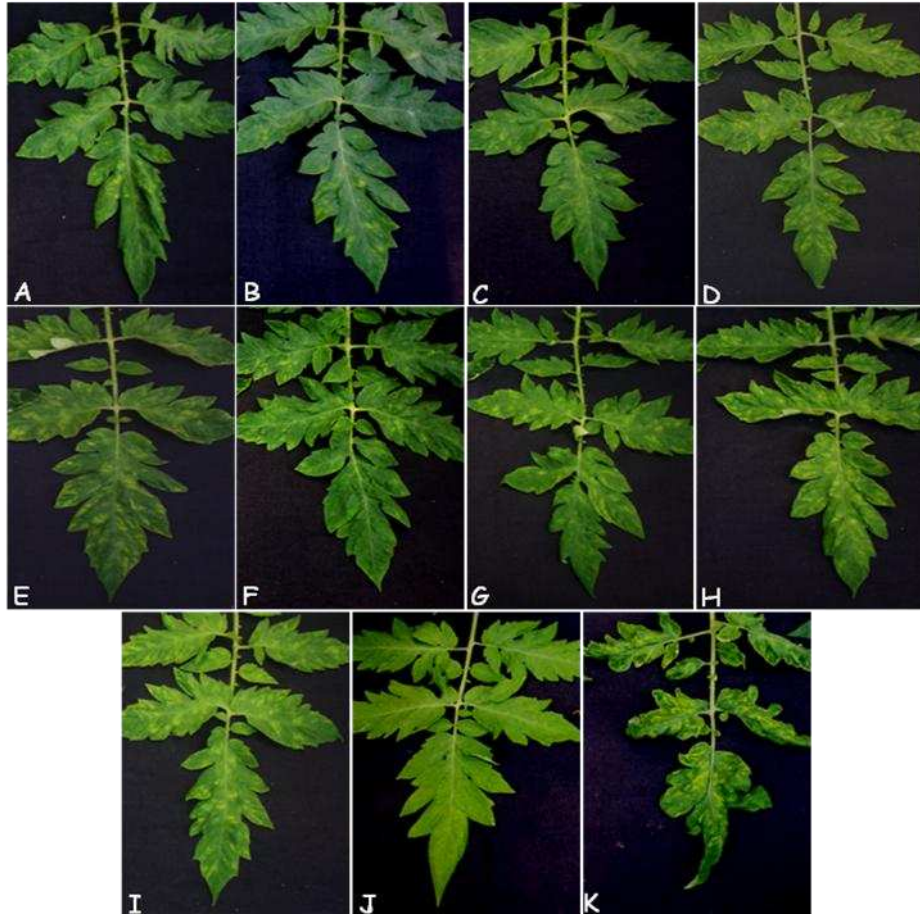


Figure 1. Symptoms induced in *Solanum lycopersicum* ‘Santa Clara’ biolistically inoculated with the infectious clones of the DNA-A and -B of isolates ToRMV-[BR:Ub1:96] and ToSRV-[BR:PG1:Pep:03] in the following combinations: **A.** ToRMV; **B.** ToSRV; **C.** ToRMV + ToSRV; **D.** ToRMV-A + ToSRV-B; **E.** ToRMV-B + ToSRV-A; **F.** ToRMV + ToSRV-A; **G.** ToRMV + ToSRV-B; **H.** ToRMV-A + ToSRV; **I.** ToRMV-B + ToSRV; **J.** mock-inoculated; **K.** ToYSV. All images obtained at 28 dpi.

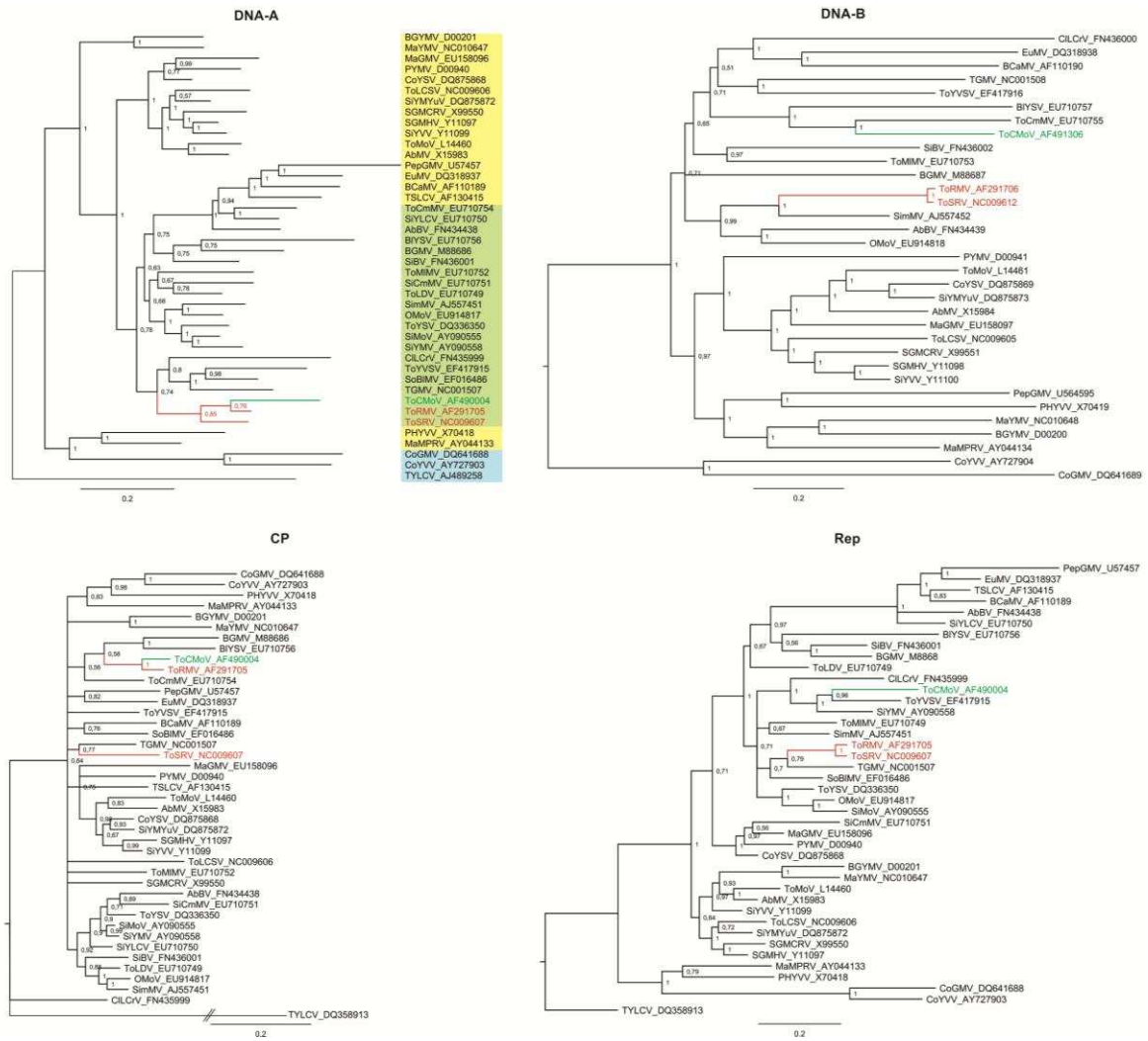
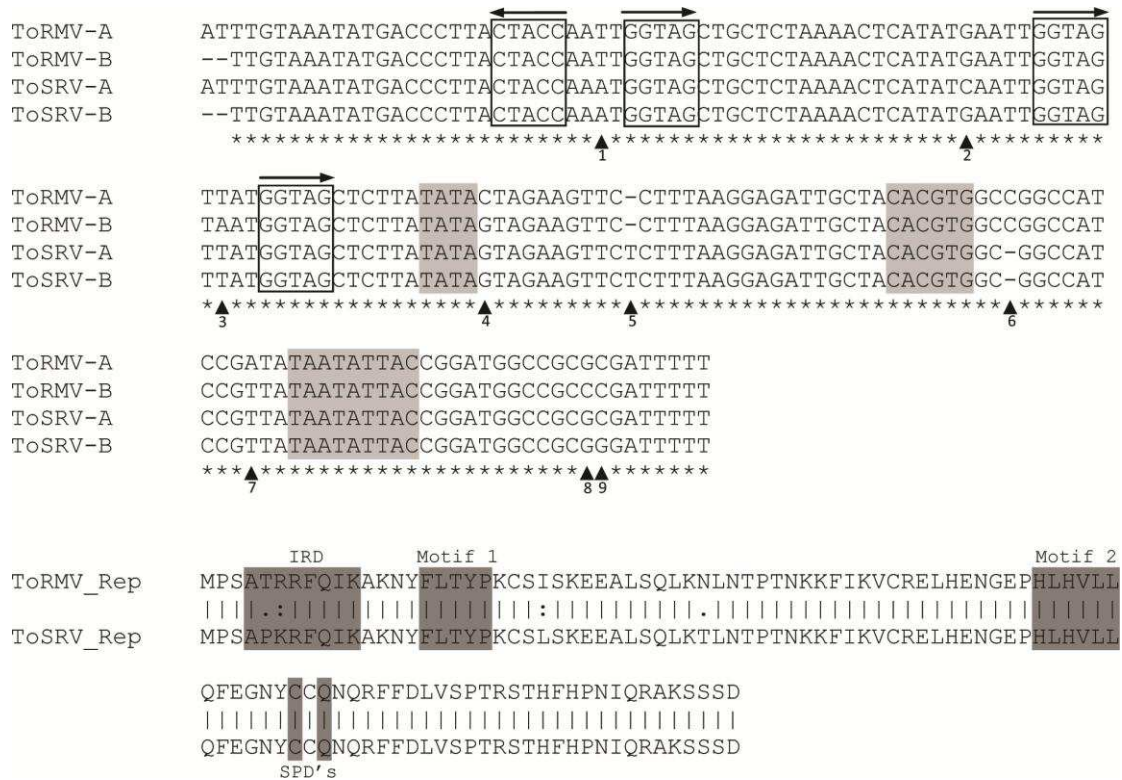


Figure 2. Phylogenetic reconstruction using the Bayesian method. **DNA-A** and **DNA-B** trees are based on the complete nucleotide sequences of the respective component. **CP** and **Rep** trees are based on the nucleotide sequences of the coat protein and replication-associated genes, respectively. The box in DNA-A phylogenetic tree indicates the geographical distribution of different begomoviruses (yellow: Mesoamerica; green: Latin America; blue: "Old World" begomovirus). Numbers on branches indicate posterior probability values. The branches that include ToSRV and ToRMV are indicated in red. ToCMoV is indicated in green.



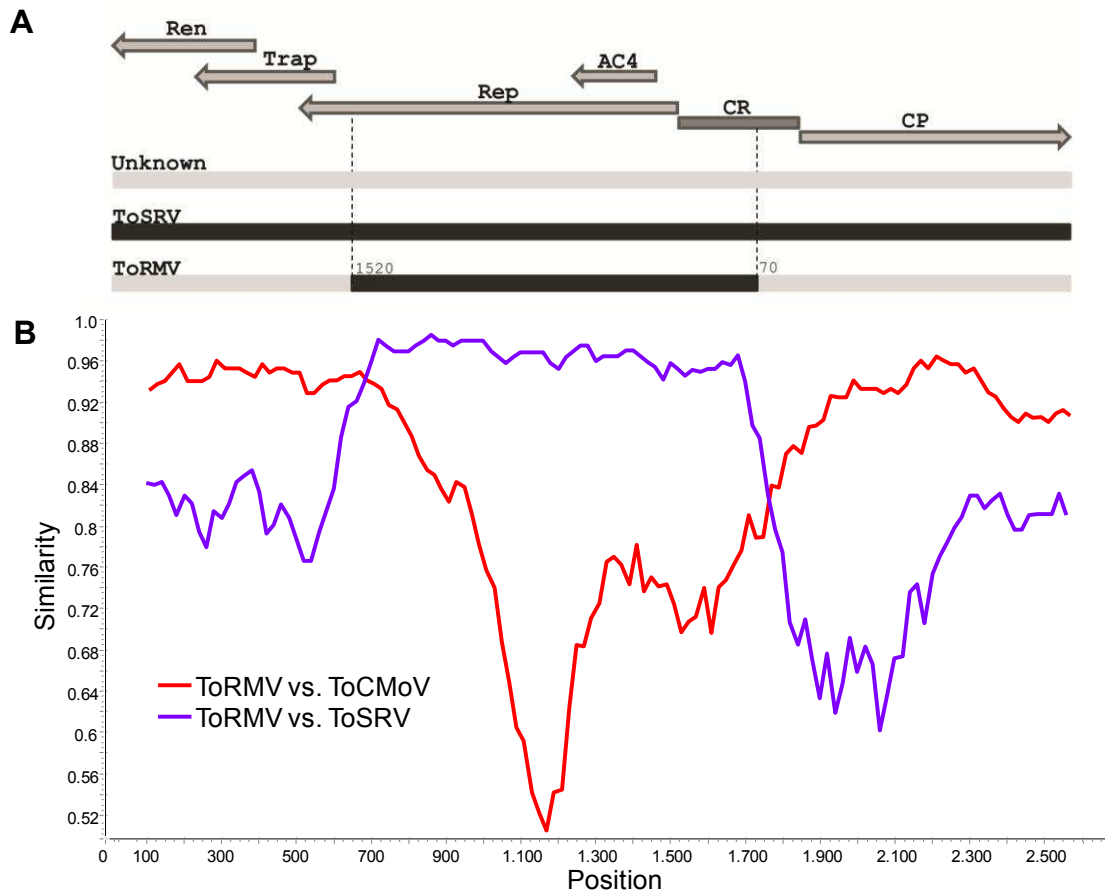
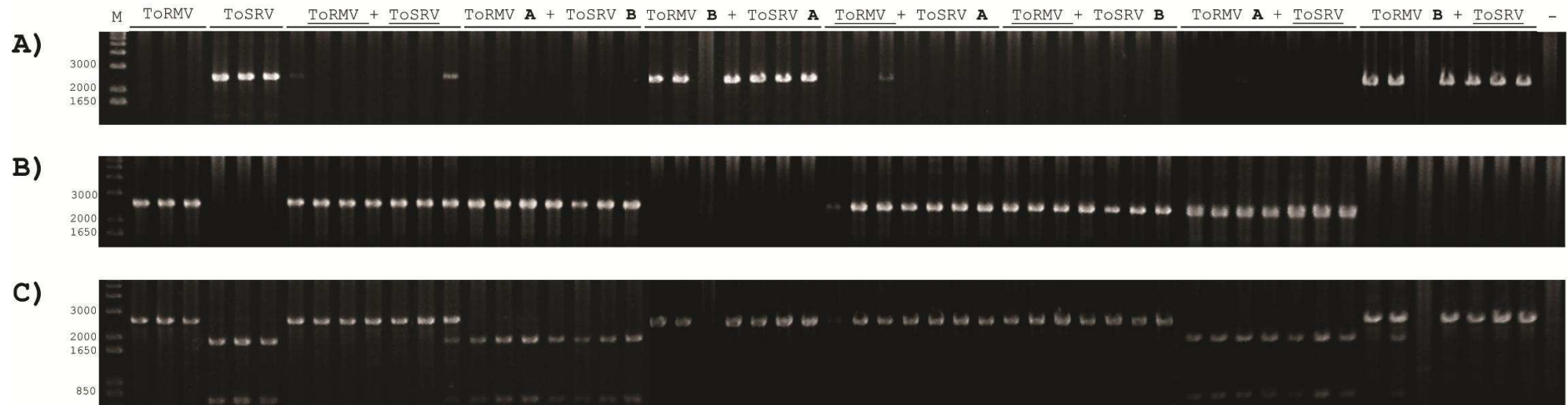


Figure 4. Analysis of putative recombination events involving ToRMV and ToSRV. **A.** Schematic representation of the recombinant region between ToSRV and ToRMV. Arrows indicate coding regions in the complementary (AC4, Rep, Trap and Ren) and viral sense (CP). CR indicates the common region. The dashed line indicates the position of putative breakpoints of the recombinant region. **B.** Similarity plot for ToRMV against ToSRV and ToCMoV along a 200 nt window. The scale in the X-axis corresponds to the viral genome as depicted in (A).



Supplementary Figure 1. Detection by rolling circle amplification followed by restriction digests (RCA-RFLP) of each DNA component from ToRMV-[BR:Ub1:96] and ToSRV-[BR:PG1:Pep:03] after biolistic inoculation of tomato plants. **A.** Digestion with *Hind* III, generating a fragment of approximately 2600 nucleotides (nt) corresponding to ToSRV DNA-A (the other three components are not cleaved by this enzyme). **B.** Digestion with *Xho* I generating a fragment of approximately 2600 nt corresponding to ToRMV DNA-A (the other three components are not cleaved by this enzyme). **C.** Digestion with *Bgl* II + *Sac* II, generating fragments of 1800 and 800 nt corresponding to ToSRV DNA-B, and approximately 2600 nt corresponding to ToRMV DNA-B (the two DNAs-A are not cleaved by these enzymes). Underlined means DNA-A + DNA-B. (-) negative control. M, 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen), in bp.

CAPÍTULO 2

ANÁLISE DA FUNÇÃO DE APC7 E APC10, DOIS COMPONENTES DO COMPLEXO PROMOTOR DE ANÁFASE, NA REPLICAÇÃO DE BEGOMOVÍRUS

Silva, F.N., Bruckner, F.P., Carvalho, T.B., Gonçalves, A.B., Fontes, E.P.B., Hemerly, A., Ferreira, P.C.G., Zerbini, F.M. & Alfenas-Zerbini, P. Investigating the role of APC7 and APC10, two components of the Anaphase Promoting Complex, in begomovirus replication. *Journal of Virology*, *in preparation*.

1 **Investigating the role of APC7 and APC10, two components of the Anaphase**
2 **Promoting Complex, in begomovirus replication**

3
4 Fabio N. Silva^a, Fernanda P. Bruckner^b, T.B. Carvalho^c, Amanda B. Gonçalves^a,
5 Elizabeth P.B. Fontes^d, Adriana Hemerly^c, Paulo C.G. Ferreira^c, F. Murilo Zerbini^{a*} &
6 Poliane Alfenas-Zerbini^{b*}

7
8 ^aDepartamento de Fitopatologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa,
9 MG, Brazil, 36570-000

10 ^bDepartamento de Microbiologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa,
11 MG, Brazil, 36570-000

12 ^cInstituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de
13 Janeiro, RJ, Brazil, 21941-590

14 ^dDepartamento de Bioquímica e Biologia Molecular/BIOAGRO, Universidade Federal
15 de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil, 36570-000

16
17 *Corresponding author: Francisco Murilo Zerbini

18 Phone: (+55-31) 3899-2935; Fax: (+55-31) 3899-2240; E-mail: zerbini@ufv.br

19 *Corresponding author: Poliane Alfenas-Zerbini

20 Phone: (+55-31) 3899-2955; Fax: (+55-31) 3899-2864; E-mail: palfenas@ufv.br

21
22
23 Running title: APC7 and APC10 in begomovirus replication

24

1 **Abstract**

2 The Anaphase Promoting Complex (APC) is a multi-subunit ubiquitination complex
3 that controls CDK activity by targeting the ubiquitin-dependent proteolysis of S-phase
4 factors, including cyclins, kinases and proteins associated with the assembly of the
5 DNA replication complex and cell cycle progression. Begomoviruses are dependent on
6 the host's replication machinery and infect differentiated cells, modulating cell cycle
7 progression in order to create a favorable environment for genome replication. To assess
8 whether APC7 and APC10, two components of the APC complex, play an active role
9 during begomovirus replication, transgenic *A. thaliana* plants overexpressing wild-type
10 APC7 and APC10 or APC7 mutants were challenged with the begomovirus *Cabbage*
11 *leaf curl virus* (CaLCuV), and viral load was determined by qRT-PCR. The results
12 suggest that overexpression of either APC7 or APC10 has a negative effect on
13 begomovirus accumulation, and that both the N- and C-terminal portions of APC7 are
14 involved in this effect.

15
16 Additional keywords: cell cycle, geminivirus, Arabidopsis, CaLCuV

Introduction

The cell cycle is controlled by a conserved molecular machinery among different organisms, in which cyclins and cyclin-dependent kinases (CDK) play a key role (Joubes *et al.*, 2000). A control mechanism of CDK is the degradation of corresponding cyclin subunits (Furuno *et al.*, 1999). At the G₁-S and metaphase-anaphase transitions, CDKs are inactivated by ubiquitin-mediated proteolysis of the corresponding cyclins (den Elzen & Pines, 2001).

The anaphase-promoting complex (APC) is a multisubunit E3 ubiquitin ligase associated with the ubiquitin-26S proteasome pathway, and contains at least 11 subunits (Yoon *et al.*, 2002). The APC is conserved from plants to mammals, and is regulated by two associated proteins, CDC20 and CCS52/CDH1 (Yoon *et al.*, 2002). CDC20 and CCS52/CDH1 can both activate the APC at specific points in the cell cycle, and provide specificity to the type of cyclin that will be ubiquitinated (Kramer *et al.*, 2000; Zachariae *et al.*, 1998). Cyclins that have degradation box (D-box), KEN-box or A-box motifs are recognized and ubiquitinated by the APC (Glotzer *et al.*, 1991; Littlepage & Ruderman, 2002; Pflieger & Kirschner, 2000). The proteolytic events triggered by the APC are required to release sister chromatids during anaphase, to control the exit from mitosis and to prevent premature entry into the S-phase (Jeganathan *et al.*, 2005; King *et al.*, 1995; Peters, 2002).

In vertebrates, APC11 and APC2 are the catalytic subunits of the complex (Tang *et al.*, 2001). Poxviruses, a large group of animal-infecting dsDNA viruses, encode a protein, RING-H2, that mimics the APC11 subunit. This viral protein shows no catalytic activity and thus negatively interferes with the ubiquitination process of regulatory targets of the cell cycle by competing with APC11 in the formation of the APC complex (Mo *et al.*, 2009; 2010).

1 Plants have multiple activators of the APC, which in combination with different
2 ubiquitination-linked enzymes may have distinct or additional functions at specific
3 stages of the cell cycle (Eloy *et al.*, 2006; Fulop *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2010). *A.*
4 *thaliana* has all the components necessary for the assembly of a functional complex,
5 and the comparison with homologous components from other eukaryotes reveals that
6 the subunits of the *Arabidopsis thaliana* APC (AtAPC) preserve the same protein
7 domains present in other organisms (Eloy *et al.*, 2006). However, in contrast to other
8 eukaryotic organisms, which have a single copy of each APC subunit, plants have gene
9 duplication in some APC subunits (Cui *et al.*, 2006). Lima *et al.* (2010) suggest that
10 additional copies of APC subunits may form sub-complexes that could play specific
11 functions during plant development. Among several AtAPC subunits characterized by
12 Eloy *et al.* (2006), APC7 and APC10 are found mostly in leaves. The APC7 transcript
13 has an alternative splicing, generating longer and shorter (lacking the 5' region)
14 transcripts. The proteins encoded by two AtAPC7 transcripts interact with other
15 components of APC complex (Eloy *et al.*, 2006).

16 Begomoviruses (family *Geminiviridae*) have a genome comprised of one or two
17 components of circular, single-stranded DNA and are transmitted by the whitefly
18 *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) to dicot plants (Stanley *et al.*, 2005).
19 Bipartite begomoviruses have two genomic components named DNA-A and DNA-B,
20 each with approximately 2600 nucleotides. The two components have no sequence
21 identity between themselves, except for a ~200 nt "common region" (CR) which
22 contains the viral origin of replication. The viral genome does not encode a DNA
23 polymerase, and therefore begomovirus replication is greatly dependent on the host's
24 DNA replication machinery (Fontes *et al.*, 1992). However, these viruses replicate in
25 fully differentiated plant cells, which are no longer replicating their DNA. To overcome

1 this "biochemical barrier", begomoviruses reprogram the cell cycle to create a favorable
2 environment for replication (Nagar *et al.*, 1995). The viral Rep protein binds to the plant
3 retinoblastoma protein (pRB) and releases repression of E2FC and E2FA transcription
4 factors, activating the expression of S phase-associated genes (Kong *et al.*, 2000). The
5 end result is the induction of DNA replication in differentiated plant cells (Nagar *et al.*,
6 2002). However, cell division does not occur, and begomoviruses are not tumour-
7 inducing viruses (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2004).

8 In *A. thaliana* infected by the bipartite begomovirus *Cabbage leaf curl virus*
9 (CaLCuV), Ascencio-Ibanez *et al.* (2008) noted an increase in 8C, 16C and 32C nuclei,
10 accompanied by a reduction in 4C nuclei. These results indicate that begomovirus
11 infection may induce the endocycle. According to the model proposed by Ascencio-
12 Ibanez *et al.* (2008), CaLCuV selectively infects the 4C cell population predisposed to
13 enter the endocycle, but not 2C or 4C cells in the mitotic cycle.

14 The pattern of gene expression in CaLCuV-infected *A. thaliana* suggests that
15 viral infection activates S phase genes and inhibits M phase genes (Ascencio-Ibanez *et*
16 *al.*, 2008), and supports the proposed model. The CDKG;1, CKL5 and CKL6 cyclins
17 are associated with exit of the quiescent state cell and re-entrance in the cell cycle, and
18 are up-regulated in *A. thaliana* tissues infected by CaLCuV. Additionally, genes
19 associated with the G₁ phase are down-regulated, suggesting that infected cells transit
20 from the final stages of G₁ into the S phase. This is corroborated by down-regulation of
21 cyclins CYCD1;1 and CYCD3;2, which are activators of early G₁ phase, and up-
22 regulation of cyclin CYCD4;2, which is required in the final stages of G₁ (Ascencio-
23 Ibanez *et al.*, 2008).

24 Begomovirus-induced modulation of cell cycle progression suggests that
25 regulatory cell cycle components may play an active role in their replication. In this

1 work we demonstrate that in transgenic *A. thaliana* overexpressing APC7 and APC10,
2 two subunits of the APC complex, CaLCuV accumulation is reduced, suggesting that
3 APC7 and APC10 have a negative effect over begomovirus replication. Besides
4 contributing to our understanding of the virus-host interactions that take place during
5 viral replication, the results described here highlight the usefulness of begomoviruses as
6 tools in studying basic cellular processes such as cell cycle regulation.

7

8

Material and methods

9 *Viral isolate and plant material*

10 Infectious clones corresponding to the DNA-A and DNA-B of CaLCuV (kindly
11 provided by D. Robertson, North Carolina State University, Raleigh, USA) and wild-
12 type (wt) *Arabidopsis thaliana* 'Columbia-0' were used in the experiments. Transgenic
13 *A. thaliana* plants included plants overexpressing wt APC7 ("APC7"), wt APC10
14 ("APC10"), only the N-terminal and only the C-terminal portions of APC7 ("APC7N"
15 and "APC7C", respectively) (A.S. Hemerly and P.C.G. Ferreira, *unpublished results*),
16 and the SALK036724 and SALK109118 T-DNA insertion mutants (obtained from the
17 Salk Institute, La Jolla, USA), with T-DNA insertion at the 5'-NTR and 5'-end of the
18 APC7 gene, respectively.

19

20 *Viral inoculation and confirmation of viral infection*

21 Plants were biolistically inoculated (Aragão *et al.*, 1996) at the 8 to 10 leaves
22 stage, using 2 µg of each genomic component (DNA-A and DNA-B). Inoculated plants
23 were kept in a growth chamber with average daily temperatures of 22°C and a 12-hour
24 daylength. Symptoms were monitored from the first day post-inoculation (dpi) until
25 complete development of the inflorescence. DNA from all plants was extracted at 14

1 and 28 dpi (Dellaporta *et al.*, 1983) and used as a template for PCR-amplification of
2 viral genomic fragments using the universal begomovirus primers PAL1v1978 and
3 PAR1c496 (Rojas *et al.*, 1993).

4

5 *Viral DNA accumulation in infected plants*

6 DNA from all plants, extracted at 14 and 28 dpi as described (Dellaporta *et al.*,
7 1983) was used to determine viral DNA accumulation by quantitative real-time PCR
8 (qPCR). Reactions were prepared in a final volume of 10 μ l, using the Fast SYBR
9 Green Master Mix (Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions and
10 were analyzed in a CFX96 Real-Time System (Bio-Rad). The PCR protocol included an
11 initial denaturing step at 95°C for 20 s, followed by 39 cycles of 95°C for 3 s and 58°C
12 for 30 s, followed by a dissociation stage. Virus-specific primers (forward: 5'-ACA
13 GCA CGA TTG AGG GTA-3' and reverse: 5'-AAA GGG ACT GGC AAT CAA-3')
14 were designed using the software Primers Express 2.0 (Applied Biosystems), and their
15 specificity was tested by conventional PCR using plasmid DNA containing the
16 complete DNA-A of CaLCuV, following by electrophoresis in an 8.0% polyacrylamide
17 gel.

18 Standard curves were prepared using serial dilutions of plasmid DNA containing
19 the complete DNA-A of CaLCuV (10^0 to 10^6 copies of the viral genome per reaction).
20 Standard curves were obtained by regression analysis of cycle threshold (Ct) values of
21 each one of the three replications of a given dilution in relation to the log of the amount
22 of DNA in each dilution. For absolute quantification of the number of viral DNA
23 molecules in the different treatments, 100 ng of total DNA, extracted as described
24 previously, were used in reactions containing virus-specific primers. Each sample was

1 analyzed in triplicates, and three biological replications of the experiment were carried
2 out. Data analysis was carried out using the MS Excel 2007.

3

4 **Results**

5 To assess the involvement of the APC complex on begomovirus infection,
6 transgenic *A. thaliana* plants overexpressing wild-type APC7 and APC10 or APC7
7 deletion and T-DNA insertion mutants were inoculated with the begomovirus *Cabbage*
8 *leaf curl virus* (CaLCuV), and viral load was determined by qPCR. Viral infection was
9 confirmed in all inoculated plants by conventional PCR at 28 dpi (*data not shown*).

10 CaLCuV-infected wild-type Col-0 plants displayed severe leaf curling and
11 stunting at 14 and 28 dpi (Figure 1). Similar symptoms were observed in plants of the
12 SALK036724 T-DNA insertion mutant, particularly at 28 dpi (Figure 1). APC7, APC10
13 and APC7N transgenic plants displayed no symptoms at 14 dpi, and mild symptoms at
14 28 dpi (Figure 1). APC7C and SALK109118 plants displayed no symptoms at either 14
15 or 28 dpi (Figure 1). It is noteworthy that none of the mock-inoculated transgenic plants
16 displayed a visible phenotype, except for the APC7 line, whose leaves display a reddish
17 hue (Figure 1).

18 Viral load in infected plants, as determined by qPCR, corresponded very well
19 with symptoms. Transgenic plants overexpressing APC7 and APC10, as well as the
20 SALK109118 mutant line (with a T-DNA insertion in the 5'-end of the *ACP7* gene),
21 accumulated virtually no viral DNA at 14 dpi, and had a significantly reduced viral titer
22 compared to wt Col-0 plants at 28 dpi (Figure 2). Plants overexpressing APC7N had
23 low viral accumulation at 14 and 28 dpi. Plants overexpressing APC7C had an
24 extremely low viral titer at 14 and 28 dpi. Plants of the SALK036724 mutant line (with
25 a T-DNA insertion in the 5'-NTR of the *APC7* gene) had an extremely low viral titer at

1 14 dpi, but by 28 dpi the viral titer recovered and was equivalent to that observed in wt
2 Col-0 plants (Figure 2).

3 Together, these results indicate that overexpression of APC7 and APC10, two
4 subunits of the APC complex, negatively affects the accumulation of begomovirus
5 DNA. Moreover, expression of either the N- or the C-terminal portions of APC7 is
6 sufficient for the negative effect to be observed, although the C-terminal portion seems
7 to be more effective compared to the N-terminal portion.

8

9 **Discussion**

10 The APC complex has multiple functions in the cell cycle. It acts to control the
11 output of mitosis and meiosis, and must be deactivated for the G1/S phase transition to
12 occur (Hsu *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2004). Begomoviruses are dependent on the host's
13 DNA replication machinery but infect differentiated cells, and therefore require that the
14 cell enters the S phase. Here we demonstrate a negative effect on CaLCuV DNA
15 accumulation due to the overexpression of wt APC7 and APC10 in transgenic *A.*
16 *thaliana* plants. Overexpression of different APC7 mutants also had a negative effect in
17 viral accumulation, indicating that different portions of the APC7 protein may
18 differentially affect viral DNA replication.

19 The phenotype of the SALK109118 line indicates that deletion of the 3'-region
20 of the *APC7* gene does not affect its ability to negatively affect begomovirus DNA
21 accumulation. This mutant line is functionally equivalent to the transgenic line
22 overexpressing the N-terminal portion of the APC7 protein (APC7N), and in fact the
23 phenotype of these two lines is equivalent, both in terms of symptoms and viral DNA
24 accumulation. Conversely, the phenotype of the SALK036724 line indicates that
25 silencing of *APC7* (which is supposedly the result of a T-DNA insertion at the 5'-NTR

1 of the *APC7* gene) leads to viral DNA accumulation at wt levels. The low viral
2 accumulation in plants of this mutant line at 14 dpi was unexpected, and should be
3 further investigated. It is also necessary to perform the molecular analysis to confirm
4 silencing of *APC7* in this mutant line, as well as expression of a C-terminal truncated
5 *APC7* protein in the 109118 mutant line.

6 The fact that subunits of the APC complex are involved in the accumulation of
7 CaLCuV is not surprising, considering that interactions involving begomoviruses and
8 host proteins associated with cell cycle regulation are well documented (Ascencio-
9 Ibanez *et al.*, 2008). A similar effect has been demonstrated for poxviruses, which
10 express a protein that mimics the APC11 subunit of the APC complex. In this case the
11 viral protein negatively affects the formation of a functionally active APC complex,
12 since it interacts with other APC components but fails to promote ubiquitin chain
13 formation. Poxviruses also manipulate cell cycle progression, and viral accumulation is
14 negatively affected when the viral protein that mimics the APC11 subunit is absent (Mo
15 *et al.*, 2009; 2010).

16 Transgenic *A. thaliana* plants expressing only the C-terminal portion of *APC7*
17 allowed the accumulation of very low quantities of viral DNA. The *AtAPC7* transcript
18 undergoes alternative splicing, generating two transcripts. The predicted protein derived
19 from the short *AtAPC7* transcript (corresponding to the C-terminal portion) is
20 homologous to an inhibitor of virus replication (IVR) known as IVR-like protein (Akad
21 *et al.*, 1999). Transient expression of the IVR-like protein greatly reduced replication of
22 *Tobacco mosaic virus* (TMV) in *N. tabacum* cv. 'Samsun' leaf disk assays (Akad *et al.*,
23 1999). The IVR associated with the local lesion response is mainly a tetratricopeptide
24 repeat (TPR) (Loebenstein, 2009). The TPR domain is found in the *APC7* protein (Eloy

1 *et al.*, 2006), and is capable of binding elongated peptide stretches and promoting
2 interaction between different components of the APC complex (Scheufler *et al.*, 2000).

3 The presence of a TPR domain in APC7 may explain the negative effect on
4 CaLCuV DNA accumulation. The APC subunits APC3, APC5, APC6 and APC8 also
5 contain a TPR domain (Lima *et al.*, 2010), and therefore may also affect the replication
6 of begomoviruses. However, this hypothesis must be reconciled with the fact that wt *A.*
7 *thaliana* is susceptible to CaLCuV even though APC7 is expressed. Overexpression of
8 wt APC7 and of its deletion mutants (APC7N and APC7C) could trigger the antiviral
9 activity mediated by the TPR domain due to a concentration threshold and/or
10 conformational changes in the protein. Furthermore, APC10 does not have a TPR and
11 nevertheless is also capable of negatively affect CaLCuV DNA accumulation.

12 Another explanation for the lower viral DNA accumulation in transgenic *A.*
13 *thaliana* plants overexpressing wt APC7, APC10, APC7N and APC7C is that increased
14 expression of APC complex subunits could stimulate the activity of the complex, and
15 thereby prevent progression of the cell cycle into the S phase (Hsu *et al.*, 2002; Wei *et*
16 *al.*, 2004), which is essential for begomovirus replication (Hanley-Bowdoin *et al.*,
17 2004). In wt Col-0, begomovirus proteins could inactivate the APC complex and allow
18 entry into the S phase. To confirm this hypothesis it would be necessary to test the
19 interaction between APC7, APC10 and their activators with different begomovirus
20 proteins. In support of this hypothesis, it has been shown that the human
21 cytomegalovirus inactivates the APC rapidly after infection of quiescent fibroblasts,
22 negatively affecting the stabilization of APC substrates. APC inactivation is caused by
23 the dissociation of its positive regulator, CDH1, and is probably mediated by a viral
24 protein (Wiebusch *et al.*, 2005).

1 Finally, APC7 and APC10 could affect key regulatory components in the control
2 of the endocycle progression and impairing begomovirus replication. The Geminin
3 protein of *Drosophila* is targeted for destruction by the APC at the metaphase-anaphase
4 transition, and does not reaccumulate until late in the G₁ phase, when the APC is
5 inactivated by cyclin/CDK-mediated phosphorylation of CDH1 (McGarry & Kirschner,
6 1998; Zachariae *et al.*, 1998). Down-regulation of APC components in *Drosophila* cells
7 results in geminin protein hyperaccumulation and disrupts endocycle progression, likely
8 because pre-Replicative complex formation is inhibited (Narbonne-Reveau *et al.*, 2008;
9 Zielke *et al.*, 2008). Although a Geminin homologue protein is not present in *A.*
10 *thaliana*, we can not exclude the possibility of another endocycle regulatory component
11 to be affected by APC7 and APC10.

12 The results presented here indicate that overexpression of APC7 and APC10 in
13 transgenic plants causes a negative effect in begomovirus replication. It is possible that
14 begomoviruses manipulate the APC complex in susceptible plants to permit re-entry
15 into the cell cycle. Further studies are required to elucidate the mechanisms involved in
16 the interference in the replication of begomoviruses exerted by overexpression of APC
17 subunits.

18

19

20

21

22

23

24

25

Literature Cited

- Akad, F., Teverovsky, E., David, A., Czosnek, H., Gidoni, D., Gera, A. & Loebenstein, G. (1999). A cDNA from tobacco codes for an inhibitor of virus replication (IVR)-like protein. *Plant Mol. Biol.* 40, 969-976.
- 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. *Theor. Appl. Gen.* 93, 142-150.
- Ascencio-Ibanez, J. T., Sozzani, R., Lee, T. J., Chu, T. M., Wolfinger, R. D., Cella, R. & Hanley-Bowdoin, L. (2008). Global analysis of *Arabidopsis* gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection. *Plant Phys.* 148, 436-454.
- Cui, L., Wall, P. K., Leebens-Mack, J. H., Lindsay, B. G., Soltis, D. E., Doyle, J. J., Soltis, P. S., Carlson, J. E., Arumuganathan, K., Barakat, A., Albert, V. A., Ma, H. & dePamphilis, C. W. (2006). Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome Res.* 16, 738-749.
- Dellaporta, S. L., Wood, J. & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Pl. Mol. Biol. Rept.* 1, 19-21.
- den Elzen, N. & Pines, J. (2001). Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase. *J. Cell Biol.* 153, 121-136.
- Eloy, N. B., Coppens, F., Beemster, G. T., Hemerly, A. S. & Ferreira, P. C. G. (2006). The *Arabidopsis* anaphase promoting complex (APC): Regulation through subunit availability in plant tissues. *Cell Cycle* 5, 1957-1965.
- Fontes, E. P. B., Luckow, V. A. & Hanley-Bowdoin, L. (1992). A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. *Plant Cell* 4, 597-608.
- Fulop, K., Tarayre, S., Kelemen, Z., Horvath, G., Kevei, Z., Nikovics, K., Bako, L., Brown, S., Kondorosi, A. & Kondorosi, E. (2005). *Arabidopsis* anaphase-promoting complexes - Multiple activators and wide range of substrates might keep APC perpetually busy. *Cell Cycle* 4, 1084-1092.
- Furuno, N., den Elzen, N. & Pines, J. (1999). Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase. *J. Cell Biol.* 147, 295-306.
- Glotzer, M., Murray, A. W. & Kirschner, M. W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349, 132-138.
- Hanley-Bowdoin, L., Settlege, S. B. & Robertson, D. (2004). Reprogramming plant gene expression: a prerequisite to geminivirus DNA replication. *Molecular Plant Path.* 5, 149-156.
- Hsu, J. Y., Reimann, J. D., Sorensen, C. S., Lukas, J. & Jackson, P. K. (2002). E2F-dependent accumulation of hEmil regulates S phase entry by inhibiting APC(Cdh1). *Nat. Cell Biol.* 4, 358-366.
- Jeganathan, K. B., Malureanu, L. & van Deursen, J. M. (2005). The Rae1-Nup98 complex prevents aneuploidy by inhibiting securin degradation. *Nature* 438, 1036-1039.
- Joubes, J., Chevalier, C., Dudits, D., Heberle-Bors, E., Inze, D., Umeda, M. & Renaudin, J. P. (2000). CDK-related protein kinases in plants. *Plant Mol. Biol.* 43, 607-620.

- King, R. W., Peters, J. M., Tugendreich, S., Rolfe, M., Hieter, P. & Kirschner, M. W. (1995). A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* 81, 279-288.
- Kong, L. J., Orozco, B. M., Roe, J. L., Nagar, S., Ou, S., Feiler, H. S., Durfee, T., Miller, A. B., Grussem, W., Robertson, D. & Hanley-Bowdoin, L. (2000). A geminivirus replication protein interacts with the retinoblastoma protein through a novel domain to determine symptoms and tissue specificity of infection in plants. *EMBO J.* 19, 3485-3495.
- Kramer, E. R., Scheuringer, N., Podtelejnikov, A. V., Mann, M. & Peters, J. M. (2000). Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1. *Mol. Biol. Cell* 11, 1555-1569.
- Lima, M. F., Eloy, N. B., Pegoraro, C., Sagit, R., Rojas, C., Bretz, T., Vargas, L., Elofsson, A., Oliveira, A. C., Hemerly, A. S. & Ferreira, P. C. G. (2010). Genomic evolution and complexity of the Anaphase-promoting Complex (APC) in land plants. *BMC Plant Biol.* 10, 254.
- Littlepage, L. E. & Ruderman, J. V. (2002). Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. *Genes Dev.* 16, 2274-2285.
- Loebenstein, G. (2009). Local lesions and induced resistance. *Adv. Virus Res.* 75, 73-117.
- McGarry, T. J. & Kirschner, M. W. (1998). Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. *Cell* 93, 1043-1053.
- Mo, M., Fleming, S. B. & Mercer, A. A. (2009). Cell cycle deregulation by a poxvirus partial mimic of anaphase-promoting complex subunit 11. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 19527-19532.
- Mo, M., Fleming, S. B. & Mercer, A. A. (2010). Changing pace: viral mimicry of an anaphase promoting complex subunit. *Cell Cycle* 9, 632-633.
- Nagar, S., Hanley-Bowdoin, L. & Robertson, D. (2002). Host DNA replication is induced by geminivirus infection of differentiated plant cells. *Plant Cell* 14, 2995-3007.
- Nagar, S., Pedersen, T. J., Carrick, K. M., Hanley-Bowdoin, L. & Robertson, D. (1995). A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. *Plant Cell* 7, 705-719.
- Narbonne-Reveau, K., Senger, S., Pal, M., Herr, A., Richardson, H. E., Asano, M., Deak, P. & Lilly, M. A. (2008). APC/CFzr/Cdh1 promotes cell cycle progression during the *Drosophila* endocycle. *Development* 135, 1451-1461.
- Peters, J. M. (2002). The anaphase-promoting complex: Proteolysis in mitosis and beyond. *Mol. Cell* 9, 931-943.
- Pfleger, C. M. & Kirschner, M. W. (2000). The KEN box: An APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev.* 14, 655-665.
- 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 Dis.* 77, 340-347.
- Scheufler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F. U. & Moarefi, I. (2000). Structure of TPR domain-peptide complexes: Critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* 101, 199-210.
- 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.
- Tang, Z. Y., Li, B., Bharadwaj, R., Zhu, H. H., Ozkan, E., Hakala, K., Deisenhofer, J. & Yu, H. T. (2001). APC2 cullin protein and APC11 RING protein comprise the minimal ubiquitin ligase module of the anaphase-promoting complex. *Mol. Biol. Cell* 12, 3839-3851.
- Wei, W., Ayad, N. G., Wan, Y., Zhang, G. J., Kirschner, M. W. & Kaelin, W. G., Jr. (2004). Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex. *Nature* 428, 194-198.
- Wiebusch, L., Bach, M., Uecker, R. & Hagemeyer, C. (2005). Human cytomegalovirus inactivates the G0/G1-APC/C ubiquitin ligase by Cdh1 dissociation. *Cell Cycle* 4, 1435-1439.
- Yoon, H. J., Feoktistova, A., Wolfe, B. A., Jennings, J. L., Link, A. J. & Gould, K. L. (2002). Proteomics analysis identifies new components of the fission and budding yeast anaphase-promoting complexes. *Curr. Biol.* 12, 2048-2054.
- Zachariae, W., Schwab, M., Nasmyth, K. & Seufert, W. (1998). Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science* 282, 1721-1724.
- Zielke, N., Querings, S., Rottig, C., Lehner, C. & Sprenger, F. (2008). The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) is required for rereplication control in endoreplication cycles. *Genes Dev.* 22, 1690-1703.

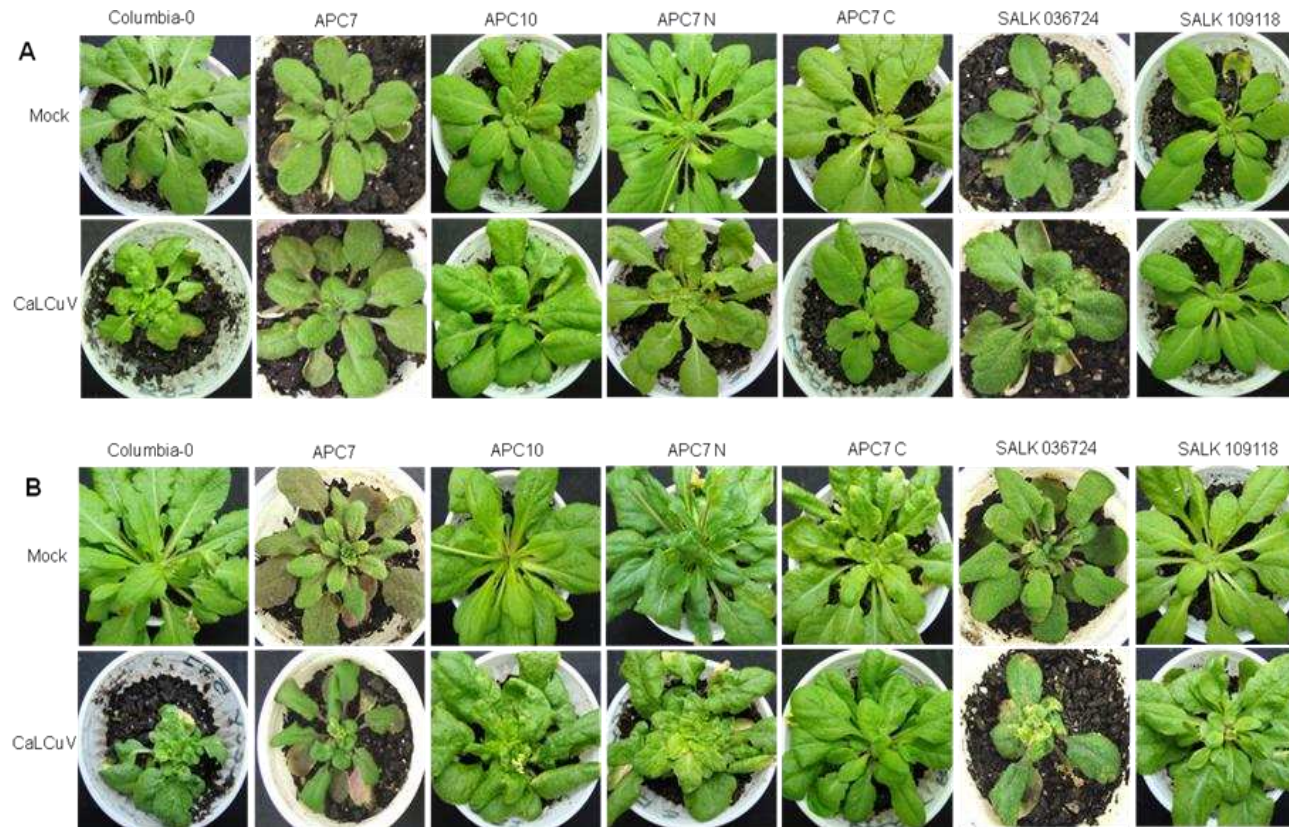


Figure 1. Symptoms induced in transgenic *A. thaliana* plants overexpressing wild-type APC7 and APC10 or APC7 mutants, biolistically inoculated with the begomovirus *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV). *A. thaliana* Columbia-0 was used as a control. **A**, Images obtained at 14 dpi; **B**, Images obtained at 28 dpi. Mock, plants bombarded with tungsten particles without viral DNA.

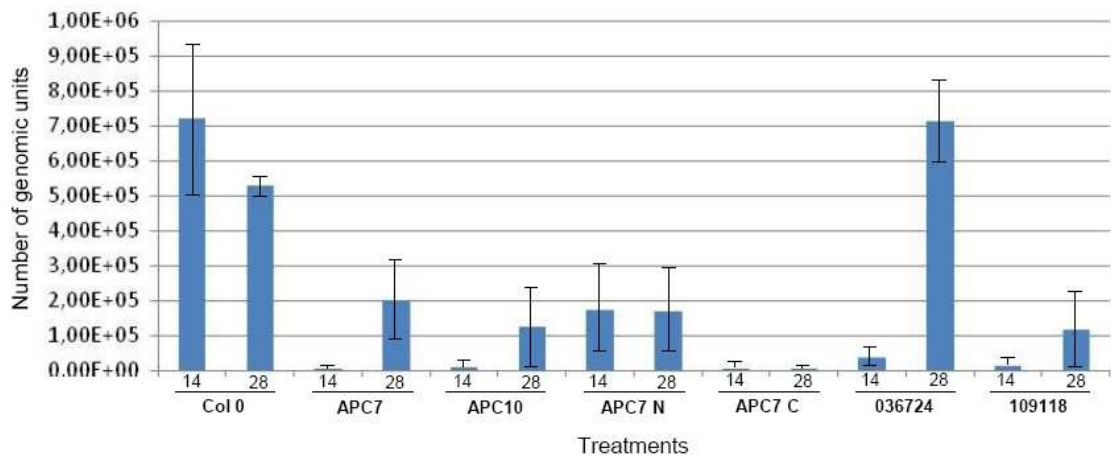


Figure 2. Viral DNA accumulation in transgenic *A. thaliana* plants overexpressing wild-type APC7 and APC10 or APC7 mutants biolistically inoculated with CaLCuV. Total DNA was extracted from systemically infected leaves at 14 and 28 days post-inoculation and used as a template for quantitative real-time PCR (qPCR) with virus-specific primers. *A. thaliana* Columbia-0 wild type was used as a control. Error bars indicate mean \pm SD of three independent experiments.

CAPÍTULO 3

ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA DE MOVIMENTO (MP) DO BEGOMOVÍRUS *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) E PROTEÍNAS DO HOSPEDEIRO

1. RESUMO

O gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) inclui vírus cujo genoma apresenta uma ou duas moléculas de DNA circular de fita simples, que infectam espécies de plantas dicotiledôneas e são transmitidos pela mosca-branca *Bemisia tabaci*. A proteína de movimento ("movement protein", MP) dos begomovírus bissegmentados é responsável pelo movimento célula-a-célula e está associada à expressão de sintomas. Poucos trabalhos demonstraram a interação desta proteína com proteínas do hospedeiro. O objetivo deste trabalho foi detectar e caracterizar proteínas do hospedeiro que interagem com a proteína de movimento (MP) do begomovírus *Tomato yellow spot virus* (ToYSV). Para detectar a interação foi utilizado o método de purificação por afinidade em tandem (TAP). A transformação genética de plantas de *Arabidopsis thaliana* e *Solanum lycopersicum* com a construção N-TAPi/MP não gerou transformantes. Realizou-se então um ensaio de expressão transiente em folhas de *Nicotiana benthamiana*. Folhas de *N. benthamiana* completamente expandidas foram infiltradas com culturas de *Agrobacterium tumefaciens* carregando a construção N-TAPi/MP, e 48 horas após a inoculação estas folhas foram coletadas para posterior extração de proteínas totais. Após o procedimento de purificação por afinidade em tandem e SDS-PAGE, verificou-se apenas a banda referente à etiqueta fusionada a MP (N-TAPi/MP). Nenhuma interação entre a MP do ToYSV com proteínas do hospedeiro foi observada no ensaio de expressão transiente em folhas de *N. benthamiana*.

PALAVRAS-CHAVE: Geminivírus; ToYSV; proteína de movimento; interação; TAP

2. INTRODUÇÃO

A família *Geminiviridae* é composta de vírus com genoma de 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, número de componentes e organização do genoma, e relacionamento filogenético (Stanley *et al.*, 2005).

Os begomovírus possuem um ou dois componentes genômicos, infectam plantas dicotiledôneas e são transmitidos pela mosca-branca *Bemisia tabaci*. Os begomovírus que ocorrem nas Américas possuem o genoma dividido em dois componentes, denominados DNA-A e DNA-B. No DNA-A encontram-se os genes associados à replicação, ativação transcricional e encapsidação. No DNA-B encontram-se os genes associados ao movimento intra- e intercelular, denominados NSP ("nuclear shuttle protein") e MP ("movement protein"), respectivamente (revisado por Rojas *et al.*, 2005).

A proteína MP é essencial para o movimento célula-a-célula dos begomovírus com genoma bissegmentado (Noueiry *et al.*, 1994) e à expressão de sintomas da infecção viral (Lazarowitz, 1991; Hou *et al.*, 1998). A MP do *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV) é responsável pelo transporte do DNA viral através dos plasmodesmas (Noueiry *et al.*, 1994), e localiza-se ao redor do núcleo, em frações da membrana plasmática e na parede celular (von Arnim e Stanley, 1992; Pascal *et al.*, 1993). Tanto ssDNA quanto dsDNA podem ser transportados célula-a-célula, mas provavelmente dsDNA é a principal forma de movimento do BDMV (Rojas *et al.*, 1998). Sanderfoot e Lazarowitz (1995) demonstraram que MP e NSP atuam de maneira cooperativa para o movimento do *Squash leaf curl virus* (SqLCV).

Como o BDMV e o SqLCV apresentam tropismo de tecido diferente (o SqLCV é restrito ao floema e o BDMV infecta células do mesófilo), é de se esperar que estes begomovírus apresentem diferenças no movimento célula-a-célula. Assim, foi proposto que após o transporte do DNA viral do BDMV do núcleo para o citoplasma, mediado por NSP, o DNA é transferido de NSP para MP formando um complexo MP-dsDNA, o qual se movimenta de uma célula para outra (Levy e Tzfira, 2010). Já para o SqLCV, Sanderfoot e Lazarowitz (1995) sugerem que um complexo NSP-ssDNA move-se célula-a-célula por intermédio da ligação com MP.

As proteínas de movimento do BDMV e do *Abutilon mosaic virus* (AbMV) podem ser fosforiladas na região C-terminal por cinases associadas a parede celular, e esta modificação pós-traducional pode ser necessária para o aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas

(Levy e Tzfira, 2010). Kleinow *et al.* (2008) demonstraram que mutações nos três diferentes sítios de fosforilação da MP do AbMV afetam o desenvolvimento de sintomas e o acúmulo de DNA viral. Além de modificações pós-traducionais, a interação de MP com fatores virais e do hospedeiro também é necessária. A interação entre MP e NSP foi demonstrada por meio da re-localização de NSP por MP em protoplastos de *N. tabacum* e também pela interação física demonstrada no sistema duplo-híbrido de levedura (Sanderfoot e Lazarowitz, 1995; Mariano *et al.*, 2004). Além desta interação com NSP, MP também interage com HSC70 (Krenz *et al.*, 2010) e sinaptotagmina A (SYTA) (Lewis e Lazarowitz, 2010).

Lewis e Lazarowitz (2010) demonstraram que a MP do begomovírus *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) interage com SYTA de *Arabidopsis thaliana*. SYTA regula o transporte célula-a-célula da MP do CaLCuV e é necessária para o movimento sistêmico do vírus na planta. Em ensaio de duplo-híbrido de levedura verificou-se a interação entre HSC70 de *A. thaliana* e a MP do begomovírus AbMV. Esta interação foi confirmada *in vivo* utilizando-se o ensaio de complementação de fluorescência bimolecular (BiFC) (Krenz *et al.*, 2010). Os resultados sugerem que a interação HSC70-MP é importante para o transporte viral e indução de sintomas.

O begomovírus *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) foi isolado de plantas de tomateiro na região de Bicas, Minas Gerais (Ambrozevicius *et al.*, 2002). O ToYSV causa sintomas severos em tomateiro e em hospedeiros experimentais, como *Nicotiana benthamiana* e *Nicotiana glutinosa* (Calegario *et al.*, 2007). A severidade de sintomas pode estar associada, dentre outros aspectos, com o tropismo de tecido deste vírus, uma vez que em *N. benthamiana* o ToYSV é capaz de infectar, além do floema, as células do mesofilo (Alves-Junior *et al.*, 2009). Estas características tornam o ToYSV um modelo interessante no estudo da interação begomovírus-hospedeiro.

Os estudos de interação entre proteínas, de maneira geral, utilizam o sistema duplo-híbrido de levedura. Este método consiste na fusão da proteína "isca" ao domínio de ligação ao DNA de um fator transcricional (normalmente GAL4), e na fusão da proteína "presa" no domínio de ativação transcricional. A interação entre as proteínas "isca" e "presa" conduz à ativação funcional do fator transcricional promovendo a expressão de um gene repórter (Navaratnam, 2009). O método de purificação por afinidade em tandem ("tandem affinity purification", TAP) tem sido utilizado como uma alternativa ao sistema duplo-híbrido de levedura no estudo da interação entre proteínas. Este método foi desenvolvido originalmente em leveduras para purificação de complexos de proteínas e identificação de interações proteína-proteína *in vivo*. Atualmente o método TAP pode ser utilizado em mamíferos,

plantas, bactérias e outros sistemas (Xu *et al.*, 2010). O método permite a purificação de proteínas complexadas a uma proteína alvo etiquetada.

A identificação e o estudo de proteínas da planta que interagem direta ou indiretamente com MP são fundamentais para o entendimento do processo de movimento viral, um aspecto importante da interação begomovírus-hospedeiro. Um maior entendimento da interação vírus-hospedeiro pode levar a novas estratégias de controle destas viroses, especialmente com relação a resistência do hospedeiro, seja ela natural ou derivada do patógeno.

O objetivo deste trabalho foi detectar e caracterizar proteínas do hospedeiro que interagem com a proteína de movimento (MP) do ToYSV utilizando-se o método de purificação por afinidade em tandem (TAP).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Construção do vetor pNTAPi-MP

O gene que codifica a proteína de movimento (MP) do ToYSV-[Bic2] (Calegario *et al.*, 2007) foi amplificado por PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos MP(F)-EcoRI (5'-CGC GGA ATT CGT TGA AAT GGA TTC TCA G-3') e MP(R)-XhoI (5'-CGC GCT CGA GCC CTC TCT TAA CTC AAT G-3'). O produto da amplificação foi purificado e clonado no vetor pENTR11 (Invitrogen). Os sítios attL deste vetor foram utilizados para subclonar o gene MP em pNTAPi por meio de recombinação mediada por LR clonase (Invitrogen) (Rohila *et al.*, 2004), gerando o plasmídeo pNTAPi-MP. Como controle foi utilizado o gene GFP fusionado à etiqueta N-TAPi. O gene que codifica a proteína GFP foi amplificado via PCR a partir do plasmídeo pK7FWG2 utilizando-se os oligonucleotídeos GFP(R)-NotI (5'-GCA TGC GGC CGC TTA CTT GTA CAG CTC G-3') e GFP(F)-Sall (5'-GTG GTG GTC GAC ATG GTG AGC AAG GGC-3'). O fragmento amplificado foi purificado, inserido em pENTR11 e sub-clonado no vetor pNTAPi da mesma forma descrita para o gene MP, gerando o plasmídeo pNTAPi-GFP. A integridade das construções pNTAPi-MP e pNTAPi-GFP foi verificada por sequenciamento (Macrogen Inc.). As construções obtidas (pNTAPi-MP e pNTAPi-GFP) foram utilizadas para a transformação de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 por choque térmico (Brasileiro e Carneiro, 1998).

3.2. Expressão e purificação da proteína MP a partir de *Escherichia coli*

Para construção do vetor codificando a proteína MP contendo uma etiqueta de seis histidinas (6xHis), o gene MP foi inserido no vetor pRSET-A (Invitrogen), gerando o plasmídeo pRSET-A-MP. Os plasmídeos recombinantes foram utilizados para transformar *E. coli* BL21::DE3. Para purificação da 6xHis-MP, 5 ml de cultura de *E. coli* BL21::DE3 contendo o plasmídeo pRSET-A-MP, crescidas durante a noite, foram utilizados para inocular 500 ml de meio LB contendo ampicilina (100 µg/ml). As células bacterianas foram incubadas a 37°C até atingir DO₆₀₀ entre 0,4 e 0,6. A expressão das proteínas foi induzida por meio da adição de IPTG para uma concentração final de 1 mM, seguido de incubação por 4 horas. As células foram ressuspensas em 5 ml de tampão de ressuspensão (fosfato de sódio 50 mM pH 8,0, contendo NaCl 300 mM, EDTA 0,5 mM, β-mercaptoetanol 5 mM, Tween-20 0,1% e glicerol 10%), lisadas por sonicação e centrifugadas a 30.000 g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi adicionado a uma coluna de Ni⁺-NTA (Qiagen) para purificação da

proteína recombinante 6xHis-MP por cromatografia de afinidade, conforme instruções do fabricante. A coluna foi lavada com tampão de ressuspensão acrescido de imidazole 10 mM, e a proteína recombinante foi eluída com tampão de eluição (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 300 mM, imidazole 250 mM, DTT 2,5 mM e SDS 0,5%). A proteína purificada foi submetida a diálise com proporções crescentes do tampão renaturante (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, glicerol 10%, DTT 1mM e PMSF 1 mM), e decrescentes de tampão N (NaHCO₃ 100 mM, pH 9,0). A proporção inicial foi de 80:20 (tampão N + SDS 0,5%: tampão renaturante), e em seguida foram utilizadas as proporções 60:40, 40:60, 20:80 e 100% de tampão renaturante. As soluções foram trocadas a cada 3 horas. A concentração da proteína recombinante foi medida pelo método de Bradford (Bio-Rad), utilizando-se como padrão albumina de soro bovino (BSA). A pureza e a massa molecular foram verificadas por SDS-PAGE e imunodeteção com anticorpos específicos.

3.3. Produção de anti-soro contra a proteína MP

A proteína 6xHis-MP purificada a partir das células bacterianas foi utilizada para a produção de anti-soro policlonal utilizando-se dois coelhos brancos da raça Nova Zelândia, com 30 dias de idade. Após a coleta de sangue para a obtenção do soro normal (pré-imune) foram realizadas cinco injeções intramusculares a intervalos semanais, com 100, 200, 200, 400 e 400 µg de proteína para um dos coelhos e 200, 400, 400, 800 e 800 µg para o outro coelho. Adjuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich) foi misturado à proteína MP na proporção 1:1 imediatamente antes da injeção. Duas semanas após a última injeção foram retiradas amostras de sangue para avaliação inicial do anti-soro. Uma coleta adicional foi realizada uma semana após a primeira coleta. A especificidade do anti-soro foi confirmada por *Western blot*.

3.4. Transformação de *Solanum lycopersicum* cv. 'Moneymaker'

Sementes de tomateiro cultivar 'Moneymaker' foram desinfestadas por imersão em etanol 70% por 1 minuto e lavadas em água milli-Q autoclavada, seguido de incubação em solução de NaClO (1,25% de cloro ativo) e Tween-20 a 0,1% sob agitação por 20 minutos. As sementes desinfestadas foram lavadas quatro vezes em água milli-Q autoclavada e, após secagem em papel de filtro estéril, foram germinadas em caixas magenta contendo meio de cultura MS meia força (Murashige e Skoog, 1962) acrescido de *mio*-inositol a 50 mg/l, sacarose a 20 g/l, ágargel a 6 g/l e vitaminas de Nitsch e Nitsch (1969). As sementes foram

mantidas em sala de crescimento ($26^{\circ}\text{C} \pm 2$) por 10 dias sob irradiância de $24 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e em fotoperíodo de 16 horas.

Após a germinação, as folhas cotiledonares e os hipocótilos foram seccionados em fragmentos de 0,5 e 1 cm, respectivamente, e pré-cultivados por 24 horas em meio de regeneração composto por sais MS força total (Murashige e Skoog, 1962) adicionado de vitaminas de Nitsch e Nitsch (1969), zeatina a 2 mg/l, sacarose a 2 g/l e acetosiringona 100 μM . Os cotilédones foram mantidos com a face adaxial voltada para o meio de cultivo.

Após o pré-cultivo foi realizado o co-cultivo dos explantes. Para isso, uma cultura de *A. tumefaciens* contendo a construção pNTAPi-MP ou pNTAPi -GFP foi incubada a 28°C em meio LB acrescido dos antibióticos espectinomicina, estreptomomicina e gentamicina nas concentrações de 300, 100 e 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente. Em seguida as culturas foram submetidas a centrifugação a 2.400 g por 10 minutos a 22°C . As células foram ressuspensas em 10 ml de meio MS líquido (Murashige e Skoog, 1962) acrescido de *mio*-inositol a 0,1 g/l e sacarose a 20 g/l. A absorvância da suspensão foi medida em espectrofotômetro e ajustada para DO_{600} de 0,4 por meio da adição de meio MS0. Os explantes foram imersos por 5 minutos na suspensão de *A. tumefaciens*, e em seguida foram secos em papel de filtro estéril e transferidos novamente para o meio de pré-cultivo contendo um papel de filtro autoclavado e estéril disposto sobre o meio. Foram então mantidos por mais 2 dias em sala de crescimento sob irradiância de $24 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e fotoperíodo de 16 horas.

Após o co-cultivo os explantes foram transferidos para meio de regeneração seletivo [MS força total (Murashige e Skoog, 1962), *mio*-inositol a 0,1 g/l, vitaminas de Nitsch e Nitsch (1969), sacarose a 20 g/l, zeatina a 2 mg/l, agargel a 5,2 g/l, Timentin a 300 mg/l e glufosinato de amônio a 250 mg/l (agente de seleção)]. Os explantes foram mantidos em meio de regeneração por um período de 20 dias. Explantes cotiledonares foram cultivados com a face abaxial em contato com o meio de cultura.

Decorrida a etapa de regeneração os explantes foram transferidos para meio de alongamento [sais MS força total (Murashige e Skoog, 1962), *mio*-inositol a 0,1 g/l, vitaminas de Nitsch e Nitsch (1969), sacarose a 20 g/l, zeatina a 1 mg/l, agargel a 5,2 g/l, Timentin a 300 mg/l e glufosinato de amônio a 250 mg/l] e mantidos nestas condições por aproximadamente 30 dias. Brotações diferenciadas e alongadas foram seccionadas e transferidas para meio de enraizamento (MS força total, *mio*-inositol a 0,1 g/l, vitaminas de Nitsch e Nitsch (1969), sacarose a 20 g/l, agargel a 5,2 g/l, ácido indol-3-acético a 2 mg/l, glicina a 2 mg/l e Timentin a 300 mg/l). Todas as etapas foram conduzidas em sala de crescimento ($26^{\circ}\text{C} \pm 2$) sob irradiância de $24 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e fotoperíodo de 16 horas.

Plantas de tomateiro enraizadas e com a parte aérea desenvolvida foram transferidas para copos descartáveis contendo água, cobertas por sacos plásticos e mantidas em sala de crescimento por 15 dias. Os sacos plásticos foram gradativamente abertos a cada dois dias para a realização de trocas gasosas e diminuição da umidade relativa do ar. Em seguida, as plantas foram transferidas para vasos contendo substrato orgânico e mantidas em casa-de-vegetação sob telado sombrite 50% até a completa adaptação. A confirmação da expressão de NTAPi-MP e NTAPi-GFP foi realizada por meio de *Western blot*, utilizando-se anti-corpos policlonais para a proteína MP (item 3.3) e anti-CBP (Millipore).

3.5. Avaliação da infectividade de ToYSV em *Arabidopsis thaliana*

Sementes de *A. thaliana* ecotipo Columbia-0 foram semeadas em substrato comercial (Plantmax) e mantidas em câmara de crescimento a 22°C sob fotoperíodo de 12 horas. Os clones correspondentes a 1,5 cópias do DNA-A e do DNA-B de ToYSV (Andrade *et al.*, 2006) foram inoculados por biobalística (Aragão *et al.*, 1996). O aparecimento de sintomas foi monitorado diariamente. Após extração de DNA (Dellaporta *et al.*, 1983) aos 14 e 28 dias pós-inoculação (dpi) as plantas foram avaliadas quanto à infecção pelo ToYSV por meio de PCR. Foram utilizados oligonucleotídeos universais para o DNA-B de begomovírus bissegmentados (PBL1v2040 e PCRC1; Rojas *et al.*, 1993), e oligonucleotídeos específicos para a MP do ToYSV [MP(F)-EcoRI, 5'-CGC GGA ATT CGT TGA AAT GGA TTC TCA G3', e MP(R)-XhoI, 5'-CGC GCT CGA GCC CTC TCT TAA CTC AAT G3']. O *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) foi utilizado como controle positivo.

3.6. Transformação de *Arabidopsis thaliana*

Sementes de *A. thaliana* ecotipo Columbia-0 foram semeadas em substrato comercial (Plantmax) e mantidas em câmara de crescimento a 22°C com fotoperíodo de 16 horas. Sete dias após a semeadura foram transplantadas sete plantas por vaso.

A preparação das culturas de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 carregando o plasmídeo recombinante pNTAPi-MP ou pNTAPi-GFP foi realizada conforme descrito no item 3.4, e o pellet foi ressuspensionado em meio para infiltração (sais MS meia força, sacarose 5% e Silwett L-77 0,05%) ajustando-se a DO₆₀₀ para 0,8. As plantas de *A. thaliana* foram inoculadas quando apresentavam inflorescências com aproximadamente 5 cm, por submersão da inflorescência na suspensão de bactérias (Clough e Bent, 1998). Possíveis transformantes T1 foram semeados em substrato comercial (Plantmax) e selecionados com a aplicação do

herbicida glufosinato de amônio (0,00578%) (Dufresne *et al.*, 2008). A confirmação da expressão das proteínas recombinantes foi realizada conforme descrito no item 3.7.

3.7. Expressão transiente em folhas de *Nicotiana benthamiana*

Para expressão transiente em folhas de *N. benthamiana*, células competentes de *A. tumefaciens* GV3101 foram transformadas com aproximadamente 10 ng de DNA de pNTAPi-MP ou pNTAPi-GFP pelo método de choque térmico (Sambrook & Russel, 2001). As culturas de *A. tumefaciens* contendo os plasmídeos pNTAPi-MP ou pNTAPi-GFP foram incubadas por uma noite a 28°C em 30 ml de meio LB contendo os antibióticos espectinomomicina, estreptomicina e gentamicina nas concentrações de 300, 100 e 50 µg/ml, respectivamente. Em seguida, foram adicionados à cultura 300 ml de meio LB com os mesmos antibióticos, e as culturas foram incubadas até atingirem DO₆₀₀ de aproximadamente 1,2. As células bacterianas foram centrifugadas a 5.500 g por 20 minutos, o pellet foi lavado com 5 ml de meio para infiltração (MES 100 mM, pH 5,5, MgCl₂ 0,1 M, acetoseringona 0,2 mM) e centrifugado novamente a 5.500 g por 20 minutos. O pellet foi ressuscitado em meio de infiltração até atingir DO₆₀₀ de aproximadamente 1,0.

A agroinfiltração foi realizada com seringa estéril de 3 ml sem agulha, em folhas totalmente expandidas de *N. benthamiana*. Foram coletadas amostras nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 horas pós-infiltração (hpi) para determinar o tempo de maior expressão das proteínas recombinantes NTAPi-MP ou NTAPi-GFP. A confirmação da expressão das proteínas recombinantes foi realizada por meio de *Western blot*, utilizando-se anti-corpos policlonais para a proteína MP (item 3.3) e anti-CBP (Millipore).

Após a determinação do tempo de maior expressão das proteínas recombinantes, foram coletadas 60 g de folhas de *N. benthamiana* infiltradas com pNTAPi-MP ou pNATAPi-GFP. As folhas foram cortadas em pedaços pequenos para posterior ligação cruzada das proteínas com formaldeído, conforme (Rohila *et al.*, 2004). O material vegetal foi armazenado a -80°C para posterior extração de proteínas.

3.8. Extração de proteínas totais e purificação por afinidade em tandem

A extração de proteínas de *N. benthamiana* expressando NTAPi-MP ou NTAPi-GFP a partir de 60 g de folhas foi realizada conforme Rohila *et al.* (2004) e Rohila *et al.* (2006). As proteínas eluídas foram precipitadas com 10 µl de ácido tricloroacético-TFA e centrifugadas a 20.000 g por 15 minutos. O pellet foi lavado com acetona 100% e novamente centrifugado a 20.000 g por 15 minutos. O pellet foi novamente lavado com acetona 80% e centrifugado a

20.000 g por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 30 µl de tampão da amostra (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 10%, β-mercaptoetanol 10 mM, glicerol 8,7%, azul de bromofenol 2%) e as amostras foram fervidas por 20 minutos. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE), em gradiente 4-15% de acrilamida. Após a corrida eletroforética o gel foi imerso em solução fixadora (metanol 50%, ácido acético glacial 10%, bicarbonato de amônio 0,77%) por uma hora. Em seguida o gel foi lavado duas vezes com água Milli-Q, sensibilizado com tiosulfato de sódio 0,005% por uma hora e incubado com nitrato de prata 0,1% por uma hora. Após lavagem do gel com água Milli-Q foi adicionada a solução reveladora (carbonato de sódio 2%, formaldeído 0,036%), incubando-se por 1-2 minutos. A revelação foi bloqueada com EDTA 50 mM por uma hora.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção dos vetores pNTAPi-GFP e pNTAPi-MP

Antes da inserção dos genes GFP e MP do ToYSV, foi verificada a integridade do vetor pNTAPi por meio de análise de restrição (Figura 1). O vetor foi digerido com as enzimas de restrição *Cla* I, *Hind* III e *Eco*R I, as quais apresentam um, dois e três sítios de clivagem no vetor pNTAPi, respectivamente. Conforme observado no padrão eletroforético, a enzima *Cla* I propiciou uma digestão parcial gerando um fragmento de aproximadamente 12.000 pb correspondente ao vetor pNTAPi linearizado. As bandas adicionais observadas provavelmente correspondem a diferentes formas do DNA plasmidial não digerido por *Cla* I. Com as enzimas *Eco*R I e *Hind* III a digestão foi total e as bandas observadas correspondem aos tamanhos esperados (Figura 1). Desta maneira foi confirmada a integridade do vetor pNTAPi (Rohila *et al.*, 2004).

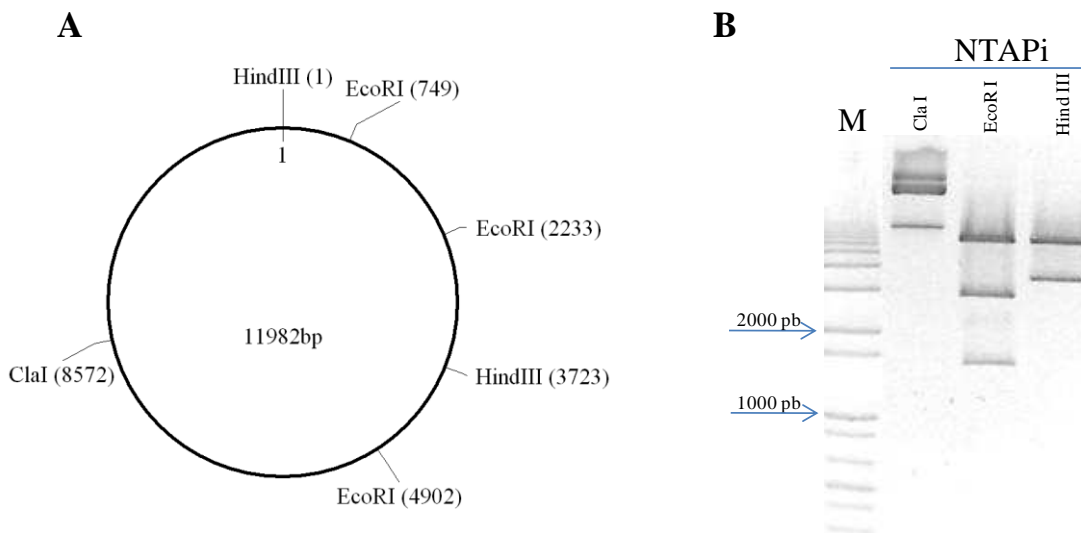


Figura 1. Análise de restrição do vetor pNTAPi. **A.** Mapa de restrição com as enzimas *Cla* I (um sítio), *Hind* III (dois sítios) e *Eco*R I (três sítios). As coordenadas dos sítios de restrição estão indicadas em parênteses. **B.** Padrão eletroforético da digestão de pNTAPi por *Cla* I, *Hind* III e *Eco*R I. M: Marcador de comprimento "1Kb plus DNA ladder" (Invitrogen).

Após os procedimentos de clonagem, a presença do inserto (GFP ou MP) foi confirmada por PCR e a integridade da construção foi confirmada por análise de restrição e por sequenciamento (dados não mostrados).

4.2. Comprovação da especificidade do anti-soro contra a MP do ToYSV

Com o objetivo de dar suporte à investigação da interação entre proteínas do tomateiro com a proteína MP do begomovírus ToYSV, foi produzido um anti-soro policlonal específico para a MP. Para isso, inicialmente a proteína MP fusionada a uma etiqueta de seis histidinas (6xHis-MP), perfazendo uma massa molecular de aproximadamente 40 kDa. Em seguida, foi expressa e purificada a partir de células de *E. coli*. A proteína 6xHis-MP acumulou na fração insolúvel (Figura 2).

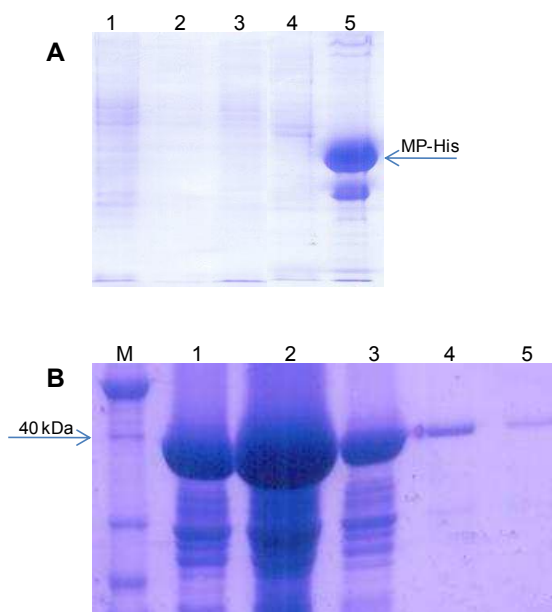


Figura 2. **A.** Análise em SDS-PAGE das proteínas celulares solúveis e insolúveis de células de *E. coli* BL21::DE3 transformadas com a construção indicada. 1-4, Extratos protéicos solúveis; 5, Extrato protéico insolúvel. A seta indica a posição correspondente à proteína recombinante 6xHis-MP. **B.** Purificação da proteína recombinante 6xHis-MP. As canaletas 1-5 correspondem, respectivamente, ao 1º, 2º, 3º, 4º e 5º eluato. M, Marcador de massa molecular (Bio-Rad). As proteínas foram coradas com *Comassie brilliant blue*.

A especificidade do anti-soro foi verificada com a utilização da proteína 6xHis-MP purificada em diferentes diluições (1:1, 1:10 e 1:100) e da proteína AC5 do ToRMV. O anti-soro reagiu com todas as diluições da proteína 6xHis-MP purificada, porém não reagiu com a proteína AC5, demonstrando-se assim sua especificidade (Figura 3).

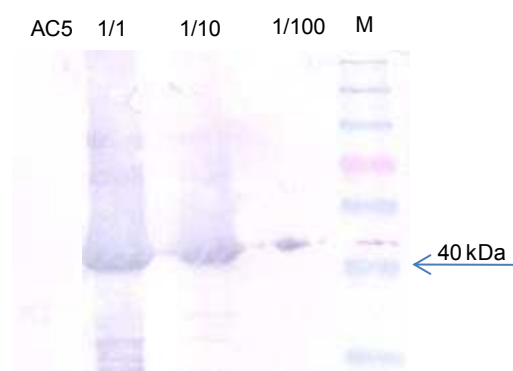


Figura 3. Confirmação da especificidade do soro imune anti-MP por *Western blot*. A proteína recombinante 6xHis-MP foi analisada em três diluições (1:1, 1:10 e 1:100). A diluição do antissoro foi de 1:1.000. AC5, proteína AC5 purificada a partir de células de *E. coli* BL21::DE3 (controle negativo). M, Marcador de massa molecular (Bio-Rad).

4.3. Transformação de *Solanum lycopersicum* cv. ‘Moneymaker’

Para buscar interações entre a MP do begomovírus ToYSV e proteínas do seu hospedeiro natural, plantas de tomateiro cv. ‘Moneymaker’ foram transformadas via *Agrobacterium tumefaciens* contendo a construção pNTAPi-MP ou pNTAPi-GFP. No momento da transferência das plantas para copos recobertos com sacos plásticos, procedimento anterior à aclimação em casa-de-vegetação, foram coletadas amostras para confirmar a expressão do transgene. Foram obtidas 14 plantas que poderiam estar expressando NTAPi-MP e 2 plantas que poderiam estar expressando NTAPi-GFP. Para avaliar a expressão dos transgenes foi realizado *Western blot* utilizando-se anti-soros policlonais específicos para 6xHis-MP (item 4.2) e CBP (Millipore). O anti-soro contra 6xHis-MP seria efetivo na detecção da expressão da proteína NTAPi-MP, mas não da proteína NTAPi-GFP. O anti-soro contra CBP seria efetivo na detecção das duas proteínas (NTAPi-MP e NTAPi-GFP). Entretanto, em nenhuma das 16 plantas obtidas ao longo do processo de transformação foi detectada a expressão do transgene, seja NTAPi-MP ou NTAPi-GFP (Figura 4).

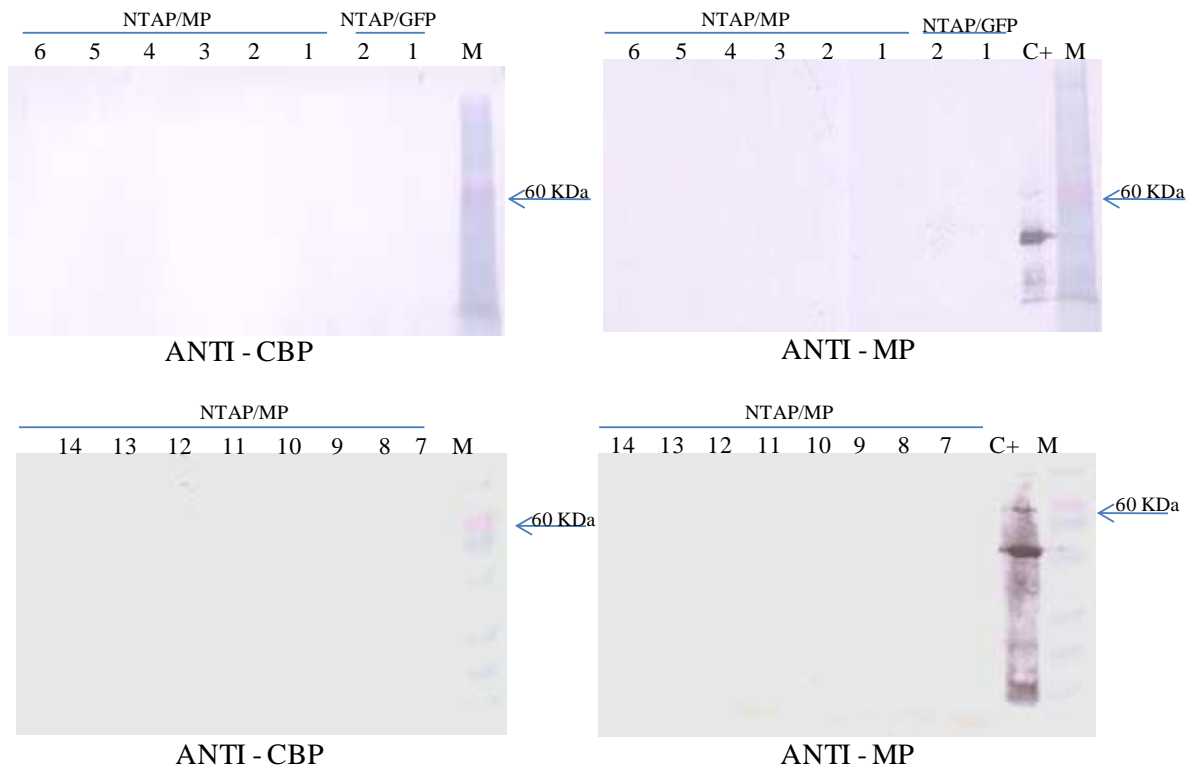


Figura 4. Análise por *Western blot* utilizando anti-soros contra 6xHis-MP e contra CBP para detecção da expressão das proteínas NTAPi-MP ou NTAPi-GFP em plantas transgênicas de tomateiro cv. Moneymaker. **1 e 2 (NTAPi-GFP)**, plantas supostamente transformadas com a construção NTAPi-GFP. **1-14 (NTAPi-MP)**, plantas supostamente transformadas com a construção NTAPi-MP. **C+**, proteína 6xHis-MP purificada a partir de *E. coli* BL21::DE3 (controle positivo). **M**, Marcador de massa molecular (Bio-Rad).

4.4. O ToYSV infecta sistemicamente plantas de *A. thaliana*

Uma vez que não foram obtidas plantas de tomateiro expressando NTAPi-MP ou NTAPi-GFP, optou-se por utilizar *A. thaliana* no estudo da interação entre MP do begomovírus ToYSV e proteínas do hospedeiro. Para dar suporte a este novo sistema experimental foi necessário primeiramente verificar se o ToYSV infecta *A. thaliana* sistemicamente. Plantas de *A. thaliana* foram inoculadas via biobalística com plasmídeos recombinantes contendo repetições em tandem (entre duas origens de replicação) do DNA-A e do DNA-B do ToYSV ou do *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV). Os primeiros sintomas induzidos pelo ToYSV foram observados aos 20 dias pós-inoculação (dpi), e consistiam de epinastia e amarelecimento das folhas. Comparado ao CaLCuV, o ToYSV apresenta um período latente mais longo e uma menor severidade dos sintomas, porém apresenta uma alta infectividade, uma vez que todas as plantas inoculadas foram infectadas (Tabela 1; Figura 5). A infecção causada pelo ToYSV e pelo CaLCuV foi confirmada por PCR em folhas não

inoculadas aos 14 e 28 dpi (Figura 6). Estes resultados confirmam que o sistema ToYSV-*A. thaliana* pode ser utilizado no estudo da interação entre a proteína MP e fatores do hospedeiro.

Tabela 1. Período latente e infectividade dos begomovírus *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) e *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) em *Arabidopsis thaliana* Col-0.

Vírus	Período latente ^a	Infectividade (%) ^b
CaLCuV	12	6/6 (100)
ToYSV	20	6/6 (100)

^a Número de dias entre a inoculação e o aparecimento dos primeiros sintomas.

^b Número de plantas infectadas/número de plantas inoculadas. A verificação foi feita por meio de observação de sintomas e confirmada por PCR utilizando-se oligonucleotídeos universais e específicos para CaLCuV e ToYSV, respectivamente.

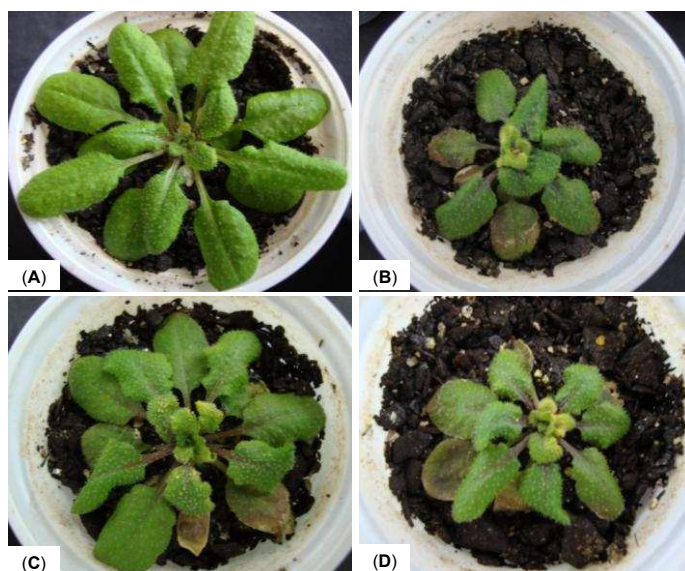


Figura 5. Sintomas de epinastia e amarelecimento em *A. thaliana* inoculada via biobalística com os clones infecciosos do ToYSV (DNA-A e DNA-B). **A**, Planta inoculada apenas com partículas de tungstênio, sem o DNA viral; **B**, Planta inoculada com o CaLCuV (controle positivo); **C**, **D**, Plantas inoculadas com o ToYSV. Todas as imagens obtidas aos 28 dpi.

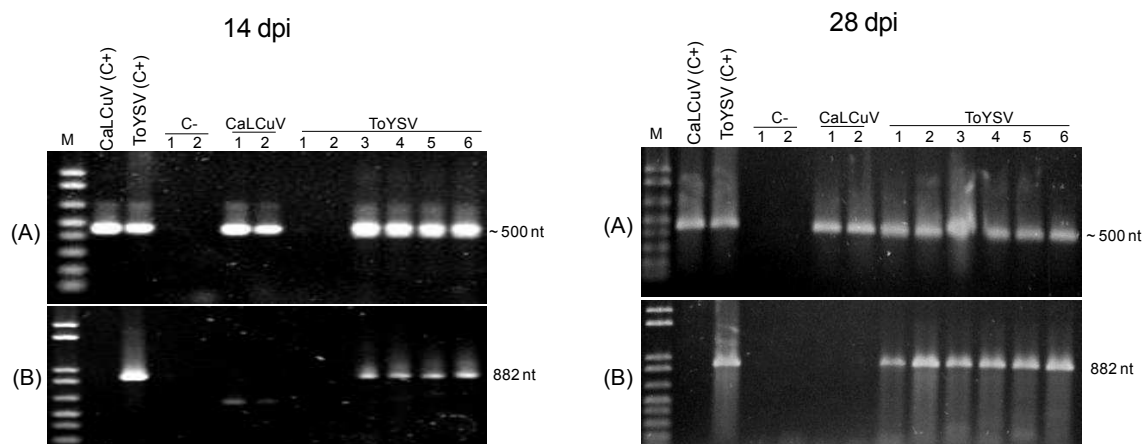


Figura 6. Confirmação da infecção de plantas de *A. thaliana* Col-0 pelo ToYSV. **A**, Amplificação via PCR de um fragmento do DNA-B do ToYSV e do CaLCuV a partir de folhas não inoculadas, utilizando-se oligonucleotídeos universais para o gênero *Begomovirus* (PBL1v2040/PCRC1); **B**, Amplificação via PCR de um fragmento do gene MP do ToYSV e do CaLCuV a partir de folhas não inoculadas, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para o ToYSV. **M**, Marcador de comprimento ("1Kb plus DNA ladder"); **CaLCuV** e **ToYSV**, Amplificação a partir de DNA plasmidial (controles positivos da PCR); **C- 1 e 2**, Amplificação a partir de plantas inoculadas sem a presença do DNA viral e água, respectivamente (controles negativos); **CaLCuV 1e 2**, Amplificação a partir de plantas de *A. thaliana* inoculadas com o CaLCuV; **ToYSV 1-6**, Amplificação a partir de plantas de *A. thaliana* inoculadas com o ToYSV.

4.5. Transformação de *A. thaliana* com os transgenes NTAPi-MP ou NTAPi-GFP

Plantas de *A. thaliana* foram transformadas com *A. tumefaciens* contendo as construções NTAPi-MP ou NTAPi-GFP. As sementes coletadas das plantas submetidas a transformação foram semeadas em substrato, e após a germinação foram selecionadas com a aplicação do herbicida glufosinato de amônio. As plantas que sobreviveram à aplicação do herbicida foram testadas para a presença do transgene via PCR com oligonucleotídeos específicos para o gene MP do ToYSV. Cerca de 30 plantas foram testadas quanto a presença dos transgenes (NTAPi-GFP ou NTAPi-MP), e em nenhuma foi detectada a presença do transgene (dados não mostrados). Um número maior de plantas deverão ser analisadas com o intuito de detectar plantas nas quais seja confirmada a expressão dos transgenes.

4.6. Expressão transiente em folhas de *Nicotiana benthamiana*

Concomitantemente à tentativa de obtenção de plantas transgênicas de tomateiro e de *Arabidopsis*, foram realizados ensaios de expressão transiente em folhas de *N. benthamiana*. O ToYSV causa sintomas severos em *N. benthamiana*, e portanto este também é um sistema

compatível com o estudo da interação entre a proteína MP e fatores do hospedeiro. Folhas de *N. benthamiana* completamente expandidas foram infiltradas com suspensão de células de *A. tumefaciens* contendo as construções NTAPi-GFP ou NTAPi-MP. A 0, 24, 48, 72 e 96 horas pós-infiltração (hpi) as folhas foram coletadas para a avaliação do melhor tempo de coleta. A expressão da proteína recombinante NTAPi-MP foi observada a 48 e 72 hpi, sem diferença aparente na quantidade de proteína expressa (Figura 7). O mesmo padrão foi observado para NTAPi-GFP utilizando-se o anti-soro anti-CBP (dados não mostrados). Determinado o tempo ideal de coleta, foram realizadas novas infiltrações. Após a extração de proteínas totais, purificação do possível heterocomplexo e SDS-PAGE, não foram observadas bandas além daquelas referentes à etiqueta NTAPi fusionada a GFP ou MP (Figura 8). Conclui-se que não foi detectada interação entre a MP do ToYSV e proteínas do hospedeiro no ensaio de expressão transiente em folhas de *N. benthamiana*. Análises adicionais devem ser realizadas buscando a otimização do protocolo e também utilizando outros sistemas modelo (p.ex., plantas transgênicas de tomateiro e *A. thaliana*), para detectar e caracterizar proteínas do hospedeiro que interagem com a MP de begomovírus.

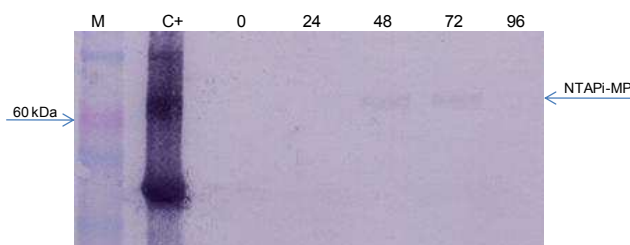


Figura 7. Análise por *Western blot*, utilizando-se anti-soro contra 6xHis-MP, para avaliação do período de maior expressão do transgene NTAPi-MP após agroinfiltração em folhas de *N. benthamiana*. **0, 24, 48, 72 e 96**, Tempo (em horas) decorrido da agroinoculação até a coleta das folhas. **C+**, proteína 6xHis-MP purificada a partir de *E. coli* BL21::DE3 (controle positivo). **M**, marcador de massa molecular (Bio-Rad).

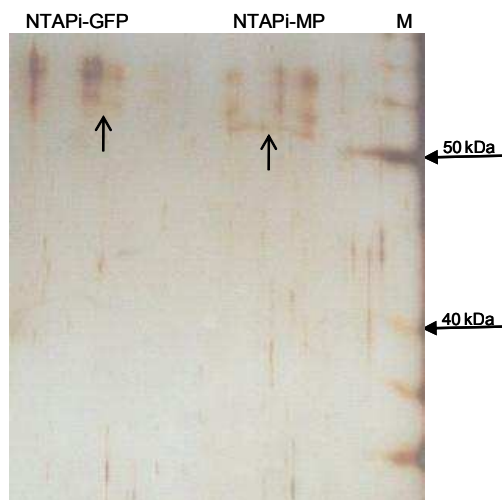


Figura 8. Análise em SDS-PAGE após a purificação dos complexos protéicos contendo NTAPi-GFP e NTAPi-MP a partir de extratos de folhas de *N. benthamiana* expressando transientemente as proteínas NTAPi-MP ou NTAPi-GFP. Os extratos foram obtidos conforme descrito no item 3.8. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE e coradas com nitrato de prata 0,1%. As setas nas canaletas NTAPi-GFP e NTAPi-MP indicam as bandas correspondentes às proteínas NTAPi-GFP e NTAPi-MP, respectivamente. M, marcador de massa molecular (Bio-Rad).

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos a partir da expressão transiente de NTAPi-MP em folhas de *N. benthamiana* indicaram que não foi detectada interação com proteínas do hospedeiro. Existem quatro possibilidades para explicar este resultado. Na primeira delas o sistema utilizado (*N. benthamiana* e a MP do ToYSV) pode não ter sido o ideal. A maioria dos trabalhos de interação begomovírus-hospedeiro utiliza como modelo a planta *A. thaliana* e o begomovírus CaLCuV (Arguello-Astorga *et al.*, 2007; Ascencio-Ibanez *et al.*, 2008; Trejo-Saavedra *et al.*, 2009; Lewis e Lazarowitz, 2010). Entretanto, existem trabalhos utilizando sistemas-modelo com plantas cultivadas, como o arroz (Rohila *et al.*, 2006).

Na segunda possibilidade, o método TAP pode não ser o mais adequado para detectar interações com a MP de begomovírus. O método mais utilizado para detecção de interação entre proteínas é o sistema duplo-híbrido de levedura, por ser um método simples, rápido e de baixo custo (Navaratnam, 2009). No entanto, este método apresenta limitações, sendo a principal delas o grande número de falsos-positivos. Outra limitação importante é que proteínas com domínio trans-membrana podem não atingir o núcleo, e com isso não ocorrerá a ativação transcricional do gene repórter. Neste caso obtém-se um falso-negativo. A proteína MP apresenta um domínio central associado à ligação com a membrana plasmática (Aberle *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Frischmuth *et al.*, 2004). Mesmo se a MP for fusionada a um sinal nuclear, esta vai se localizar, ao menos parcialmente, na membrana plasmática (Frischmuth *et al.*, 2004). Estas características dificultam, ou mesmo impossibilitam, a utilização do sistema duplo-híbrido da forma tradicional. Krenz *et al.* (2010) utilizaram a região N-terminal da proteína MP, retirando assim o domínio central, para detectar interação utilizando o sistema duplo-híbrido. Desta maneira foi possível detectar interação entre a MP do AbMV e a proteína HSC70 de *A. thaliana*. Lewis e Lazarowitz (2010) utilizaram um sistema alternativo ao duplo-híbrido (sistema de recrutamento SOS), e demonstraram que a MP do begomovírus CaLCuV interage com a proteína sinaptotagmina A (SYTA) de *A. thaliana*.

O método TAP já foi empregado eficientemente no estudo da interação entre proteínas de potyvírus e proteínas do hospedeiro, utilizando-se plantas transgênicas de *A. thaliana* (Dufresne *et al.*, 2008; Thivierge *et al.*, 2008). O método também foi empregado com sucesso para detectar interação entre proteínas de plantas utilizando-se plantas transgênicas de arroz, e também a expressão transiente em folhas de *N. benthamiana* (Rohila *et al.*, 2004; Rohila *et*

al., 2006). Apesar desses exemplos, é reconhecido que o método TAP é melhor estabelecido para estudos em células de mamíferos e de leveduras (Xu *et al.*, 2010).

A terceira possibilidade é que a MP do ToYSV não interage com nenhuma proteína do hospedeiro experimental *N. benthamiana*. Esta possibilidade é pouco provável visto que ToYSV causa infecção severa neste hospedeiro e é sabido que para o estabelecimento de uma infecção viral é necessária uma série de interações entre proteínas virais e proteínas do hospedeiro. Evidentemente a proteína responsável pelo movimento célula-a-célula não deve fugir a esta regra.

A quarta possibilidade, a mais consistente, reside no fato de que o procedimento foi realizado uma única vez, com uma série de adaptações para o modelo utilizado e para os recursos disponíveis, o que pode ter afetado negativamente sua eficiência. Devem ser realizadas novas tentativas de obtenção de plantas de tomateiro e de *A. thaliana* transformadas com a construção NTAPi-MP, bem como tentativas adicionais de purificação de heterocomplexos protéicos a partir de folhas de *N. benthamiana* expressando essa construção de forma transiente.

Recentemente foi desenvolvida uma nova etiqueta, denominada GS, que uma vez fusionada à proteína de interesse é expressa em maior quantidade e propicia a recuperação de uma alta quantidade do heterocomplexo em células de plantas, em comparação à etiqueta TAP (Van Leene *et al.*, 2008). É possível que outros sistemas de detecção de interações entre proteínas forneçam informações adicionais sobre a MP dos begomovírus. Por isso é necessária a utilização de outros sistemas-modelo, assim como outros métodos de detecção de interação entre proteínas. O surgimento de ferramentas poderosas, como a espectrometria de massa, tem favorecido o desenvolvimento de métodos para purificação de complexos de proteínas *in situ* (Van Leene *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2010).

6. LITERATURA CITADA

- ABERLE H.J., RUTZ M.L., KARAYAVUZ M., FRISCHMUTH S., WEGE C., HULSER D., JESKE H. Localizing the movement proteins of Abutilon mosaic geminivirus in yeast by subcellular fractionation and freeze-fracture immuno-labelling. **Archives of Virology**, v. 147, p. 103-117, 2002.
- ALVES-JUNIOR M., ALFENAS-ZERBINI P., ANDRADE E.C., ESPOSITO D.A., SILVA F.N., CRUZ A.C.F., VENTRELLA M.C., OTONI W.C., ZERBINI F.M. Synergism and negative interference during co-infection of tomato and *Nicotiana benthamiana* with two bipartite begomoviruses. **Virology**, v. 387, p. 257-266, 2009.
- 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., MANHANI G.G., ALFENAS P.F., CALEGARIO R.F., FONTES E.P.B., ZERBINI F.M. *Tomato yellow spot virus*, a tomato-infecting begomovirus from Brazil with a closer relationship to viruses from *Sida* sp., forms pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from *Sida*. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 3687-3696, 2006.
- ARAGÃO F.J.L., BARROS L.M.G., BRASILEIRO A.C.M., RIBEIRO S.G., SMITH F.D., SANFORD J.C., FARIA J.C., 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.
- ARGUELLO-ASTORGA G., ASCENCIO-IBANEZ J.T., DALLAS M.B., OROZCO B.M., HANLEY-BOWDOIN L. High-frequency reversion of geminivirus replication protein mutants during infection. **Journal of Virology**, v. 81, p. 11005-11015, 2007.
- ASCENCIO-IBANEZ J.T., SOZZANI R., LEE T.J., CHU T.M., WOLFINGER R.D., CELLA R., HANLEY-BOWDOIN L. Global analysis of *Arabidopsis* gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection. **Plant Physiology**, v. 148, p. 436-454, 2008.
- CALEGARIO R.F., FERREIRA S.S., ANDRADE E.C., ZERBINI F.M. Characterization of *Tomato yellow spot virus*, (ToYSV), a novel tomato-infecting begomovirus from Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1335-1343, 2007.
- CLOUGH S.J., BENT A.F. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v. 16, p. 735-743, 1998.
- DELLAPORTA S.L., WOOD J., HICKS J.B. A plant DNA miniprep: Version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 1, p. 19-21, 1983.

- DUFRESNE P.J., THIVIERGE K., COTTON S., BEAUCHEMIN C., IDE C., UBALIJORO E., LALIBERTE J.F., FORTIN M.G. Heat shock 70 protein interaction with Turnip mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase within virus-induced membrane vesicles. **Virology**, v. 374, p. 217-227, 2008.
- FRISCHMUTH S., KLEINOW T., ABERLE H.J., WEGE C., HULSER D., JESKE H. Yeast two-hybrid systems confirm the membrane association and oligomerization of BC1 but do not detect an interaction of the movement proteins BC1 and BV1 of Abutilon mosaic geminivirus. **Archives of Virology**, v. 149, p. 2349-2364, 2004.
- 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.
- KLEINOW T., HOLEITER G., NISCHANG M., STEIN M., KARAYAVUZ M., WEGE C., JESKE H. Post-translational modifications of Abutilon mosaic virus movement protein (BC1) in fission yeast. **Virus Research**, v. 131, p. 86-94, 2008.
- KRENZ B., WINDEISEN V., WEGE C., JESKE H., KLEINOW T. A plastid-targeted heat shock cognate 70 kDa protein interacts with the Abutilon mosaic virus movement protein. **Virology**, v. 401, p. 6-17, 2010.
- LAZAROWITZ S.G. Molecular characterization of two bipartite geminiviruses causing squash leaf curl disease: role of viral replication and movement functions in determining host range. **Virology**, v. 180, p. 70-80, 1991.
- LEVY A., TZFIRA T. Bean dwarf mosaic virus: a model system for the study of viral movement. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, p. 451-461, 2010.
- LEWIS J.D., LAZAROWITZ S.G. Arabidopsis synaptotagmin SYTA regulates endocytosis and virus movement protein cell-to-cell transport. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 107, p. 2491-2496, 2010.
- 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.
- MURASHIGE T., SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Plant Physiology**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NAVARATNAM D.S. Yeast two-hybrid screening to test for protein-protein interactions in the auditory system. **Methods in Molecular Biology**, v. 493, p. 257-268, 2009.
- NITSCH J.P., NITSCH C. Haploid plants from pollen grains. **Science**, v. 163, p. 85-87, 1969.
- 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.
- 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.

- ROHILA J.S., CHEN M., CERNY R., FROMM M.E. Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants. **Plant Journal**, v. 38, p. 172-181, 2004.
- ROHILA J.S., CHEN M., CHEN S., CHEN J., CERNY R., DARDICK C., CANLAS P., XU X., GRIBSKOV M., KANRAR S., ZHU J.K., RONALD P., FROMM M.E. Protein-protein interactions of tandem affinity purification-tagged protein kinases in rice. **Plant Journal**, v. 46, p. 1-13, 2006.
- ROJAS M.R., GILBERTSON R.L., RUSSELL D.R., MAXWELL D.P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease**, v. 77, p. 340-347, 1993.
- ROJAS M.R., 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.
- SAMBROOK J., RUSSEL D. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual (3rd ed.)**. Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.
- 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.
- 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**. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (Eds.) *Virus Taxonomy*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego. Elsevier Academic Press. pp. 301-326. 2005.
- THIVIERGE K., COTTON S., DUFRESNE P.J., MATHIEU I., BEAUCHEMIN C., IDE C., FORTIN M.G., LALIBERTE J.F. Eukaryotic elongation factor 1A interacts with Turnip mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase and VPg-Pro in virus-induced vesicles. **Virology**, v. 377, p. 216-225, 2008.
- TREJO-SAAVEDRA D.L., VIELLE-CALZADA J.P., RIVERA-BUSTAMANTE R.F. The infective cycle of Cabbage leaf curl virus (CaLCuV) is affected by CRUMPLED LEAF (CRL) gene in *Arabidopsis thaliana*. **Virology Journal**, v. 6, p. -, 2009.
- VAN LEENE J., WITTERS E., INZE D., DE JAEGER G. Boosting tandem affinity purification of plant protein complexes. **Trends in Plant Sciences**, v. 13, p. 517-520, 2008.
- VON ARNIM A., STANLEY J. Inhibition of *African cassava mosaic virus* systemic infection by a movement protein from the related geminivirus *Tomato golden mosaic virus*. **Virology**, v. 187, p. 555-564, 1992.

XU X.L., SONG Y., LI Y.H., CHANG J.F., ZHANG H., AN L.Z. The tandem affinity purification method: An efficient system for protein complex purification and protein interaction identification. **Protein Expression and Purification**, v. 72, p. 149-156, 2010.

ZHANG S.C., GHOSH R., JESKE H. Subcellular targeting domains of Abutilon mosaic geminivirus movement protein BC1. **Archives of Virology**, v. 147, p. 2349-2363., 2002.