

MIGUEL ALVES JÚNIOR

**ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA ADAPTABILIDADE
DIFERENCIAL DE DOIS BEGOMOVÍRUS EM TOMATEIRO E *Nicotiana
benthamiana***

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2008

MIGUEL ALVES JÚNIOR

**ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA ADAPTABILIDADE
DIFERENCIAL DE DOIS BEGOMOVÍRUS EM TOMATEIRO E *Nicotiana
benthamiana***

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

APROVADA: 29 de fevereiro de 2008.

Prof^a Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo
(Co-orientadora)

Pesq. Poliane Alfenas Zerbini

Pesq. Eduardo Chumbinho de Andrade

Prof. Wagner Campos Otoni

Prof. Francisco Murilo Zerbini Júnior
(Orientador)

Ao meu pai Miguel Alves Sobrinho (In Memoriam)

À minha mãe Tereza Neuma da Silva Alves

Ao meu irmão Magnus Vinícius da Silva Alves

À minha irmã Itatiana Mirelli da Silva Alves

As minhas tias Aidê Gomes de Albuquerque e Alaíde Gomes de Albuquerque

A todos meus familiares e amigos.

Ofereço

À minha querida esposa Aracely Maria da Silva Valença, pelo carinho, amor, dedicação, incentivo e apoio para a conclusão deste curso e à minha pequenina Maria Eduarda, pela alegria e afeto.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter iluminado sempre o meu caminho ao longo destes anos de vitórias, e ser o motivo de minha existência e fé;

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo;

Ao Professor Francisco Murilo Zerbini, pela oportunidade de crescimento profissional, pela orientação, dedicação e amizade durante a realização deste trabalho;

Aos professores Murilo Geraldo de Carvalho e Márcia Rogéria de Almeida, pela co-orientação, dedicação, ensinamentos, conselhos, valorosa amizade e respeito;

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Fitopatologia, por seus ensinamentos;

Aos professores Wagner Otoni e Marília Ventrella, pelos ensinamentos, paciência e ajuda nos experimentos;

Aos amigos do Laboratório de Virologia Vegetal Molecular, Alison, Alvaro, Ana Verônica, Bruno, Carlos, Carol, Dani, Débora, Eduardo Chumbinho, Evando, Flávia, Fernanda, Fabio, Glória, Jorge, Lidiane, Marília, Poliane, Renan, Riani e Sávio pela amizade e pelo agradável ambiente de trabalho;

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

Aos meus amigos do laboratório de Anatomia Vegetal e Cultura de Tecidos, aos quais agradeço pelo companheirismo e pela experiência compartilhada ao longo deste trabalho;

Aos amigos Walter Evangelista, Diógenes Batista e Ricardo Duarte aos quais agradeço, em especial, pelos momentos de amizade, companheirismo e por todos os momentos vividos ao longo desta jornada;

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

À minha irmã e, especialmente, a minha mãe, por acreditarem em mim e transmitir amor mesmo distante;

Ao meu padrinho Rabêlo pela confiança e força nas horas difíceis;

Aos meus familiares de Brasília, em especial a minha prima Maria José, por me motivar sempre;

Aos familiares da minha esposa pela confiança, carinho e compreensão;

À minha esposa Aracely Maria, pelo companherismo, compreensão, dedicação e pela força e apoio em todos os bons e maus momentos ao longo deste trabalho;

À minha filha Maria Eduarda Valença Alves, maior presente que pude ganhar de Deus nessa minha estada em Viçosa.

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

BIOGRAFIA

MIGUEL ALVES JÚNIOR, filho de Miguel Alves Sobrinho e Tereza Neuma da Silva Alves, nasceu em Afogados da Ingazeira, Pernambuco, no dia 22 de julho de 1975.

Residiu e estudou o primeiro grau na cidade de Iguaracy em Pernambuco e o segundo grau na cidade de Arcoverde, Pernambuco. Graduou-se nos cursos de Engenharia Agrônômica e Licenciatura no Setor de Técnicas Agropecuárias pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) na cidade de Recife, em agosto de 2001. Em setembro de 2001, foi aprovado em concurso público para o cargo de Professor Substituto na Escola Agrotécnica Federal da Vitória do Santo Antão, Pernambuco. Em março de 2002 iniciou o curso de Mestrado em Fitossanidade, com área de concentração em Fitopatologia na UFRPE, realizando os experimentos da tese no ano de 2003 na Universidade de Brasília (Unb) e Embrapa Hortaliças, ambos em Brasília, e concluindo o curso de mestrado em fevereiro de 2004. Em fevereiro de 2004, iniciou o curso de pós-graduação em Fitopatologia em nível de doutorado na Universidade Federal de Viçosa (UFV), na cidade de Viçosa, Minas Gerais. Em 29 de fevereiro de 2008, concluiu o doutorado com a defesa da tese.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
Introdução Geral.....	1
Revisão de Literatura	6
1. A família <i>Geminiviridae</i>	6
2. Replicação viral	9
3. Movimento do vírus na planta	11
4. Interações geminivírus-hospedeiro.....	13
5. Begomovírus em tomateiro no Brasil.....	18
Literatura citada.....	24
Interações positivas e negativas entre dois begomovírus bissegmentados em tomateiro e <i>Nicotiana benthamiana</i>	34
Abstract.....	36
Introduction	37
Material and Methods.....	38
Viral isolates and plant material	38
Kinetics of viral infection	39
Viral DNA accumulation in infected plants	39
Viral replication in protoplasts	40
<i>In situ</i> hybridization	41
Results	43

Latent period and symptoms of ToYSV and ToRMV in single or mixed infections in tomato and <i>N. benthamiana</i>	43
Kinetics of viral infection in tomato and <i>N. benthamiana</i>	44
Accumulation of ToYSV and ToRMV in single or mixed infections in tomato and <i>N. benthamiana</i>	46
Replication of ToYSV and ToRMV in <i>N. benthamiana</i> protoplasts.....	47
Tissue tropism of ToYSV and ToRMV in tomato and <i>N. benthamiana</i>	48
Discussion.....	49
Acknowledgments	55
References	56
Figure legends	62

RESUMO

Alves-Júnior, Miguel, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **Estudo dos mecanismos envolvidos na adaptabilidade diferencial de dois begomovírus em tomateiro e *Nicotiana benthamiana***. Orientador: Francisco Murilo Zerbini Júnior. Co-orientadores: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo e Murilo Geraldo de Carvalho.

Os begomovírus pertencem à família *Geminiviridae*, que inclui vírus com genoma de DNA circular de fita simples, encapsidado em partículas icosaédricas geminadas. Os begomovírus são transmitidos pela mosca-branca *Bemisia tabaci*, e 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) e o *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), é responsável por grandes perdas na cultura do tomateiro. Os sintomas induzidos pelo ToYSV em tomateiro e *Nicotiana benthamiana* são mais severos e surgem mais cedo em comparação aos induzidos pelo ToRMV, o que sugere uma adaptação diferencial de cada vírus aos seus hospedeiros. Neste trabalho, foram conduzidos experimentos com o objetivo de analisar o papel de diversos fatores nessa adaptação diferencial. A cinética da infecção viral foi analisada em plantas nas quais a folha inoculada foi removida após diversos períodos de tempo. O acúmulo de DNA viral foi estimado em plantas infectadas, aos 14 e 28 dias pós-inoculação (dpi). A replicação viral foi analisada em protoplastos, a 48 e 96 horas pós-eletroporação (hpe). O tropismo de tecido viral foi analisado por meio de hibridização *in situ* aos 14 dpi. Os resultados indicam que o ToYSV é mais eficiente durante os eventos iniciais (pré-infecção sistêmica) do ciclo de infecção, atingindo uma concentração maior e estabelecendo a infecção sistêmica mais rapidamente em relação ao ToRMV, tanto em tomateiro quanto em *N. benthamiana*. Em infecções mistas, o ToRMV interfere

negativamente com o ToYSV durante os estágios iniciais da infecção, mas essa interferência cessa após o estabelecimento da infecção sistêmica. Ambos os vírus são restritos ao floema em tomateiro. Em *N. benthamiana*, o ToYSV invade o mesofilo, enquanto o ToRMV é restrito ao floema. Na infecção mista nesse hospedeiro, o ToRMV passa a infectar células do mesofilo. Em conjunto, esses resultados confirmam a hipótese de que o ToYSV é melhor adaptado a ambos os hospedeiros em relação ao ToRMV. Em tomateiro, essa melhor adaptação é expressa na forma de maior eficiência nos processos iniciais de infecção, permitindo que o ToYSV atinja maior concentração em um período de tempo mais curto, o que talvez leve a um maior acúmulo de fatores de virulência virais. Em *N. benthamiana*, a melhor adaptação é expressa também pela capacidade de invadir os tecidos do mesofilo.

ABSTRACT

Alves-Júnior, Miguel, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2008. **Study of the mechanisms involved in the differential adaptability of two begomoviruses to tomato and *Nicotiana benthamiana*.** Adviser: Francisco Murilo Zerbini Júnior. Co-Advisers: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo and Murilo Geraldo de Carvalho.

Begomoviruses belong to the family *Geminiviridae*, which includes viruses with a circular, single-stranded DNA genome encapsidated in twinned icosahedral particles. Begomoviruses are transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci*, and cause serious diseases in several economically important crops, mostly in tropical and subtropical regions. In Brazil, a viral complex comprising at least eight species, including *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) and *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), is responsible for great losses in tomato production. ToYSV symptoms in tomato and *Nicotiana benthamiana* are more severe and appear earlier compared to ToRMV, suggesting differential adaptation of each virus to their hosts. We performed a series of experiments in order to analyze the role of a number of factors in this differential adaptation. The kinetics of viral infection was analyzed in plants which had the inoculated leaf removed at various periods of time after inoculation. Viral DNA accumulation was estimated in plants at 14 and 28 days post-inoculation (dpi). Viral replication was analyzed in protoplasts at 48 and 96 hours post-electroporation (hpe). Viral tissue tropism was analyzed by *in situ* hybridization at 14 dpi. Results indicate that ToYSV is more efficient in carrying out the early (pre-systemic) events of infection, reaching a higher concentration and establishing a systemic infection sooner and more efficiently than ToRMV in both tomato and *N. benthamiana*. In mixed infections, ToRMV negatively interferes on ToYSV during these initial stages of infection, but once a systemic infection is established this negative interference ceases. Both viruses are phloem-restricted in tomato. In *N.*

benthamiana, ToYSV invades the mesophyll, while ToRMV is phloem-restricted. During mixed infection in this host, ToYSV releases ToRMV from the phloem. We conclude that ToYSV is better adapted than ToRMV to both hosts. In tomato, this is expressed by its reaching a higher concentration in a shorter period of time, which may lead to a higher accumulation of viral virulence factors. In *N. benthamiana*, it is further expressed by its ability to invade mesophyll cells.

INTRODUÇÃO GERAL

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. = *Lycopersicon esculentum* Mill.) é cultivado em regiões de clima tropical e subtropical, em todos os continentes durante praticamente todo o ano. O Brasil é o nono produtor mundial de tomate, com uma produção de aproximadamente 3,3 milhões de toneladas e um rendimento médio de 57,5 ton/ha em 2006 (Agrianual, 2007). A cultura é altamente rentável e possui importância social devido ao grande número de empregos gerados. É considerada uma das hortaliças de maior importância econômica no Brasil, tanto para o consumo *in natura* como para o setor agroindustrial. Entretanto, diversos problemas de ordem fitossanitária podem comprometer sua produtividade.

Nos últimos 30 anos, problemas fitossanitários associados a insetos do gênero *Bemisia* (Homoptera:Aleyrodidae), conhecidos vulgarmente por “mosca-branca”, têm se tornado freqüentes em tomateiros cultivados em todo o mundo (Morales e Anderson, 2001; Naranjo e Ellsworth, 2001). Uma das principais consequências do aumento populacional desses insetos é o aumento da incidência e severidade de viroses causadas por vírus pertencentes à família *Geminiviridae* (Mansoor *et al.*, 2003; Morales e Jones, 2004). Os vírus pertencentes a essa família caracterizam-se pela morfologia de

partículas icosaédricas geminadas e genoma composto por uma ou duas moléculas de DNA fita simples com aproximadamente 2.500 a 3.000 nucleotídeos. A família é dividida em quatro gêneros, com base no número de componentes do genoma, tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros e relacionamento filogenético: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus* (Rojas *et al.*, 2005; Stanley *et al.*, 2005). No gênero *Begomovirus* são classificados os geminivírus transmitidos por diferentes biótipos de *Bemisia tabaci*, que infectam dicotiledôneas e que possuem genoma com um ou dois componentes. Begomovírus que possuem um componente genômico (monossegmentados) estão presentes no hemisfério oriental, e são frequentemente associados a um DNA satélite denominado DNA beta. Os begomovírus das Américas possuem dois componentes genômicos (bissegmentados), denominados DNA-A e -B. No DNA-A encontram-se os genes que codificam proteínas relacionadas à replicação e encapsidação do vírus. O DNA-B possui genes que codificam duas proteínas, ambas relacionadas com o movimento viral.

Espécies de begomovírus infectam diversas culturas de grande importância econômica em regiões tropicais e subtropicais (Morales e Anderson, 2001; Monci *et al.*, 2002; Briddon, 2003). Mais de 40 espécies de begomovírus já foram relatadas infectando o tomateiro (Fauquet *et al.*, 2003). A emergência de novas espécies de begomovírus infectando o tomateiro nas Américas desde a década de 1980, associada à disseminação do biótipo B de *B. tabaci*, vem causando sérias perdas na produtividade dessa cultura (Polston e Anderson, 1997; Ribeiro *et al.*, 2003; Morales e Jones, 2004).

O primeiro relato de begomovírus associado à cultura do tomateiro no Brasil foi feito na década de 1970, e a espécie foi denominada *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) (Matyis *et al.*, 1975). Esse vírus não se estabeleceu nas áreas produtoras de tomate, muito provavelmente devido ao fato de que o biótipo A de *B. tabaci*, o único

existente naquela época no país, não coloniza eficientemente o tomateiro (Bellows *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1995). De fato, novos relatos de infecção natural do tomateiro pelo TGMV só foram feitos duas décadas depois no estado do Rio de Janeiro (Alfenas *et al.*, 1998).

A partir da década de 1990 houve um aumento considerável de relatos de begomovírus na cultura do tomateiro nas principais regiões produtoras do Brasil, provavelmente devido a presença do biótipo B de *B. tabaci*, relatado pela primeira vez em 1992 no estado de São Paulo (Melo, 1992) e que apresenta uma gama de hospedeiros mais ampla quando comparada ao biótipo A (incluindo o tomateiro), além de maior fecundidade e capacidade de dispersão (Bedford *et al.*, 1994; Santos *et al.*, 2004). Desde essa época, diversas novas espécies de begomovírus foram relatadas: *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), *Tomato infectious yellows virus* (TIYV), *Tomato mottle leaf curl virus* (TMoLCV), *Tomato crinkle leaf yellows virus* (TCrLYV), *Tomato crinkle virus* (TCrV), *Tomato yellow vein virus* (ToYVV) e *Tomato chlorotic vein virus* (TCIVV) (Faria *et al.*, 1997; Ribeiro *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2006; Inoue-Nagata *et al.*, 2006; Calegario *et al.*, 2007). Algumas destas espécies encontram-se amplamente distribuídas no país, enquanto outras estão restritas a algumas regiões. Todas as espécies detectadas até o presente são de ocorrência restrita ao Brasil, sugerindo a transferência de vírus nativos infectando plantas silvestres ou daninhas para o tomateiro, via inseto vetor. De fato, a caracterização biológica de algumas espécies (ToRMV, ToCMoV, ToYSV) confirmou que plantas daninhas como *Nicandra physaloides*, *Solanum nigrum* e *Datura stramonium* são hospedeiras (Fernandes *et al.*, 2006; Calegario *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007).

As espécies ToRMV, ToCMoV e ToYSV foram isoladas de tomateiros no estado de Minas Gerais e caracterizadas biológica e molecularmente (Andrade *et al.*, 2002; Fernandes *et al.*, 2006; Calegario *et al.*, 2007). Essas espécies, apesar de apresentarem características moleculares semelhantes, possuem propriedades biológicas distintas. A principal distinção consiste no grau de severidade dos sintomas induzidos em tomateiro e *N. benthamiana*, maior para o ToYSV, intermediário para o ToRMV e menor para o ToCMoV. Essa diferença no grau de severidade dos sintomas pode estar relacionada a pequenas diferenças na sequência de nucleotídeos do genoma viral, conferindo maior grau de adaptação do vírus ao hospedeiro. Uma maior adaptação ao hospedeiro pode ser consequência de uma interação mais eficiente entre fatores virais e do hospedeiro, levando a uma maior taxa de replicação na célula, movimento célula-a-célula e a longa distância mais rápido e eficiente, capacidade de invadir diferentes tecidos além do floema, no qual o vírus é inicialmente introduzido pelo inseto vetor (uma propriedade conhecida como tropismo de tecido) (Tyler e Fields, 1996; Petty *et al.*, 2000), maior eficiência na transmissão pelo vetor, e supressão mais eficiente dos mecanismos de defesa da planta (Bisaro, 2006). Em termos visuais, essa melhor adaptação do vírus ao hospedeiro se expressa na forma de uma manifestação de sintomas severos com um período latente curto, em comparação a um vírus pouco adaptado ao hospedeiro que induz sintomas atenuados com um período latente mais longo.

Curiosamente, apesar de ter sido isolado de tomateiro, o ToYSV apresenta características moleculares e filogenéticas mais próximas às de begomovírus isolados da planta daninha *Sida* sp., como o *Sida mottle virus* (SiMoV), *Sida yellow mosaic virus* (SiYMV) e *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV) (Fernandes *et al.*, 1999; Jovel *et al.*, 2004; Calegario *et al.*, 2007). Essa relação pode ser evidenciada principalmente quando

se comparam as sequências de aminoácidos das proteínas MP e NSP do ToYSV e do isolado B3 do SimMV: o nível de identidade é superior a 90% (Andrade *et al.*, 2006). De fato, o DNA-A do ToYSV tem uma origem recombinante, com o gene que codifica a proteína capsidial e suas sequências regulatórias derivadas de vírus que infectam *Sida*, e o módulo de replicação, incluindo a origem de replicação, derivado de um vírus não caracterizado (Andrade, 2006). Em conjunto, esses resultados sugerem que o ToYSV pode ser o resultado de eventos de recombinação e/ou pseudo-recombinação entre vírus que infectam *Sida*, transferido para o tomateiro pelo biótipo B de *B. tabaci*.

Apesar de induzir sintomas severos no hospedeiro natural (tomateiro) e no hospedeiro experimental *Nicotiana benthamiana*, levantamentos de campo realizados nos últimos anos indicam que as espécies ToRMV, ToCMoV, ToSRV e ToYVSV são muito mais freqüentes do que o ToYSV, principalmente na região Sudeste do Brasil (Ambrozevicius *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2003; Inoue-Nagata *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2008). Uma hipótese para a baixa prevalência do ToYSV em campo poderia ser uma menor eficiência de transmissão pelo inseto vetor.

No contexto atual do patossistema begomovírus-tomateiro, um maior entendimento da interação vírus-hospedeiro pode levar a novas estratégias de controle integrado destas viroses, incluindo medidas que promovam menor disseminação do vírus e do inseto vetor e a resistência do hospedeiro, seja ela natural ou derivada do patógeno. O objetivo deste trabalho foi analisar o papel de uma série de componentes da infecção (cinética do estabelecimento da infecção sistêmica, acúmulo de DNA viral, replicação viral em protoplastos e tropismo de tecido em plantas infectadas) na adaptação diferencial do ToYSV e ToRMV ao tomateiro e *Nicotiana benthamiana*.

REVISÃO DE LITERATURA

1. A família *Geminiviridae*

A família *Geminiviridae* é caracterizada pela morfologia de partículas icosaédricas geminadas e genoma composto por DNA de fita simples circular (Rojas *et al.*, 2005). Os geminivírus compreendem a segunda família mais numerosa entre os vírus de plantas, superada apenas pela família *Potyviridae* (Berger *et al.*, 2005). 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 monocotiledôneas. A espécie-tipo é o *Maize streak virus* (MSV), um vírus economicamente importante na cultura do milho no continente africano. O gênero *Curtovirus* inclui geminivírus com um componente genômico transmitidos por diferentes espécies de cigarrinhas (Homoptera:Cicadellidae) a plantas dicotiledôneas. O *Beet curly top virus* (BCTV) 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 transmitida pela cigarrinha *Micrutalis malleifera* (Homoptera:Auchenorrhyncha) a espécies dicotiledôneas. O gênero *Begomovirus* possui espécies transmitidas pelos diferentes biótipos de *Bemisia tabaci* a dicotiledôneas, e que apresentam um ou dois componentes genômicos (Stanley *et al.*, 2005). Begomovírus do Velho Mundo (Europa, Ásia, África e Oceania) são na sua maioria monossegmentados e estão, geralmente, associados a um DNA satélite denominado DNA beta (Briddon, 2003). Já os begomovírus do Novo Mundo (Américas) apresentam-se, na sua maioria, bissegmentados. O gênero *Begomovirus* possui 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), que causam doenças severas nas culturas do feijão, mandioca e tomate, respectivamente (Morales e Anderson, 2001; Varma e Malathi, 2003). Nas Américas o tomateiro é uma das espécies de plantas mais afetadas por begomovirose, com epidemias que podem levar a 100% de perdas e sérias consequências econômicas e sociais (Faria *et al.*, 2000; Morales e Anderson, 2001).

Os begomovírus que ocorrem nas Américas possuem genoma dividido em dois componentes denominados DNA-A e DNA-B, com comprimento semelhante de aproximadamente 2.600 nucleotídeos. Seu genoma contém capacidade limitada para codificar proteínas, dependendo de fatores do hospedeiro para replicação do DNA e movimento (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2004). 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 Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). Ambos os componentes são necessários para a infecção sistêmica de plantas. Exceto por uma região intergênica de aproximadamente 200 nucleotídeos, denominada região comum (RC), os dois componentes não apresentam identidade em suas seqüências de nucleotídeos. A RC contém a origem de replicação (*ori*) dos geminivírus, que inclui diversos elementos de seqüência altamente conservados entre as diferentes espécies do gênero que são reconhecidos pela proteína Rep (Argüello-Astorga *et al.*, 1994; Fontes *et al.*, 1994). A partir da região intergênica divergem os genes virais nos sentidos viral e complementar (Figura 1). Desta forma, a transcrição é bidirecional em cada componente.

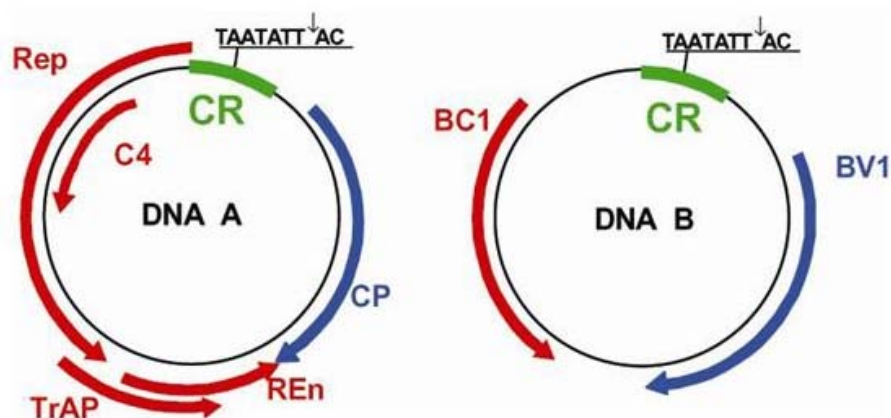


Figura 1. Representação esquemática do genoma do *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV), espécie-tipo do gênero *Begomovirus*. Os círculos representam o genoma viral, com dois componentes (DNA-A e DNA-B) de aproximadamente 2.600 nucleotídeos cada. Uma seqüência de aproximadamente 200 nucleotídeos denominada região comum (“common region”, CR) contém a origem de replicação viral, com uma estrutura em forma de grampo característica contendo a seqüência 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. 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)

As espécies do gênero *Begomovirus* têm o potencial de codificar de quatro a seis proteínas no DNA-A: uma proteína associada à replicação (Rep, “replication-associated protein”, anteriormente denominada AC1 ou AL1), iniciadora do mecanismo de replicação por círculo rolante, com propriedades de ligação a ácidos nucléicos, endonuclease e ATPase (Fontes *et al.*, 1992; Orozco *et al.*, 1997); uma proteína transativadora (Trap, “trans-activating protein”, anteriormente AC2 ou AL2), um fator transcricional dos genes *cp* e *nsp*, além de atuar como proteína supressora dos mecanismos de defesa da planta (Sunter e Bisaro, 1992; Voinnet *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2005); a proteína Ren (“replication-enhancer protein”, anteriormente AC3 ou AL3), fator acessório (não essencial) na replicação viral (Sunter *et al.*, 1990; Pedersen e Hanley-Bowdoin, 1994); e a proteína capsidial (CP, “coat protein”, anteriormente AV1 ou AR1), que além de formar o capsídeo viral é essencial para a transmissão do vírus pelo inseto vetor (Bridson *et al.*, 1990; Hofer *et al.*, 1997). Alguns begomovírus apresentam em seu genoma uma ORF denominada AC4, que codifica uma proteína supressora de silenciamento gênico (Vanitharani *et al.*, 2004). O DNA-B codifica as proteínas MP (“movement protein”, anteriormente BC1 ou BL1), envolvida no movimento célula-a-célula do vírus por meio do aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas (Noueiry *et al.*, 1994), e a proteína NSP (“nuclear shuttle protein”, anteriormente BV1 ou BR1), responsável pelo transporte do DNA através do envelope nuclear (Noueiry *et al.*, 1994; Sanderfoot *et al.*, 1996).

2. Replicação viral

No processo de infecção e replicação 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 de forma espontânea do capsídeo (Lazarowitz,

1992; Palmer e Rybicki, 1998). Em seguida o DNA viral é transportado para o núcleo da célula hospedeira, onde é convertido em um intermediário de fita dupla (dsDNA), designado forma replicativa, ou RF. A maneira como esta conversão ocorre não é conhecida, porém evidências indiretas indicam que é realizada por fatores do hospedeiro. A RF serve como molde para síntese de novos ssDNA e dos mRNAs virais. O genoma viral é replicado por meio de um mecanismo conhecido por círculo rolante, semelhante ao utilizado pelos bacteriófagos ϕ X174 e M13, utilizando a RF como molde (Stanley, 1995). Existem evidências que sugerem um mecanismo alternativo de replicação para os geminivírus denominado replicação dependente de recombinação (RDR) (Jeske *et al.*, 2001).

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

O sítio de ligação de Rep ao DNA viral está localizado entre a caixa TATA do gene *rep* e a SCE (Orozco e Hanley-Bowdoin, 1998), sendo constituído por duas seqüências em repetição direta (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).

3. Movimento do vírus na planta

O estabelecimento de um processo infeccioso na planta depende da capacidade do vírus de replicar na primeira célula infectada e em seguida mover-se sistemicamente, alcançando inicialmente as células vizinhas e por fim os tecidos distantes da célula inicialmente infectada. O movimento no interior do hospedeiro pode ser dividido em dois processos: movimento célula-a-célula, via plasmodesmas, e movimento a longa distância, no qual o vírus atinge o sistema vascular e é transportado sistemicamente para toda a planta hospedeira. Para isto, os begomovírus com dois componentes codificam a partir do DNA-B duas proteínas relacionadas ao movimento viral. A proteína MP associa-se à parede 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 (Palmer e Rybicki, 1998), que é realizada pela proteína NSP. Esta proteína atua cooperativamente com MP para movimentar o DNA viral de célula-a-célula através da parede celular (Sanderfoot e Lazarowitz, 1995). As duas proteínas são requeridas para o estabelecimento de uma infecção sistêmica.

Tanto MP quanto NSP reconhecem o DNA 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 já estudados (Rojas *et al.*, 2005). Entretanto, trabalhos realizados por Galvão *et al.* (2003) demonstraram que o DNA-A do *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), na ausência do DNA-B, não foi capaz de infectar plantas de tomateiro, mas infectou sistemicamente e induziu sintomas em plantas de *N. benthamiana*, apresentando acúmulo de DNA viral nas folhas apicais. O DNA-A de outros begomovírus bissegmentados, como o *Abutilon mosaic virus* (AbMV) e o *African cassava mosaic virus* (ACMV), também tem a capacidade de infectar sistemicamente *N. benthamiana* na ausência do DNA-B (Klinkenberg e Stanley, 1990; Evans e Jeske, 1993). Nesses casos, a proteína CP provavelmente exerce a função de movimento. Em apoio a essa hipótese, a proteína capsidial é essencial para o processo de infecção sistêmica do begomovírus monossegmentado *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). Para esse vírus, a CP é responsável pelo transporte do DNA viral do núcleo para o citoplasma, atuando de forma análoga à NSP dos begomovírus bissegmentados (Rojas *et al.*, 2001), e o movimento célula-a-célula através dos plasmodesmas é mediado pelas proteínas C4 e/ou V1 (Rojas *et al.*, 2001).

Os geminivírus normalmente se restringem às células associadas ao floema, que são os sítios de alimentação do inseto vetor. Entretanto, alguns begomovírus são capazes de infectar, além dos feixes vasculares, os tecidos associados ao mesofilo. O tropismo de tecido é dependente do hospedeiro e de fatores genéticos virais (Wege e Pohl, 2007). Trabalhos de complementação e recombinação entre os begomovírus *Bean golden mosaic virus* (BGMV), um vírus que infecta feijoeiro mas não infecta tomateiro, e *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), um vírus que infecta tomateiro e é restrito ao floema em feijoeiro, identificaram as regiões correspondentes aos genes *trap*, *nsp/mp* e a região reguladora da transcrição do gene *nsp*, denominada BRi, como determinantes virais para o tropismo de tecidos em plantas de feijoeiro e *N. benthamiana* (Morra e

Petty, 2000). No hospedeiro comum *N. benthamiana*, o TGMV induz sintomas severos e infecta células do floema e do mesofilo. Já o BGMV não induz sintomas e permanece limitado às células do floema. Fragmentos do genoma viral correspondentes aos genes supracitados foram permutados formando vírus híbridos entre o TGMV e BGMV. Regiões do genoma do TGMV inseridas no genoma do BGMV foram responsáveis pela mudança do tropismo de tecido deste vírus em *N. benthamiana*, tornando-o capaz de invadir células do mesofilo. Efeito contrário foi observado quando regiões do genoma do BGMV foram inseridas no genoma do TGMV: os híbridos correspondentes a estas mudanças tornaram-se incapazes de invadir o mesofilo (Morra e Petty, 2000).

O tropismo de tecido é dependente também de fatores do hospedeiro, pois embora o TGMV infecte o mesofilo de *N. benthamiana*, esse vírus é restrito ao floema em feijoeiro. Entretanto, os fatores do hospedeiro que determinam essa característica ainda não foram identificados (Morra e Petty, 2000). Estudos semelhantes realizados com duas estirpes de TGMV que induzem sintomas distintos identificaram uma região compreendendo a região 3' do gene codificador da proteína MP e a região intergênica do DNA-B (que não inclui a região BRi) como responsável pela diferença nos sintomas induzidos pelas duas estirpes (Saunders *et al.*, 2001).

4. Interações geminivírus-hospedeiro

Além de apresentarem grande importância econômica como fitopatógenos, os geminivírus possuem características que os tornam atraentes para o estudo da interação vírus-hospedeiro: genoma pequeno composto de DNA circular de fita dupla, e replicação no núcleo da célula hospedeira utilizando diversos componentes da maquinaria de replicação da planta. Além disso, o genoma de DNA é facilmente

manipulado por métodos de clonagem molecular, e existem métodos eficientes de inoculação independentes do vetor natural (Rojas *et al.*, 2005).

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

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

acúmulo de PCNA, mas também interferem com a regulação do ciclo celular. A interação entre Rep e componentes reguladores do ciclo celular de plantas foi revisada por Gutierrez *et al.* (2004). A outra proteína viral envolvida na replicação, Ren, interage com a proteína SINAC1, pertencente à família de fatores de transcrição que possuem domínio NAC (“no apical meristem, *Arabidopsis thaliana* factor, cup-shaped cotyledon”), o que também está correlacionando com aumento no acúmulo de DNA viral. Ren interage e induz a expressão de SINAC1, um ativador da transcrição de genes em plantas (Selth *et al.*, 2005).

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

Utilizando o sistema duplo-híbrido de levedura foi possível demonstrar que a proteína Trap inativa uma proteína cinase, designada SNF1 (“sucrose non-fermenting 1”). Essa inativação leva a um aumento na suscetibilidade da planta, por ser a cinase SNF1 um regulador chave de respostas a estresses celulares que reduzem a disponibilidade de ATP (Hao *et al.*, 2003). Trap também interage e inativa outra cinase, ADK (“adenosine kinase”), responsável pela síntese de 5'-AMP a partir de adenosina e

ATP (Wang *et al.*, 2003). As duas interações provavelmente estão interligadas, pois SNF1 é ativada por 5'-AMP. O fato de Trap interagir com SNF1 e ADK sugere que as respostas metabólicas mediadas por SNF1 são um componente importante da resposta de defesa a vírus, e que os geminivírus desenvolveram uma estratégia de contra-ataque baseada na inativação de dois componentes iniciais dessa via de defesa (SNF1 e ADK). Esses resultados demonstram ainda que genes responsáveis por processos metabólicos primários (“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 em nível pós-transcricional, por meio da degradação seqüência-específica de mRNAs alvos (Baulcombe, 2004; Voinnet, 2005). O silenciamento de RNA constitui também um mecanismo eficiente de defesa de plantas contra vírus (Vance e Vaucheret, 2001). Proteínas virais com a capacidade de suprimir o silenciamento de RNA em diferentes pontos da via metabólica já foram identificadas em um grande número de vírus de plantas e mesmo em alguns vírus de animais (Roth *et al.*, 2004). No caso dos geminivírus, as proteínas Trap e AC4 já foram identificadas como supressoras de silenciamento (Voinnet *et al.*, 1999; Van Wezel *et al.*, 2001; Vanitharani *et al.*, 2004; Trinks *et al.*, 2005; revisado por Bisaro, 2006). O papel diferenciado de Trap e AC4 na supressão de silenciamento pode conferir características distintas ao desenvolvimento da doença causada por diferentes espécies de geminivírus (Vanitharani *et al.*, 2004). Embora o mecanismo de atuação dessas proteínas ainda não tenha sido elucidado, resultados recentes demonstram uma relação de causa e efeito entre a inativação da cinase ADK e a supressão de silenciamento, ambas mediadas por Trap (Wang *et al.*, 2005). Esses resultados sugerem que a atividade de ADK é necessária para o

silenciamento, e que os geminivírus suprimem a resposta de defesa via inibição de ADK. De fato, a proteína Trap pode interagir com ela mesma, formando dímeros com localização nuclear, ou interagir com ADK, formando complexos Trap/ADK e suprimindo o silenciamento gênico local (Yang *et al.*, 2007).

Interações envolvendo as proteínas de movimento MP e NSP também já foram relatadas. McGarry *et al.* (2003) identificaram e caracterizaram funcionalmente uma acetiltransferase de *Arabidopsis*, denominada AtNSI, que interage diretamente com a proteína NSP do *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV). A proteína é altamente conservada em plantas, possui localização nuclear, pode acetilar as histonas H2A e H3 *in vitro*, e também acetila a proteína capsidial viral, mas não a proteína NSP. Além disso, não atua como um coativador transcricional *in vitro*. Esta acetiltransferase regula o transporte núcleo-citoplasma do genoma viral e outros eventos nucleares não-transcricionais.

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

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

5. Begomovírus em tomateiro no Brasil

A cultura do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. = *Lycopersicon esculentum* Mill.) é uma das mais afetadas pelos geminivírus (Polston e Anderson, 1997; Ribeiro *et al.*, 1998; Moriones e Navas-Castillo, 2000; Morales e Anderson, 2001). Mais de 40 espécies de geminivírus, a maioria pertencente ao gênero *Begomovirus*, são capazes de infectar o tomateiro. Desde a década de 1980, perdas substanciais têm sido relatadas em diversas regiões das Américas, incluindo-se os EUA, México, Caribe, América Central e Venezuela, como resultado de infecção por begomovírus (Polston e Anderson, 1997). Nos Estados Unidos, o *Tomato mottle virus* (ToMoV) causou perdas na ordem de milhões de dólares no estado da Flórida durante a década de 1990 (Varma e Malathi, 2003). No México, diversos geminivírus que infectam tomateiros foram descritos nos últimos vinte anos (Brown e Nelson, 1988; Brown e Poulos, 1990; Torres-Pacheco *et al.*, 1993; Paplomatas *et al.*, 1994). Na Nicarágua, o *Tomato leaf curl Nicaragua virus* (ToLCNV) e outras três espécies de begomovírus causaram epidemias na década de 1980 com perdas próximas a 100% em várias regiões do país (Rojas *et al.*, 2000).

Em 1994, a presença do *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) foi confirmada na República Dominicana (Nakhla *et al.*, 1994). O TYLCV é um begomovírus monossegmentado cuja ocorrência estava até então restrita ao Mediterrâneo. A análise molecular de isolados de TYLCV obtidos na República Dominicana indicou que o vírus foi provavelmente introduzido via mudas infectadas importadas de Israel (Polston *et al.*,

1994; Salati *et al.*, 2002). A presença do TYLCV na República Dominicana levou à quase eliminação da tomaticultura no país, com perdas superiores a 90% nos anos de 1995, 1996 e 1997. Uma estratégia agressiva de controle, baseada em um período livre de tomateiro (e de outros hospedeiros da mosca-branca) permitiu o retorno da atividade a partir de 1998 (Salati *et al.*, 2002).

O TYLCV já foi disseminado para Porto Rico, Cuba, México e EUA, provavelmente de forma natural (Ramos *et al.*, 1996; Bird *et al.*, 2001; Ascencio-Ibáñez *et al.*, 1999; Polston *et al.*, 2001). A presença do vírus nesses países causou uma grande mudança no quadro epidemiológico das begomoviroses em tomateiro, pois o TYLCV é um vírus que induz sintomas severos e cuja presença tende a deslocar os vírus nativos presentes anteriormente. Em 2007 o TYLCV foi relatado na Venezuela (Zambrano *et al.*, 2007). O vírus ainda não foi relatado no Brasil, e sua introdução seria motivo para grande preocupação.

O primeiro relato de begomovírus em tomateiro no Brasil foi feito por Costa *et al.* (1975). Matyis *et al.* (1975) identificaram o vírus em questão e o denominaram *Tomato golden mosaic virus* (TGMV). Curiosamente, após esse relato inicial, a incidência do TGMV em tomateiro não acompanhou o aumento populacional de *Bemisia tabaci* observado no Brasil ao longo das décadas de 1970 e 1980. De fato, o TGMV não foi relatado em tomateiros no Brasil durante mais de 20 anos, até ser encontrado na região de Campos, RJ (Alfenas *et al.*, 1998). Isso provavelmente ocorreu porque o biótipo A de *B. tabaci*, o único relatado no Brasil até 1992, coloniza o tomateiro com baixa eficiência (Bedford *et al.*, 1994).

A partir de 1992, no estado de São Paulo, constatou-se um novo biótipo (biótipo B) de *B. tabaci*, provavelmente introduzido pela importação de plantas ornamentais da Europa ou dos EUA (Melo, 1992). Comparado ao biótipo A, o biótipo B de *B. tabaci*

apresenta maior grau de adaptação, maior fecundidade e dispersão, além da gama de hospedeiros mais ampla, que inclui solanáceas (como o tomateiro) e diversas espécies de plantas silvestres e daninhas (Bedford *et al.*, 1994).

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

Relatos adicionais de begomovírus em tomateiro foram feitos em São Paulo por Faria *et al.* (1997), que descreveram o *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV), no Rio de Janeiro (Galvão *et al.*, 1997), e na região Nordeste, em amostras de tomateiro provenientes da Bahia (Ribeiro *et al.*, 1996) e de Pernambuco (Bezerra *et al.*, 1997). Em 1997 a doença foi relatada no submédio São Francisco, na época a principal região produtora de tomate para processamento industrial no Brasil, acarretando perdas de até 100% em diversas áreas e levando ao abandono da tomaticultura intensiva na região (Bezerra *et al.*, 1997). O aparecimento do vírus ocorreu, em todos esses casos, logo após a introdução do biótipo B de *B. tabaci*.

No Triângulo Mineiro, uma nova espécie de begomovírus foi identificada em tomateiros em 1996 (Rezende *et al.*, 1996; Fernandes *et al.*, 1996). A comparação da sequência completa de nucleotídeos do DNA-A e -B com as de outros begomovírus comprovou tratar-se de uma nova espécie, denominada *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) (Ribeiro *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2006). Levantamento de campo

realizado em junho de 2000 nos municípios de Araguari, Indianópolis e Uberlândia indicou a prevalência do ToRMV, detectado em 73% das 148 amostras coletadas e positivas para begomovírus (Fernandes, 2001). O ToRMV foi caracterizado biológica e molecularmente (Fernandes *et al.*, 2006).

Na Zona Metalúrgica de Minas Gerais, outro begomovírus foi isolado de amostras de tomateiro no mesmo ano (Zerbini *et al.*, 1996). A comparação da sequência completa de nucleotídeos do DNA-A e -B com outros begomovírus (incluindo o TCIVV, ToYVSV e ToRMV) demonstrou tratar-se de nova espécie, designada *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) (Andrade *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2003). A identidade de sequência entre o ToCMoV e o ToRMV é de aproximadamente 85% para o DNA-A e 80% para o DNA-B, indicando tratar-se de vírus distintos, porém altamente relacionados. Outros isolados do ToCMoV foram identificados no Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia e Pernambuco (Ribeiro *et al.*, 2003). O isolado da Bahia foi caracterizado biológica e molecularmente (Ribeiro *et al.*, 2007).

Além do ToRMV e ToCMoV, um isolado de begomovírus foi detectado em São Joaquim de Bicas, Minas Gerais, causando sintomas severos em tomateiro. Esse isolado, inicialmente denominado “C12” (Ambrozevicius *et al.*, 2002), foi posteriormente renomeado “MG-Bi2”, a fim de padronizar a nomenclatura de isolados brasileiros de begomovírus infectando o tomateiro (Ribeiro *et al.*, 2003). O isolado MG-Bi2 foi caracterizado biológica e molecularmente, demonstrando tratar-se de uma nova espécie denominada *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) (Calegario *et al.*, 2007). O ToYSV causa sintomas mais severos em tomateiro do que aqueles ocasionados pelo ToRMV e ToCMoV (Ambrozevicius *et al.*, 2002). Plantas de tomateiro infectadas pelo ToYSV apresentam mosaico amarelo intenso e subcrescimento acentuado, com redução de área foliar e enrolamento foliar. Curiosamente, apesar de ter sido isolado de

tomateiro, o ToYSV apresenta relacionamento filogenético mais próximo com begomovírus isolados de *Sida* sp., como o *Sida mottle virus* (SiMoV), *Sida yellow mosaic virus* (SiYMV) e *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV) (Andrade *et al.*, 2006).

Estes relatos, considerados em conjunto, indicam claramente que a emergência de novos begomovírus em tomateiros no Brasil foi favorecida pela rápida disseminação do biótipo B de *B. tabaci* (Lourenção e Nagai, 1994; Haji *et al.*, 1999). Agindo como vetor, o inseto teria permitido que vírus nativos infectando plantas silvestres e daninhas chegassem ao tomateiro e se adaptassem ao novo hospedeiro em um rápido processo evolutivo, culminando com o surgimento de novas espécies. Estudos anteriores realizados no México e nos EUA sugerem que esse processo de evolução e adaptação pode ocorrer em períodos de tempo da ordem de 5-10 anos (Hou e Gilbertson, 1996; Torres-Pacheco *et al.*, 1996).

A recombinação e a pseudo-recombinação são os processos mais comumente associados à geração de diversidade genética e à evolução de begomovírus (Padidam *et al.*, 1999; Rojas *et al.*, 2005). Evidências de ambos os mecanismos já foram encontradas em associação ao complexo de begomovírus infectando o tomateiro no Brasil. Galvão *et al.* (2003) e Ribeiro *et al.* (2007) sugeriram que os isolados MG-Bt1 e BA-Se1, respectivamente, do ToCMoV, possuem origem recombinante. Andrade *et al.* (2006) demonstraram a formação de pseudorecombinantes viáveis entre clones infecciosos do TGMV (DNA-A) e ToYSV (DNA-B), e entre o ToYSV (DNA-A) e o Tomato crinkle leaf yellows virus (ToCrLYV) (DNA-B). Além disso, Fernandes *et al.* (2006) encontraram evidência de pseudo-recombinação entre o ToRMV e um novo vírus, em condições naturais (planta infectada no campo).

É possível que após a verdadeira explosão na incidência de begomovírus que ocorreu com a introdução do biótipo B de *B. tabaci* no Brasil, uma ou poucas espécies

que se mostrem mais adaptadas ao novo hospedeiro passem a predominar. De fato, levantamentos realizados nos últimos cinco anos (Inoue-Nagata *et al.*, 2004; 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: ToYVSV em São Paulo, ToRMV e ToCMoV em Minas Gerais, ToSRV e ToYVSV em Goiás. Entretanto, novas espécies continuam a ser relatadas infectando o tomateiro (Pires *et al.*, 2004; Castillo-Urquiza *et al.*, 2007), sugerindo que o processo de transferência de vírus nativos para o tomateiro, com a conseqüente evolução de novas espécies, continua ocorrendo.

LITERATURA CITADA

- Agriannual. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Agroinformativos. 2007. 491 p.
- Alfenas, P.C., Galvão, R.M., Andrade, E.C., Mandelli, M.S., Fernandes, A.V., Zerbini, F.M. e Fontes, E.P.B. Detecção e caracterização molecular de novos geminivírus que infectam tomateiros. *Fitopatologia Brasileira*, v.23, p.311. 1998.
- Ambrozevicius, L.P., Calegario, R.F., Fontes, E.P.B., Carvalho, M.G. e Zerbini, F.M. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v.27, p.372-377. 2002.
- Andrade, E.C. Análise de determinantes virais envolvidos na indução diferencial de sintomas por begomovírus em tomateiro e *Nicotiana benthamiana*. (Tese D.S.). Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006. 87 p.
- Andrade, E.C., Ambrozevicius, L.P., Calegario, R.F., Fontes, E.P.B. e Zerbini, F.M. Molecular cloning and characterization of *Tomato chlorotic mottle virus* (TCMV), a new tomato-infecting begomovirus. *Virus Reviews and Research*, v.7, p.153. 2002.
- Andrade, E.C., Manhani, G.G., Alfenas, P.F., Calegario, R.F., Fontes, E.P.B. e Zerbini, F.M. *Tomato yellow spot virus*, a tomato-infecting begomovirus from Brazil with a closer relationship to viruses from *Sida* sp., forms pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from *Sida*. *Journal of General Virology*, v.87, p.3687-3696. 2006.
- Argüello-Astorga, G., Herrera-Estrella, L. e Rivera-Bustamante, R. Experimental and theoretical definition of geminivirus origin of replication. *Plant Molecular Biology*, v.26, p.553-556. 1994.
- Arguello-Astorga, G., Lopez-Ochoa, L., Kong, L.J., Orozco, B.M., Settlege, S.B. e Hanley-Bowdoin, L. A novel motif in geminivirus replication proteins interacts with the plant retinoblastoma-related protein. *Journal of Virology*, v.78, p.4817-4826. 2004.
- Ascencio-Ibáñez, J.T., Diaz-Plaza, R., Méndez-Lozano, J., Monsalve-Fonnegra, Z.I., Argüello-Astorga, G.R. e Rivera-Bustamante, R.F. First report of tomato yellow leaf curl geminivirus in Yucatán, México. *Plant Disease*, v.83, p.1178. 1999.
- Baulcombe, D. RNA silencing in plants. *Nature*, v.431, p.356-363. 2004.
- Bedford, I.D., Briddon, R.W., Brown, J.K., Rosell, R.C. e Markham, P.G. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographical regions. *Annals of Applied Biology*, v.125, p.311-325. 1994.
- Bellows, T.S., Perring, T.M., Gill, R.J. e Headrick, D.H. Description of a new species of *Bemisia*. *Annals of the Entomological Society of America*, v.87, p.195-206. 1994.
- Berger, P.H., Adams, M.J., Barnett, O.W., Brunt, A.A., Hammond, J., Hill, J.H., Jordan, R.L., Kashiwazaki, S., Rybicki, E.P., Spence, N., Stenger, D.C., Ohki, S.T., Uyeda, I., Van Zaayen, A., Valkonen, J.P. e Vetten, H.J. Family *Potyviridae*. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. e Ball, L.A. (Ed.). *Virus Taxonomy*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p.819-841.

- Bezerra, I.C., Lima, M.F., Ribeiro, S.G., Giordano, L.B., Zerbini, F.M. e Ávila, A.C. Occurrence of geminivirus in tomato-producing areas in Submédio São Francisco. *Fitopatologia Brasileira*, v.22, p.331. 1997.
- Bezerra, I.C., Ribeiro, S.G., Ávila, A.C. e Giordano, L.B. Survey of geminivirus infection in tomato producing areas in Federal District. VIII Encontro Nacional de Virologia. São Lourenço, MG, 1996. 289 p.
- Bird, J., Idris, A.M., Rogan, D. e Brown, J.K. Introduction of the exotic *Tomato yellow leaf curl virus-Israel* in tomato to Puerto Rico. *Plant Disease*, v.85, p.1028. 2001.
- Bisaro, D.M. Silencing suppression by geminivirus proteins. *Virology*, v.344, p.158-168. 2006.
- Briddon, R.W. Cotton leaf curl disease, a multicomponent begomovirus complex. *Molecular Plant Pathology*, v.4, p.427-434. 2003.
- Briddon, R.W., Pinner, M.S., Stanley, J. e Markham, P.G. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology*, v.177, p.85-94. 1990.
- Brown, J.K., Coats, S., Frohlich, D.R., Bedford, I.D. e Markham, P.G. Characterization and distribution of esterase electromorphs in the whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae). *Biochemistry and Genetics*, v.33, p.205-214. 1995.
- Brown, J.K. e Nelson, M.R. Transmission, host range, and virus-vector relationships of chilo del tomate virus, a whitefly-transmitted geminivirus from Sinaloa, Mexico. *Plant Disease*, v.72, p.866-869. 1988.
- Brown, J.K. e Poulos, B.T. Serrano golden mosaic virus: A newly identified whitefly-transmitted geminivirus of pepper and tomato in the United States and Mexico. *Plant Disease*, v.74, p.720. 1990.
- Calegario, R.F., Ferreira, S.S., Andrade, E.C. e Zerbini, F.M. Characterization of *Tomato yellow spot virus*, (ToYSV), a novel tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.42, p.1335-1343. 2007.
- Castillo-Urquiza, G.P., Beserra Junior, J.E.A., Alfenas-Zerbini, P., Varsani, A., Lima, A.T.M., Barros, D.R. e Zerbini, F.M. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato in Paty do Alferes, Rio de Janeiro state, Brazil. *Virus Reviews and Research*, v.12, p.233. 2007.
- Costa, A.S., Oliveira, A.R. e Silva, D.M. Transmissão mecânica do mosaico dourado do tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, v.6, p.147. 1975.
- Cotrim, M.A., Krause-Sakate, R., Narita, N., Zerbini, F.M. e Pavan, M.A. Diversidade genética de begomovirus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. *Summa Phytopathologica*, v.33, p.300-303. 2007.
- Durrant, W.E. e Dong, X. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, v.42, p.185-209. 2004.
- Egelkrou, E.M., Robertson, D. e Hanley-Bowdoin, L. Proliferating cell nuclear antigen transcription is repressed through an E2F consensus element and activated by geminivirus infection in mature leaves. *Plant Cell*, v.13, p.1437-1452. 2001.
- Evans, D. e Jeske, H. Complementation and recombination between mutants of complementary sense genes of DNA-A of Abutilon mosaic virus. *Virology*, v.197, p.492-496. 1993.

- Faria, J.C., Bezerra, I.C., Zerbini, F.M., Ribeiro, S.G. e Lima, M.F. Situação atual das geminiviruses no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v.25, p.125-137. 2000.
- Faria, J.C., Souza-Dias, J.A.C., Slack, S. e Maxwell, D.P. A new geminivirus associated with tomato in the State of São Paulo, Brazil. *Plant Disease*, v.81, p.423. 1997.
- Fauquet, C.M., Bisaro, D.M., Briddon, R.W., Brown, J.K., Harrison, B.D., Rybicki, E.P., Stenger, D.C. e Stanley, J. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family *Geminiviridae*, and an updated list of begomovirus species. *Archives of Virology*, v.148, p.405-421. 2003.
- Fernandes, A.V., Galvão, R.M., Machado, J.J., Zerbini, F.M. e Fontes, E.P.B. Cloning and molecular characterization of A components of two new *Sida rhombifolia*-infecting geminiviruses. *Virus Reviews and Research*, v.4, p.148. 1999.
- Fernandes, F.R., Albuquerque, L.C., Giordano, L.B., Boiteux, L.S., Ávila, A.C. e Inoue-Nagata, A.K. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes*, v.36, p.251-258. 2008.
- Fernandes, J.J. Caracterização e diversidade genética de geminivírus associados ao tomateiro na região do Triângulo Mineiro. (Tese D.S.). Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001. 192 p.
- Fernandes, J.J., Carvalho, M.G., Andrade, E.C., Brommonschenkel, S.H., Fontes, E.P.B. e Zerbini, F.M. Biological and molecular properties of Tomato rugose mosaic virus (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Plant Pathology*, v.55, p.513-522. 2006.
- Ferreira, S.S., Alfenas, P.F., Lima, A.T.M., Barros, D.R., Senna, L. e Zerbini, F.M. Detecção de begomovírus em tomateiro no município de Paty de Alferes, Rio de Janeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v.30, p.S183. 2005.
- Florentino, L.H., Santos, A.A., Fontenelle, M.R., Pinheiro, G.L., Zerbini, F.M., Baracat-Pereira, M.C. e 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.
- Fontes, E.P.B., Eagle, P.A., Sipe, P.S., Luckow, V.A. e Hanley-Bowdoin, L. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. *Journal of Biological Chemistry*, v.269, p.8459-8465. 1994.
- Fontes, E.P.B., Luckow, V.A. e Hanley-Bowdoin, L. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. *Plant Cell*, v.4, p.597-608. 1992.
- Fontes, E.P.B., Santos, A.A., Luz, D.F., Waclawovsky, A.J. e Chory, J. The geminivirus nuclear shuttle protein is a virulence factor that suppresses transmembrane receptor kinase activity. *Genes & Development*, v.18, p.2545-2556. 2004.
- França, F.H., Villas-Boas, G.L. e Castelo-Branco, M. Ocorrência de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera:Aleyrodidae) no Distrito Federal. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v.25, p.369-372. 1996.
- Galvão, R.M., Almeida, J.A., Camini, N., Zerbini, F.M. e Fontes, E.P.B. Molecular detection and biobalistic propagation of novel Malvaceae- and tomato-infecting geminiviruses. *Fitopatologia Brasileira*, v.22, p.335. 1997.
- Galvão, R.M., Mariano, A.C., Luz, D.F., Alfenas, P.F., Andrade, E.C., Zerbini, F.M., Almeida, M.R. e Fontes, E.P.B. A naturally occurring recombinant DNA-A of a

- typical bipartite begomovirus does not require the cognate DNA-B to infect *Nicotiana benthamiana* systemically. *Journal of General Virology*, v.84, p.715-726. 2003.
- Gilbertson, R.L., Sudarshana, M., Jiang, H., Rojas, M.R. e Lucas, W.J. Limitations on geminivirus genome size imposed by plasmodesmata and virus-encoded movement protein: Insights into DNA trafficking. *Plant Cell*, v.15, p.2578-2591. 2003.
- Gutierrez, 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. e Missich, R. Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. *Veterinary Microbiology*, v.98, p.111-119. 2004.
- Haji, F.N.P., Lima, M.F., Mattos, M.A., Nunes, A.M., Alencar, J.A. e Barbosa, F.R. Levantamento de plantas hospedeiras de mosca-branca (*Bemisia* spp.) no Submédio do Vale São Francisco nos anos de 1996 a 1998. VIII Simpósio Latino-Americano e do Caribe sobre Moscas Brancas e Geminivírus. Recife, Brazil. 17-20 Out. 1999. p. R21.
- Hanley-Bowdoin, L., Settlage, S.B., Orozco, B.M., Nagar, S. e Robertson, D. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.18, p.71-106. 1999.
- Hanley-Bowdoin, L., Settlage, S.B. e Robertson, D. Reprogramming plant gene expression: a prerequisite to geminivirus DNA replication. *Molecular Plant Pathology*, v.5, p.149-156. 2004.
- Hao, L., Wang, H., Sunter, G. e Bisaro, D.M. Geminivirus AL2 and L2 proteins interact with and inactivate SNF1 kinase. *Plant Cell*, v.15, p.1034-1048. 2003.
- Hofer, P., Bedford, I.D., Markham, P.G., Jeske, H. e Frischmuth, T. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. *Virology*, v.236, p.288-295. 1997.
- Hou, Y.M. e Gilbertson, R.L. Increased pathogenicity in a pseudorecombinant bipartite geminivirus correlates with intermolecular recombination. *Journal of Virology*, v.70, p.5430-5436. 1996.
- Inoue-Nagata, A.K., Giordano, L.B., Fonseca, M.E.N., Ribeiro, S.G., Ávila, A.C., Albuquerque, L.C. e Boiteux, L.S. Occurrence of begomovirus in tomato and other plants in Central Brazil. 4th International Geminivirus Symposium (Programme and Abstracts). Cape Town, South Africa, 2004. p. W3-3.
- Inoue-Nagata, A.K., Martin, D.P., Boiteux, L.S., Giordano, L.D., Bezerra, I.C. e De Avila, A.C. New species emergence via recombination among isolates of the Brazilian tomato infecting Begomovirus complex. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.41, p.1329-1332. 2006.
- Jeske, H., Lutgemeier, M. e Preiss, W. DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of Abutilon mosaic virus. *EMBO Journal*, v.20, p.6158-6167. 2001.

- Jovel, J., Reski, G., Rothenstein, D., Ringel, M., Frischmuth, T. e 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.
- Kjemtrup, S., Sampson, K.S., Peele, C., Nguyen, L., Conkling, M., Thompson, W. e Roberson, D. Gene silencing from DNA carried by a geminivirus. *Plant Journal*, v.14, p.91-100. 1998.
- Klinkenberg, F.A. e Stanley, J. Encapsidation and spread of *African cassava mosaic virus* DNA-A in the absence of DNA-B when agroinoculated to *Nicotiana benthamiana*. *Journal of General Virology*, v.71, p.1409-1412. 1990.
- Latham, J.R., Saunders, K., Pinner, M.S. e Stanley, J. Induction of plant cell division by beet curly top virus gene C4. *Plant Journal*, v.11, p.1273-1283. 1997.
- Laufs, J., Schumacher, S., Geisler, N., Jupin, I. e Gronenborn, B. Identification of the nicking tyrosine of geminivirus Rep protein. *FEBS Letters*, v.377, p.258-262. 1995.
- Lazarowitz, S.G. Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.11, p.327-349. 1992.
- Lourenção, A.L. e Nagai, H. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. *Bragantia*, v.53, p.53-59. 1994.
- Mansoor, S., Briddon, R.W., Zafar, Y. e Stanley, J. Geminivirus disease complexes: An emerging threat. *Trends in Plant Science*, 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., Brommonchenkel, S.H. e Fontes, E.P.B. Identification of a novel receptor-like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein. *Virology*, v.318, p.24-31. 2004.
- Matyis, J.C., Silva, D.M., Oliveira, A.R. e Costa, A.S. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. *Summa Phytopathologica*, v.1, p.267-275. 1975.
- Mcgarry, R.C., Barron, Y.D., Carvalho, M.F., Hill, J.E., Gold, D., Cheung, E., Kraus, W.L. e Lazarowitz, S.G. A novel Arabidopsis acetyltransferase interacts with the geminivirus movement protein NSP. *Plant Cell*, v.15, p.1605-1618. 2003.
- Melo, P.C.T. Mosca branca ameaça produção de hortaliças. Campinas, SP, Brazil: Asgrow do Brasil Sementes Ltda., Technical Bulletin 1992.
- Monci, F., Sanchez-Campos, S., Navas-Castillo, J. e Moriones, E. A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Virology*, v.303, p.317-326. 2002.
- Morales, F.J. e Anderson, P.K. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology*, v.146, p.415-441. 2001.
- Morales, F.J. e Jones, P.G. The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. *Virus Research*, v.100, p.57-65. 2004.
- Moriones, E. e Navas-Castillo, J. *Tomato yellow leaf curl virus*, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Research*, v.71, p.123-134. 2000.
- Morra, M.R. e Petty, I.T.D. Tissue specificity of geminivirus infection is genetically determined. *Plant Cell*, v.12, p.2259-2270. 2000.

- Nagar, S., Hanley-Bowdoin, L. e Robertson, D. Host DNA replication is induced by geminivirus infection of differentiated plant cells. *Plant Cell*, v.14, p.2995-3007. 2002.
- Nagar, S., Pedersen, T.J., Carrick, K.M., Hanley-Bowdoin, L. e Robertson, D. A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. *Plant Cell*, v.7, p.705-719. 1995.
- Nakhla, M.K., Maxwell, D.P., Martinez, R.T., Carvalho, M.G. e Gilbertson, R.L. Widespread occurrence of eastern Mediterranean "strain" of tomato yellow leaf curl geminivirus in tomatoes in the Dominican Republic. *Plant Disease*, v.78, p.926. 1994.
- Naranjo, S.E. e Ellsworth, P.C. Challenges and opportunities for pest management of *Bemisia tabaci* in the new century. *Crop Protection*, v.20, p.707. 2001.
- Noueiry, A.O., Lucas, W.J. e Gilbertson, R.L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell*, v.76, p.925-932. 1994.
- Orozco, B.M. e Hanley-Bowdoin, L. A DNA structure is required for geminivirus replication origin function. *Journal of Virology*, v.70, p.148-158. 1996.
- Orozco, B.M. e Hanley-Bowdoin, L. Conserved sequence and structural motifs contribute to the DNA binding and cleavage activities of a geminivirus replication protein. *Journal of Biological Chemistry*, v.273, p.24448-24456. 1998.
- Orozco, B.M., Miller, A.B., Settlege, S.B. e Hanley-Bowdoin, L. Functional domains of a geminivirus replication protein. *Journal of Biological Chemistry*, v.272, p.9840-9846. 1997.
- Padidam, M., Sawyer, S. e Fauquet, C.M. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology*, v.265, p.218-224. 1999.
- Palmer, K.E. 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. e Rybicki, E.P. Geminivirus isolation and DNA extraction. *Methods in Molecular Biology*, v.81, p.41-52. 1998.
- Paplomatas, E.J., Patel, V.P., Hou, Y.M., Noueiry, A.O. e Gilbertson, R.L. Molecular characterization of a new sap-transmissible bipartite genome geminivirus infecting tomatoes in Mexico. *Phytopathology*, v.84, p.1215-1224. 1994.
- Pedersen, T.J. e Hanley-Bowdoin. Molecular characterization of the AL3 protein encoded by a bipartite geminivirus. *Virology*, v.202, p.1070-1075. 1994.
- Petty, I.T., Carter, S.C., Morra, M.R., Jeffrey, J.L. e Olivey, H.E. Bipartite geminivirus host adaptation determined cooperatively by coding and noncoding sequences of the genome. *Virology*, v.277, p.429-438. 2000.
- Pires, S.R., Andrade, E.C. e Zerbini, F.M. Detection of a possible new begomovirus species infecting tomato in Minas Gerais state. *Virus Reviews and Research*, v.9, p.122. 2004.
- Pita, J.S., Fondong, V.N., Sangare, A., Otim-Nape, G.W., Ogwal, S. e Fauquet, C.M. Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. *Journal of General Virology*, v.82, p.655-665. 2001.

- Polston, J., Mcgovern, R.J. e Brown, L.G. Introduction of *Tomato yellow leaf curl virus* in Florida and implications for the spread of this and other geminiviruses of tomato. *Plant Disease*, v.83, p.984-988. 2001.
- Polston, J.E. e Anderson, P.K. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Disease*, v.81, p.1358-1369. 1997.
- Polston, J.E., Bois, D., Serra, C.A. e Concepcion, S. First report of a tomato yellow leaf curl-like geminivirus in the Western Hemisphere. *Plant Disease*, v.78, p.831. 1994.
- Potter, J.L., Nakha, M.K., Mejia, L. e 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.
- Ramos, P.L., Guerra, O., Dorestes, V. e Ramirez, N. Detection of TYLCV in Cuba. *Plant Disease*, v.80, p.1208. 1996.
- Rezende, E.A., Filgueira, F.A.R., Zerbini, F.M., Maciel-Zambolim, E., Fernandes, J.J. e Gilbertson, R.L. Tomato infected with geminivirus in greenhouse conditions at Uberlândia-MG, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v.21, p.424. 1996.
- Ribeiro, S.G., Ambrozevicus, L.P., Ávila, A.C., Bezerra, I.C., Calegario, R.F., Fernandes, J.J., Lima, M.F., Mello, R.N., Rocha, H. e Zerbini, F.M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology*, v.148, p.281-295. 2003.
- Ribeiro, S.G., Ávila, A.C., Bezerra, I.C., Fernandes, J.J., Faria, J.C., Lima, M.F., Gilbertson, R.L., Zambolim, E.M. e Zerbini, F.M. Widespread occurrence of tomato geminiviruses in Brazil, associated with the new biotype of the whitefly vector. *Plant Disease*, v.82, p.830. 1998.
- Ribeiro, S.G., Bezerra, I.C., Lima, M.F., Ávila, A.C. e Giordano, L.B. Occurrence of geminivirus in tomato plants in Bahia. VIII Encontro Nacional de Virologia (Resumos). São Lourenço, MG, 1996. p. 290.
- Ribeiro, S.G., Martin, D.P., Lacorte, C., Simões, I.C., Orlandini, D.R.S. e Inoue-Nagata, A.K. Molecular and biological characterization of Tomato chlorotic mottle virus suggests that recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses. *Phytopathology*, v.97, p.702-711. 2007.
- Ribeiro, S.G., Mello, L.V., Boiteux, L.S., Kitajima, E.W. e Faria, J.C. Tomato infection by a geminivirus in the Federal District, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v.19, p.330. 1994.
- Rojas, A., Kvarnheden, A. e Valkonen, J.P.T. Geminiviruses infecting tomato crops in Nicaragua. *Plant Disease*, v.84, p.843-846. 2000.
- Rojas, M.R., Hagen, C., Lucas, W.J. e Gilbertson, R.L. Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology*, v.43, p.361-394. 2005.
- Rojas, M.R., Jiang, H., Salati, R., Xoconostle-Cazares, B., Sudarshana, M.R., Lucas, W.J. e Gilbertson, R.L. Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, tomato yellow leaf curl virus. *Virology*, v.291, p.110-125. 2001.

- Rojas, M.R., Noueir, A.O., Lucas, W.J. e Gilbertson, R.L. Bean dwarf mosaic geminivirus movement proteins recognize DNA in a form- and size-specific manner. *Cell*, v.95, p.105-113. 1998.
- Roth, B.M., Pruss, G.J. e Vance, V.B. Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Research*, v.102, p.97-108. 2004.
- Salati, R., Nahkla, M.K., Rojas, M.R., Guzman, P., Jaquez, J., Maxwell, D.P. e Gilbertson, R.L. *Tomato yellow leaf curl virus* in the Dominican Republic: Characterization of an infectious clone, virus monitoring in whiteflies, and identification of reservoir hosts. *Phytopathology*, v.92, p.487-496. 2002.
- Sanderfoot, A.A., Ingham, D.J. e Lazarowitz, S.G. A viral movement protein as a nuclear shuttle. The geminivirus BR1 movement protein contains domains essential for interaction with BL1 and nuclear localization. *Plant Physiology*, v.110, p.23-33. 1996.
- Sanderfoot, A.A. e Lazarowitz, S.G. Cooperation in viral movement: The geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery. *Plant Cell*, v.7, p.1185-1194. 1995.
- Santos, C.D.G., Ávila, A.C., Inoue-Nagata, A.K. e Resende, R.O. Espécies vegetais hospedeiras de begomovírus isolados de tomateiro em Goiás e no Distrito Federal. *Fitopatologia Brasileira*, v.29, p.450-455. 2004.
- Saunders, K., Wege, C., Veluthambi, K., Jeske, H. e Stanley, J. The distinct disease phenotypes of the common and yellow vein strains of Tomato golden mosaic virus are determined by nucleotide differences in the 3'-terminal region of the gene encoding the movement protein. *Journal of General Virology*, v.82, p.45-51. 2001.
- Selth, L.A., Dogra, S.C., Rasheed, M.S., Healy, H., Randles, J.W. e Rezaian, M.A. A NAC domain protein interacts with *Tomato leaf curl virus* replication accessory protein and enhances viral replication. *Plant Cell*, v.17, p.311-325. 2005.
- Stanley, J. Analysis of African cassava mosaic virus recombinants suggest strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. *Virology*, v.206, p.707-712. 1995.
- Stanley, J., Bisaro, D.M., Briddon, R.W., Brown, J.K., Fauquet, C.M., Harrison, B.D., Rybicki, E.P. e Stenger, D.C. Family *Geminiviridae*. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. e Ball, L.A. (Ed.). *Virus Taxonomy*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p.301-326.
- Sunter, G. e Bisaro, D.M. Transactivation of geminivirus AR1 and BR2 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. *Plant Cell*, v.4, p.1321-1331. 1992.
- Sunter, G., Hartitz, M.D., Hormuzdi, S.G., Brough, C.L. e Bisaro, D.M. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required for coat protein accumulation while ORF AL3 is necessary for efficient DNA replication. *Virology*, v.179, p.69-77. 1990.
- Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, J.A., Brown, J.K., Becerra-Flora, A. e Rivera-Bustamante, R. Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the Southern United States. *Phytopathology*, v.86, p.1186-1192. 1996.

- Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, J.A., Herrera-Estrela, L. e Rivera-Bustamante, R.F. Complete nucleotide sequence of pepper huasteco virus: Analysis and comparison with bipartite geminiviruses. *Journal of General Virology*, v.74, p.2225-2231. 1993.
- Trinks, D., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P.V., Akbergenov, R., Oakeley, E.J., Veluthambi, K., Hohn, T. e Pooggin, M.A. Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. *Journal of Virology*, v.79, p.2517-2527. 2005.
- Tyler, K.L. e Fields, B.N. Pathogenesis of viral infections. In: Fields, B.N., Knipe, D.M. e Howley, P.M. (Ed.). *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. p.173-218.
- Van Der Biezen, E.A. e Jones, J.D. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Biochemical Sciences*, v.23, p.454-456. 1998.
- Van Wezel, R., Liu, H., Tien, P., Stanley, J. e Hong, Y. Gene C2 of the monopartite geminivirus *Tomato yellow leaf curl virus-China* encodes a pathogenicity determinant that is localized in the nucleus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.14, p.1125-1128. 2001.
- Vance, V. e Vaucheret, H. RNA silencing in plants - Defense and counterdefense. *Science*, v.292, p.2277-2280. 2001.
- Vanitharani, R., Chellappan, P., Pita, J.S. e Fauquet, C.M. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology*, v.78, p.9487-9498. 2004.
- Varma, A. e Malathi, V.G. Emerging geminivirus problems: A serious threat to crop production. *Annals of Applied Biology*, v.142, p.145-164. 2003.
- Voinnet, O. Induction and suppression of RNA silencing: Insights from viral infections. *Nature Reviews Genetics*, v.6, p.206-220. 2005.
- Voinnet, O., Pinto, Y.M. e Baulcombe, D.C. Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v.96, p.14147-14152. 1999.
- Wang, H., Buckley, K.J., Yang, X., Buchmann, R.C. e Bisaro, D.M. Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Journal of Virology*, v.79, p.7410-7418. 2005.
- Wang, H., Hao, L.H., Shung, C.Y., Sunter, G. e Bisaro, D.M. Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Plant Cell*, v.15, p.3020-3032. 2003.
- Wege, C. e Pohl, D. Abutilon mosaic virus DNA B component supports mechanical virus transmission, but does not counteract begomoviral phloem limitation in transgenic plants. *Virology*, v.365, p.173-186. 2007.
- Xie, Q., Sanz-Burgos, A.P., Guo, H., Garcia, J.A. e Gutierrez, C. GRAB proteins, novel members of the NAC domain family, isolated by their interaction with a geminivirus protein. *Plant Molecular Biology*, v.39, p.647-656. 1999.
- Yang, X., Baliji, S., Buchmann, R.C., Wang, H., Lindbo, J.A., Sunter, G. e Bisaro, D.M. Functional modulation of the geminivirus AL2 transcription factor and silencing suppressor by self-interaction. *Journal of Virology*, v.21, p.11972-11981. 2007.

- Zambrano, K., Carballo, O., Geraud, F., Chirinos, D., Fernández, C. e Marys, E. First report of Tomato yellow leaf curl virus in Venezuela. *Plant Disease*, v.91, p.768. 2007.
- Zerbini, F.M., Zambolim, E.M., Carrijo, I.V. e Gilbertson, R.L. A new bipartite geminivirus infecting tomatoes in Minas Gerais, Brazil. *Phytopathology*, v.86, p.S1. 1996a.
- Zerbini, F.M., Zambolim, E.M., Fernandes, J.J., Gilbertson, R.L. e Carrijo, I.V. Um novo geminivírus isolado de tomateiro (*L. esculentum*) em Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira*, v.21, p.430. 1996b.

**INTERAÇÕES POSITIVAS E NEGATIVAS ENTRE DOIS BEGOMOVÍRUS
BISSEGMENTADOS EM TOMATEIRO E *Nicotiana benthamiana***

Alves-Júnior, M.; Andrade, E.C.; Alfenas-Zerbini, P.; Esposito, D.A., Ventrella, M.C., Otoni, W.C. & Zerbini, F.M. Positive and negative interactions between two bipartite begomoviruses in tomato and *Nicotiana benthamiana*. *Virology*, *submetido*.

Positive and negative interactions between two bipartite begomoviruses in tomato and *Nicotiana benthamiana*

Miguel Alves-Júnior¹, Eduardo C. Andrade¹, Poliane Alfenas-Zerbini¹, Débora A. Esposito¹, Marília C. Ventrella², Wagner C. Otoni² & F. Murilo Zerbini¹

¹Departamento de Fitopatologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil, 36570-000

²Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil, 36570-000

Corresponding author: Francisco Murilo Zerbini

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

Running title: Dual interaction between two geminiviruses

Key words: plant-virus interaction; geminivirus; ToRMV; ToYSV; tomato

Abstract

Begomoviruses cause serious diseases in crop plants worldwide. In Brazil, a viral complex including *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) and *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) infects tomatoes. ToYSV symptoms in tomato and *Nicotiana benthamiana* are more severe and appear earlier compared to ToRMV, suggesting differential adaptation of each virus to their hosts. We performed a series of experiments to analyze the role of a number of factors in this differential adaptation. The kinetics of viral infection was analyzed in plants which had the inoculated leaf removed at various periods of time after inoculation. Viral DNA accumulation was estimated in plants at 14 and 28 dpi. Viral replication was analyzed in protoplasts at 48 and 96 hpe, and tissue tropism was analyzed by *in situ* hybridization at 28 dpi. Results indicate that ToYSV is more efficient in carrying out the early (pre-systemic) events of infection, reaching a higher concentration and establishing a systemic infection sooner than ToRMV in both tomato and *N. benthamiana*. ToRMV negatively interferes on ToYSV during these initial stages of infection, but once a systemic infection is established this negative interference ceases. In *N. benthamiana*, ToYSV invades the mesophyll, while ToRMV is phloem-restricted. During mixed infection in this host, ToYSV releases ToRMV from the phloem. We conclude that ToYSV is better adapted than ToRMV to both hosts. In tomato, this is expressed by its reaching a higher concentration in a shorter period of time, which may lead to a higher concentration of viral virulence factors. In *N. benthamiana*, it is further expressed by its ability to invade mesophyll cells.

Introduction

The genus *Begomovirus* includes the most economically important species of the *Geminiviridae* (Stanley et al., 2005). Begomoviruses have a small, circular, single-stranded DNA genome with one or two components, each with approximately 2,600 nucleotides, encapsidated in twinned icosahedral particles (Rojas et al., 2005; Stanley et al., 2005). They are transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) and infect dicot species. Begomovirus diseases are a major limiting factor to crop yields in tropical and subtropical regions (Briddon, 2003; Legg and Thresh, 2000; Monci et al., 2002; Morales and Anderson, 2001; Were et al., 2004).

In Brazil, as in other countries in the Americas, tomatoes are one of the most affected crops (Morales and Jones, 2004; Polston and Anderson, 1997; Ribeiro et al., 2003), with a viral complex comprising at least eight begomovirus species (Ribeiro et al., 2003). Some of these species are becoming prevalent in the major tomato-producing areas of the country, with mixed infections being common in the field (Castillo-Urquiza et al., 2007; Fernandes et al., 2008). Two species have been described and characterized by our group: *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) (Fernandes et al., 2006) and *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) (Calegario et al., 2007). Although these two species were originally isolated from tomato, their phylogeny and biological properties are distinct. Despite a high degree of nucleotide sequence identity, ToYSV is phylogenetically closer to viruses infecting the common weed *Sida*, while ToRMV is closer to other tomato infecting begomoviruses (Andrade et al., 2006). Biologically, the main distinction is that ToYSV induces more severe symptoms, faster than ToRMV, in both tomato and the experimental host *Nicotiana benthamiana*. Also, ToYSV is efficiently sap-transmissible to several *Nicotiana* species, while ToRMV is poorly sap-transmissible to only a few species, including *N. benthamiana*; none of the two viruses

are sap-transmissible in tomato (Calegario et al., 2007; Fernandes et al., 2006). Variations in the length of the period between virus inoculation and the onset of symptoms (defined as the latent period) and in symptom severity indicate distinct levels of virus adaptation to the host, as a consequence of less or more efficient interactions between viral proteins and host factors (Morra and Petty, 2000; Rothenstein et al., 2007). A better adapted virus could replicate at a higher rate, and/or move cell-to-cell or long distance faster and more efficiently, thus reaching additional tissues besides the phloem, where the virus is initially introduced by the insect vector (Levy and Czosnek, 2003; McGivern et al., 2005; Petty and Qin, 2001; Rojas et al., 2001). Differences in symptom severity could also be a consequence of variations in the suppression of host defense responses by the virus (Fontes et al., 2004; Vanitharani et al., 2004).

Here, we report a series of experiments designed to analyze the role of a number of factors in the differential adaptation of ToYSV and ToRMV to tomato and *N. benthamiana*. Patterns of viral DNA accumulation in infected plants, kinetics of the establishment of systemic infection, replication in protoplasts and tissue tropism confirm the better adaptation of ToYSV to both hosts. Although we found evidence that synergism occurs between the two viruses, both positive and negative interactions take place in mixed infections.

Material and Methods

Viral isolates and plant material

Infectious clones corresponding to viral isolates ToYSV-[Bic2] (Andrade et al., 2006) and ToRMV-[Ube1] (Fernandes et al., 2006), maintained as glycerol stocks at -80°C, were used in all experiments. Tomato (*Solanum lycopersicum* cv. ‘Santa Clara’) and *Nicotiana benthamiana* plants were biolistically inoculated (Aragão et al., 1996)

using 2 µg of each genomic component (DNA-A and DNA-B). Inoculated plants were kept in a greenhouse with average daily temperatures of $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ during the evaluation period of all experiments.

Kinetics of viral infection

Tomato and *N. benthamiana* plants were inoculated with ToYSV only, ToRMV only, and ToYSV plus ToRMV, but with the inoculation targeting a single leaf, which was detached from the plant at 2, 4 and 6 days post-inoculation (dpi) for *N. benthamiana* and 4, 8 and 12 dpi for tomato. Inoculated plants were observed for the appearance of symptoms until 35 dpi. DNA from all plants was extracted at 28 dpi as described (Dellaporta et al., 1983) and used as a template for PCR-amplification of viral genomic fragments using either species-specific primers (ToYSV: 5'GCT GAG GCG TTA AAT GCT CC3' and 5'ATG TCA GGA ATG CCT GGT GG3'; ToRMV: 5'GGT AGG ATC CTG GTA TTT TCC AGC3' and 5'GGG GGA ATT CAT GAT GCA TTT GAC GAG G3') to confirm the presence of each virus in mixed infections, or with the universal begomovirus primers PAL1v1978 and PAR1c496 (Rojas et al., 1993) for viral detection in single infections. Three independent experiments were performed.

Viral DNA accumulation in infected plants

Tomato and *N. benthamiana* plants were inoculated in the apical meristem with the same combinations of the previous experiment. Approximately 0.3 g of symptomatic leaves were collected at 14 and 28 dpi, ground in liquid nitrogen, transferred to a microfuge tube containing 1 ml of extraction buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% β-mercaptoethanol) and 50 µl of 20% SDS, and incubated at 65°C for 10 minutes. After phenol:chloroform extraction, the DNA was

precipitated with 0.7 vols of isopropanol, washed with 70% ethanol and resuspended in 200 μ l of TE (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA).

Two micrograms of DNA were separated by agarose gel electrophoresis, transferred and covalently linked to nylon membranes (Hybond-N+, GE Healthcare) according to standard protocols (Sambrook and Russel, 2001), and hybridized to virus-specific probes. The ToYSV probe corresponded to nucleotides 1423-2148 in the DNA-A, obtained after *Pst* I digestion of clone pToYSV-A 1.2 (Andrade et al., 2006). The ToRMV probe corresponded to nucleotides 1711-2147 in the DNA-A, obtained after *Cla* I and *EcoR* I digestion of clone pUb1-49 (Fernandes et al., 2006). Both probes were labeled with α -[³²P]-dCTP using the Prime-it II kit (Stratagene), following manufacturer's instructions. The same amount of DNA was labeled for all hybridizations. Hybridizations and washes were carried out according to standard protocols (Sambrook and Russel, 2001), at high stringency conditions. The intensity of the hybridization signal was quantified based on the average pixel intensity, measured with the program Multi Gauge v. 3.0. Three independent experiments were performed, and relative intensity was calculated as the average of these three experiments.

Viral replication in protoplasts

A *N. benthamiana* cell suspension culture was maintained according to Hall (1991), by incubation at 26°C and 90 rpm and subculturing weekly with 1:10 dilutions. Protoplasts were isolated from the cell suspension culture essentially according to Qi and Ding (2002), with some modifications. Cells were collected by centrifugation at 70 g for 5 minutes, resuspended in solution I (0.5 M mannitol, 3.6 mM MES, pH 5.5) containing 1.5% cellulase "Onozuka" R-10 (Yakult Honsha), 0.4% macerozyme R-10 (Yakult Honsha) and 0.2% driselase (Sigma), and incubated in the dark at room

temperature for approximately 4 hours at 40 rpm. The suspension was passed through a 64 mesh sieve (Wilson Sieves) and centrifuged at 50 g for 10 minutes. Protoplasts were washed twice with solution I and resuspended in 200 μ M MOPS pH 7.2, 5 mM KCl, 0,5 M mannitol. The concentration was adjusted to 5×10^6 cells/ml. Protoplasts were electroporated in 0.4 cm cuvettes at 250 V and 500 μ F, with 20 μ g of each genomic component and 30 μ g of salmon sperm DNA. After electroporation the suspension was kept on ice for 10 minutes, diluted in 10 ml of MSP1 medium (MS salts supplemented with 0.5 mg/l of 6-benzylaminopurine, 2 mg/l of α -naphthaleneacetic acid, 3% sucrose and 0,5 M mannitol pH 5.8) and incubated at 26°C in the dark. Protoplasts were collected at 48 and 96 hours post-electroporation (hpe) and total DNA was extracted as described (Hou et al., 1998). Viral DNA accumulation was analyzed by hybridization, as described above. Three independent experiments were performed.

In situ hybridization

Leaves in the second internode of tomato and *N. benthamiana* plants inoculated with the same combinations of the previous experiments were collected 28 dpi, cut in 1 cm² fragments and fixed in 4% paraformaldehyde in PBS (1.8 mM KH₂PO₄ pH 7.2, 8 mM Na₂HPO₄, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl) for 12 hours. After rinsing in PBS, the fragments were dehydrated in ethanol (10-100%), infiltrated with xylol:ethanol (1:3, 1:1, 3:1, one hour in each passage), in xylol for one hour and in xylol:paraffin (1:1) at 68°C overnight. This was followed by infiltration with paraffin wax at 68°C for three days, with daily changes. The last inclusion was made with paraffin containing 8% bee wax. The tissue was mounted in a block of paraffin and 8% bee wax and solidified on ice. Sections of 30 μ m were prepared in a Spencer 820 microtome (American Optical), fixed in slides treated with Haupt's adhesive and dried at room temperature. Paraffin

was removed with xylol and the sections were rehydrated with decreasing ethanol concentrations (100, 95, 70 and 50%), washed in PBS and fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 15 minutes. Finally, the sections were treated with proteinase K (20 µg/ml) in PBS (pH 8.0) for 15 minutes at 37°C, and washed with PBS (pH 7.2) supplemented with 2 mg/ml of glycine.

The DNA fragments used as probes for the detection of ToYSV and ToRMV were the same used in the previous experiments. The control probe consisted of the plasmid vector Bluescript II KS+ (pKS+, Stratagene) linearized with *EcoR* I. Probes were labeled using the DIG DNA Labeling and Detection kit (Roche Applied Sciences), purified with the Perfectprep Cleanup kit (Eppendorf) and resuspended in 50 µl of water.

Sections were pre-hybridized for 3 hours in 4× SSC, 50% formamide, Denhardt's solution and 500 µg/ml of salmon sperm DNA, in a moist chamber at 37°C. The solution was changed, and 800 ng/ml of probe and 4% dextran sulfate were added. Hybridization was carried out at 37°C for 24 hours in a moist chamber. After hybridization, sections were washed sequentially in 1× SSC at room temperature, 1× SSC at 55°C for 15 minutes (twice), 0.5× SSC at 55°C for 15 minutes (twice) and 0.5× SSC for 10 minutes at room temperature, and then transferred to TBS (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl). Sections were blocked with TBS with 0.1% Triton X-100 and 1% blocking reagent (Roche Applied Sciences), and then incubated at 4°C for 12 hours in TBS with 0.1% Triton X-100 and 1% blocking reagent containing anti-DIG antibodies diluted 1:1000. Sections were washed three times in TBS and equilibrated in detection buffer (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂). Finally, sections were incubated in detection buffer containing 300 µg/ml NBT and 165 µg/ml

BCIP (Promega) for 3-16 hours, and transferred to water. Sections were mounted in 50% glycerol and examined in a light microscope.

Results

Latent period and symptoms of ToYSV and ToRMV in single or mixed infections in tomato and N. benthamiana

Symptoms of ToYSV infection in tomato appeared at 10 dpi, and include yellow mosaic, yellow spots and leaf distortion (Table 1; Figure 1A), plus a marked reduction in plant growth. In contrast, symptoms of infection by ToRMV appeared at 14 dpi, and include mild mosaic and minimal leaf distortion (Table 1; Figure 1C), with no evident growth reduction.

The differences between ToYSV and ToRMV in terms of symptom severity and latent period were even more evident in *N. benthamiana*. Plants inoculated with ToYSV started to display symptoms at 5 dpi, with severe mosaic and leaf curl (Table 1; Figure 1D). In contrast, plants infected by ToRMV did not display symptoms until 14 dpi, and even after that displayed only a very mild mosaic and down-cupping of the leaves (Table 1; Figure 1F).

The phenomenon known as synergism occurs when a mixed infection by two viruses causes symptoms which are more severe than the symptoms induced by each virus separately. Synergism can be due to a higher accumulation of at least one of the viruses involved. Since mixed infections by ToYSV and ToRMV could occur in the field, it is important to know whether synergism takes place between them, as reported for cassava-infecting begomoviruses (Fondong et al., 2000; Vanitharani et al., 2004).

Tomato plants with mixed infection by ToYSV and ToRMV started displaying symptoms at 10 dpi (Table 1; Figure 1B), like plants with single infection by ToYSV.

Symptoms were more severe than those induced by ToYSV alone, and much more severe than those induced by ToRMV alone. Plants with mixed infection displayed a unique leaf roll symptom (Figure 1B), which was not observed in any of the plants inoculated with either virus alone.

N. benthamiana plants with a mixed infection by the two viruses started displaying symptoms at 5 dpi, and they were as severe as those observed for single infections by ToYSV (Table 1; Figure 1E). These results were consistently observed in three independent experiments.

Kinetics of viral infection in tomato and N. benthamiana

The differences observed between ToYSV and ToRMV in terms of latent period in both hosts suggest that ToYSV reaches the vascular system, and thus initiates a systemic infection, faster than ToRMV. To investigate this hypothesis, we conducted experiments where each virus was inoculated in a single leaf, and this leaf was detached from the plant after different periods of time. Results of these experiments indicate that ToYSV is more efficient in the establishment of a systemic infection compared to ToRMV, in both hosts and in all time periods tested (Table 2; Figure 2).

The latent period in tomato was 10 dpi for ToYSV and 14 dpi for ToRMV (Figure 2A). In *N. benthamiana*, the latent period was 5 dpi for ToYSV and 14 dpi for ToRMV (Figure 2C). It is noteworthy that even when the inoculation was directed to a single leaf, the latent period and the symptoms induced by both viruses were the same observed in the previous experiment, where the inoculation was directed to the apical meristem.

Besides having a shorter latent period, ToYSV infected a higher percentage of plants in comparison to ToRMV in single infections at all time periods. In tomato, 25%

of the plants in which the inoculated leaf was detached at 4 dpi were infected by ToYSV, and only 6.67% were infected by ToRMV (Table 2; Figure 2B). In *N. benthamiana*, 61% of the plants in which the inoculated leaf was detached at 2 dpi were systemically infected by ToYSV, and only 11% by ToRMV (Table 2; Figure 2D). Equivalent results were observed for the other time periods.

To investigate whether synergism between the two viruses would affect the establishment of a systemic infection, plants were simultaneously inoculated with both viruses in a single leaf. The inoculated leaf was detached after different periods of time and systemic infection by each virus was assayed by PCR with species-specific primers at 28 dpi. In tomato, mixed infection caused a significant decrease in the efficiency of systemic infection by ToYSV when the inoculated leaf was detached at 4 dpi (Table 2; Figure 2B). This negative effect was not observed when the inoculated leaf was detached at 8 or 12 dpi. Systemic infection by ToRMV took place with the same efficiency observed in plants with single infection by this virus when the inoculated leaf was detached at 4 dpi. When the inoculated leaf was detached at 8 or 12 dpi, ToRMV was capable of establishing a systemic infection as efficiently as ToYSV (Table 2; Figure 2B). These results suggest that ToRMV has a negative effect on ToYSV during the initial stages of infection, but ToYSV facilitates systemic infection by ToRMV at the late stages of infection.

The negative interference of ToRMV on ToYSV during the initial stages of infection was more evident in *N. benthamiana*, a host in which both viruses were more efficient in the establishment of a systemic infection compared to tomato. In plants where the inoculated leaf was detached at 2 dpi, ToYSV systemically infected 61.5% of the plants in single infection, and only 17.6% of the plants in mixed infection (Table 2; Figure 2D). The percentage of plants infected by ToRMV was similar in single and

mixed infection (11.1 and 17.6%, respectively, with no statistical difference). However, when the inoculated leaf was detached at 4 or 6 dpi, not only did the negative effect on ToYSV disappear, but the percentage of plants infected by ToRMV increased drastically compared to plants with a single infection by this virus (Table 2; Figure 2D).

Together, these results indicate that ToYSV is better adapted than ToRMV to both hosts. ToYSV is capable of establishing a systemic infection faster and more efficiently than ToRMV in both hosts, although both viruses are more efficient in *N. benthamiana* than in tomato. More interestingly, ToRMV has a negative effect over ToYSV during the initial stages of mixed infection, but ToYSV eventually facilitates systemic infection by ToRMV at the later stages, in both hosts.

Accumulation of ToYSV and ToRMV in single or mixed infections in tomato and N. benthamiana

In order to determine whether symptom severity could be correlated with viral DNA accumulation in infected tissues, systemically infected leaves were collected at 14 and 28 dpi, total DNA was extracted and hybridized with species-specific probes.

In both hosts, results of three independent experiments indicate that, in single infection, the accumulation of ToYSV is higher than that of ToRMV at both time points (Figure 3). Furthermore, the concentration of ToYSV remained constant between the two time points, while that of ToRMV was reduced from 14 to 28 dpi (Figure 3).

In mixed infection of tomato plants, no significant changes in viral DNA accumulation were observed for ToYSV (Figure 3). Interestingly, although the accumulation of ToRMV was lower compared to single infection by this virus at 14 dpi, it increased from 14 to 28 dpi, the opposite of what was observed in single infection (Figure 3). These results were consistently observed in three independent experiments.

As observed in tomato, there were no changes in DNA accumulation for ToYSV in mixed infection of *N. benthamiana* (Figure 3). The accumulation of ToRMV was similar to what was observed in single infection at 14 dpi, but increased significantly from 14 to 28 dpi (Figure 3). Again, these results were observed consistently in three independent experiments.

Together, these results indicate that synergism does take place in mixed infection by ToRMV and ToYSV in both tomato and *N. benthamiana*, which is correlated with an increased concentration of ToRMV (at 28 dpi) but not ToYSV. Furthermore, in single infection, ToYSV accumulates to a higher level than ToRMV in both hosts, suggesting that ToYSV is better adapted to both hosts and is probably the virus responsible for the synergistic interaction.

Replication of ToYSV and ToRMV in N. benthamiana protoplasts

To investigate possible differences in the viral replication rate, infectious clones corresponding to the DNA-A of ToYSV and ToRMV were electroporated separately or in combination into *N. benthamiana* protoplasts. Cells were collected at 48 and 96 hpe, total DNA was extracted and hybridized with virus-specific probes. The results indicate that the two viruses reach similar concentrations in single infections, reflecting similar replication rates (Figure 4). However, ToYSV reaches a maximum concentration at 48 hpe, with a significant reduction at 96 hpe. In contrast, ToRMV reaches a maximum concentration at 96 hpe (Figure 4). Interestingly, no increase in replication was observed in mixed infection, for either virus (Figure 4). Actually, compared to single infection, the concentration of ToYSV was reduced at 48 hpe but remained constant until 96 hpe, and the concentration of ToRMV was decreased at both time points (Figure 4).

Together, these results indicate that the replication rate of ToYSV and ToRMV in *N. benthamiana* is equivalent in single infections, but higher for ToYSV in mixed infection. The similar replication rate in single infection indicates that this property is not responsible for the striking differences in symptom severity by the two viruses in this host. However, the fact that ToYSV reaches its maximum concentration earlier than ToRMV (48 hpe, compared to 96 hpe for ToRMV) could explain, at least in part, the differences observed between the two viruses in the establishment of a systemic infection, and supports the conclusion that ToYSV is a better adapted virus.

Tissue tropism of ToYSV and ToRMV in tomato and N. benthamiana

To test the hypothesis that differential tissue tropism is responsible for the differences in symptom severity between ToYSV and ToRMV and for the higher DNA accumulation of ToYSV compared to ToRMV, *in situ* hybridization studies were carried out in systemically infected leaves of tomato and *N. benthamiana* plants with single or mixed infection.

In tomato, both ToYSV and ToRMV were detected only in cells associated with the vascular tissues (Figure 5A, 5B). In *N. benthamiana*, ToYSV was detected in a large number of cells in the mesophyll, besides the vascular tissues (Figure 5C). In contrast, ToRMV remained phloem-restricted in this host (Figure 5D). However, when semithin sections from plants infected with both viruses were analyzed using the ToRMV-specific probe, viral DNA was detected in mesophyll cells (Figure 5E), indicating that mixed infection with ToYSV allowed mesophyll invasion by ToRMV. The ToRMV-specific probe did not detect ToYSV in plants with a single infection by this virus, thus confirming its specificity (Figure 5F).

Together, these results indicate that the differences in symptom severity and DNA accumulation observed between ToYSV and ToRMV in tomato are not due to differences in tissue tropism, since both viruses are phloem-restricted in this host. However, tissue tropism could be, at least in part, explain the differences observed in *N. benthamiana*, since ToYSV is capable of invading the mesophyll in this host, unlike ToRMV. Furthermore, in mixed infection, the fact the ToRMV is no longer confined to the phloem could explain its increased DNA accumulation at the late stages of infection.

Discussion

In Brazil, a begomovirus complex comprised of at least eight species is currently a major threat to tomato production (Fernandes et al., 2008; Ribeiro et al., 2003). The introduction of a new biotype (biotype B) of the insect vector *Bemisia tabaci*, which unlike the previously existent biotype (biotype A) efficiently colonizes solanaceous plants such as the tomato, allowed the transfer of indigenous viruses infecting wild and/or weed hosts to tomato. A few of these species have become prevalent in the field (Ambrozevicius et al., 2002; Castillo-Urquiza et al., 2007; Fernandes et al., 2008; Ribeiro et al., 2003), indicating different degrees of adaptation to the new host.

Two of the begomovirus species infecting tomato in the state of Minas Gerais, ToYSV and ToRMV, exemplify the process described above. Symptoms of ToYSV infection in tomato appear at 10 dpi and are considerably more severe than those induced by ToRMV, which appear at 14 dpi. These differences are even more evident in the experimental host *N. benthamiana*, and in potential wild hosts such as *Nicotiana glutinosa* and *Nicotiana tabacum* (data not shown). Mixed infection with both viruses caused symptoms to appear at 10 dpi in tomato and 5 dpi in *N. benthamiana*. In tomato, symptoms were more severe than those induced by each virus alone. In *N. benthamiana*, symptoms were comparable to those induced by ToYSV alone.

The efficiency of a virus in establishing a systemic infection, as expressed by latent period and the percentage of plants infected following inoculation, may reflect a better interaction between viral proteins and host factors, leading to improved replication, cell-to-cell movement and/or suppression of host defense responses. Likewise, reduced levels of viral DNA accumulation in hosts to which the virus is poorly adapted probably reflect an inefficient interaction between viral and host factors (Petty et al., 1995).

ToYSV is more efficient than ToRMV in establishing a systemic infection in both tomato and *N. benthamiana*, and both viruses are more efficient in infecting the experimental host *N. benthamiana* compared to the natural host (tomato). However, it must be considered that both hosts belong to the Solanaceae, and that both viruses infect a number of solanaceous species (Calegario et al., 2007; Fernandes et al., 2006). Therefore, the perception of tomato as the “natural” host could be merely a consequence of its economical importance. It is perfectly possible that *Nicotiana* species are the true natural host of these viruses (or of the viruses from which they evolved). It is noteworthy that in a initial experiment in which the inoculated leaf was detached from tomato plants at the same periods of time used for *N. benthamiana* (2, 4 and 6 dpi), the percentage of infected plants was close to zero (data not shown). This further indicates the lower efficiency of both viruses in infecting tomato compared to *N. benthamiana*.

Differences in host adaptation of begomoviruses were demonstrated by Hou et al. (1998), working with *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV) and *Tomato mottle virus* (ToMoV). BDMV was more pathogenic than ToMoV in the experimental hosts *N. benthamiana* and *N. tabacum* (which both viruses can infect), and both viruses were less efficient in infecting their respective “natural” hosts (common bean and tomato).

Intriguing results were observed in plants with mixed infection. When the inoculated leaf was detached at 2 dpi (in *N. benthamiana*) or 4 dpi (in tomato), a significant reduction was observed in the percentage of plants infected by ToYSV compared to the single infection by this virus. This negative interference of ToRMV over ToYSV was not observed at the other time points (4 and 6 dpi for *N. benthamiana*, 8 and 12 dpi for tomato). On the contrary, in these treatments the percentage of infected plants by ToYSV was equivalent to the one observed in single infection, while the percentage of plants infected by ToRMV increased. These results suggest that the presence of ToRMV interferes with initial events of the ToYSV infection cycle, which could be related to replication in the initially infected cell or cell-to-cell movement. It must be considered that simultaneous inoculation with both viruses does not necessarily mean that both viruses will be present in the same cells, although it is reasonable to assume that at least some cells will have both viruses, as reported for mixed infection with TYLCV and TYLCSV in tomato and *N. benthamiana* in which 20% of the cells were infected by both viruses (Morilla et al., 2004).

In a mixed infection, viral proteins which are less efficient in interacting with host factors could have a negative effect in the interaction of the more efficient proteins, a phenomenon known as negative dominance (Herskowitz, 1987). An example of negative dominance is the inhibition of ACMV infection by co-inoculation of a mutant virus in which the coat protein gene was replaced by a truncated version of the MP gene of *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) (von Arnim and Stanley, 1992). The use of negative dominance has been the basis for a number of attempts to generate geminivirus resistant transgenic plants (Antignus et al., 2004; Duan et al., 1997; Hou et al., 2000; Noris et al., 1996; Shivaprasad et al., 2006). In any event, whichever is the nature of this negative interference, once the infection cycle progresses to intermediate and late

events, not only does ToYSV infect the plant more efficiently, but it actually assists ToRMV in the establishment of a systemic infection.

Both positive and negative interactions between geminiviruses and viruses from different genera and families have been described. Synergism is well documented among cassava-infecting geminiviruses as a consequence of improved RNA silencing suppression (Fondong et al., 2000; Pita et al., 2001; Vanitharani et al., 2004). Negative interference was observed in mixed infections between *Abutilon mosaic virus* (AbMV), a begomovirus, and the tobamoviruses *Tobacco mosaic virus* (TMV) and *Tomato mosaic virus* (ToMV), with a reduction in DNA accumulation and infectivity of AbMV in *N. benthamiana* (Pohl and Wege, 2007). However, we believe this to be the first time that both positive and negative interactions are verified for the same interaction at different stages of infection.

In single infections, the differences observed in the severity of symptoms correlate with viral DNA accumulation in both hosts: ToYSV accumulates to a higher level compared to ToRMV at either 14 and 28 dpi. An equivalent result was observed in cassava and *N. benthamiana* plants infected with *African cassava mosaic virus* (ACMV) e *East African cassava mosaic virus* (EACMV) from Uganda (Pita et al., 2001). In our case, the method used to estimate viral DNA accumulation does not allow us to conclude whether the differences observed are due to higher replication or to a greater number of infected cells (for example, due to differences in tissue tropism).

In mixed infection, the accumulation of ToYSV did not change compared to single infection, and the accumulation of ToRMV was higher than in single infection. These results indicate that synergism does take place between the two viruses in both hosts. It must be pointed out that, for geminiviruses at least, synergism, as expressed by increased symptom severity in mixed infection compared to single infections, does not

necessarily lead to increased DNA accumulation, as demonstrated in tomato and *N. benthamiana* plants infected with TYLCV and TYLCSV (Morilla et al., 2004).

Viral replication assays in *N. benthamiana* protoplasts indicated that the replication rate of both viruses is equivalent in this host. However, although the two viruses reached similar concentrations, the results suggest that the ToYSV replication-associated proteins interact better with host factors, since ToYSV reached the maximum level of DNA accumulation earlier than ToRMV (48 hpe compared to 96 hpe). Together with the results from the infection kinetics experiment, we propose that ToYSV accumulates DNA (and consequently synthesizes mRNA and protein) faster than ToRMV, and is therefore capable of establishing a systemic infection more efficiently, maybe by escaping host defense responses. In mixed infection, although the replication rate of ToYSV is higher than ToRMV at both time points, ToYSV accumulation is significantly reduced at 48 hpe, reinforcing the observation that ToRMV negatively interferes with ToYSV replication.

Infection by a number of geminiviruses is restricted to cells of the vascular tissues (Hoefert, 1987; Horns and Jeske, 1991; Morilla et al., 2004; Rojas et al., 2001; Wang et al., 1996). However, many begomoviruses are capable of infecting cells of the mesophyll (Morra and Petty, 2000; Rushing et al., 1987; Sudarshana et al., 1998; Wang et al., 1996; Wege et al., 2000). This capacity of invading additional tissues besides the vasculature indicates a better adaptation of the virus to its host, and is normally associated with greater severity of symptoms and with sap-transmissibility (Morra and Petty, 2000; Petty and Qin, 2001; Wege et al., 2000; reviewed by Rojas et al., 2005).

In situ hybridization of foliar sections from tomato plants with single or mixed infections detected the presence of viral DNA only in cells of the vasculature. A similar result was observed for tomato infection by TYLCV and TYLCSV, both of which were

phloem-restricted either in single or mixed infections (Morilla et al., 2004). Therefore, tissue tropism does not explain the differences between ToYSV and ToRMV in single infection or the synergism observed in mixed infection. We did not carry out protoplast replication assays in tomato, and therefore this remains as a possible explanation for these differences. Another plausible hypothesis would be that ToYSV encodes a more efficient silencing suppressor than ToRMV. As mentioned above, synergism between cassava-infecting geminiviruses was associated with enhanced silencing suppression (Vanitharani et al., 2004).

In *N. benthamiana*, *in situ* hybridization detected ToYSV in both phloem-associated and mesophyll cells, while ToRMV remained phloem-restricted in single infection. Therefore, although the two viruses replicate at similar rates, the fact that ToYSV reaches its peak concentration faster than ToRMV and is capable of invading the mesophyll could explain its higher DNA accumulation and more severe symptoms.

In situ hybridization from foliar sections of *N. benthamiana* plants with mixed infection indicated the presence of ToRMV in mesophyll cells. This demonstrates that the presence of ToYSV allows ToRMV to invade the mesophyll, and could explain the higher accumulation of this virus even though its replication rate was reduced compared to the single infection. Such an effect is not unusual for geminiviruses. Mixed infection by TGMV, which invades mesophyll cells of *N. benthamiana*, and *Bean golden mosaic virus* (BGMV) or ACMV, both phloem-restricted in this host, resulted in BGMV and ACMV invading the mesophyll (Morra and Petty, 2000; Wege et al., 2001). Release of phloem restriction has been observed even between geminiviruses and viruses from distinct genera, such as TMV (Carr and Kim, 1983) and *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Wege and Siegmund, 2007), indicating that the viral factors involved in movement are less specific than those involved in replication.

In summary, results from experiments determining kinetics of systemic infection, viral DNA accumulation, replication in protoplasts and tissue tropism indicate that ToYSV is more efficient in carrying out the early (pre-systemic) events of the viral infection cycle, reaching a higher concentration and establishing a systemic infection sooner than ToRMV in both tomato and *N. benthamiana*. ToRMV negatively interferes on ToYSV during these initial stages of infection, but once a systemic infection is established, this negative interference ceases. In *N. benthamiana*, ToYSV invades the mesophyll, while ToRMV is phloem-restricted. During mixed infection in this host, ToYSV releases ToRMV from the phloem. Based on these results, we conclude that ToYSV is better adapted than ToRMV in both hosts, although its better adaptation is more evident in *N. benthamiana* than in tomato. In tomato, the better adaptation of ToYSV is expressed by its capacity of reaching a higher concentration in a shorter period of time, which may lead to a higher concentration of viral virulence factors such as proteins involved in the suppression of host defense responses. In *N. benthamiana*, the better adaptation of ToYSV is further expressed by its ability to invade mesophyll cells. Our future studies will focus on the identification and functional analysis of the viral virulence factors responsible for the better adaptation of ToYSV compared to ToRMV.

Acknowledgments

The authors wish to thank the members of the Plant Molecular Virology Lab. at UFV for helpful suggestions and discussions, and _____ for critical reading of the manuscript. This research was funded by grants from CNPq (474140/2004-0) and Fapemig (CAG 823/03) to FMZ. MAJ was the recipient of a CAPES doctoral fellowship. PAZ is a CNPq posdoctoral fellow.

Literature Cited

- Ambrozevicius, L. P., Calegario, R. F., Fontes, E. P. B., Carvalho, M. G., and Zerbini, F. M. (2002). Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatol Bras* 27, 372-377.
- Andrade, E. C., Manhani, G. G., Alfenas, P. F., Calegario, R. F., Fontes, E. P. B., and Zerbini, F. M. (2006). *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*. *J Gen Virol* 87, 3687-3696.
- Antignus, Y., Vunsh, R., Lachman, O., Pearlsman, M., Maslenin, L., Hananya, U., and Rosner, A. (2004). Truncated Rep gene originated from Tomato yellow leaf curl virus-Israel [Mild] confers strain-specific resistance in transgenic tomato. *Ann Appl Biol* 144, 39-44.
- Aragão, F. J. L., Barros, L. M. G., Brasileiro, A. C. M., Ribeiro, S. G., Smith, F. D., Sanford, J. C., Faria, J. C., and Rech, E. L. (1996). Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theoret Appl Gen* 93, 142-150.
- Briddon, R. W. (2003). Cotton leaf curl disease, a multicomponent begomovirus complex. *Mol Plant Pathol* 4, 427-434.
- Calegario, R. F., Ferreira, S. S., Andrade, E. C., and Zerbini, F. M. (2007). Characterization of *Tomato yellow spot virus*, (ToYSV), a novel tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Br J Agric Res* 42, 1335-1343.
- Carr, R. J., and Kim, K. S. (1983). Evidence that bean golden mosaic virus invades non-phloem tissue in double infections with tobacco mosaic virus. *J Gen Virol* 64, 2489-2492.
- Castillo-Urquiza, G. P., Beserra Junior, J. E. A., Alfenas-Zerbini, P., Varsani, A., Lima, A. T. M., Barros, D. R., and Zerbini, F. M. (2007). Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato in Paty do Alferes, Rio de Janeiro state, Brazil. *Virus Rev Res* 12, 233. (Abstract)
- Dellaporta, S. L., Wood, J., and Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol Biol Rept* 1, 19-21.
- Duan, Y.-P., Powell, C. E., Purcifull, D. E., and Hiebert, E. (1997). Geminivirus resistance in transgenic tobacco expressing mutated BC1 protein. *Mol Plant Microbe Interact* 10, 617-623.
- Fernandes, F. R., Albuquerque, L. C., Giordano, L. B., Boiteux, L. S., Ávila, A. C., and Inoue-Nagata, A. K. (2008). Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes* 36, 251-258.
- Fernandes, J. J., Carvalho, M. G., Andrade, E. C., Brommonschenkel, S. H., Fontes, E. P. B., and Zerbini, F. M. (2006). Biological and molecular properties of Tomato rugose mosaic virus (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Plant Path* 55, 513-522.
- Fondong, V. N., Pita, J. S., Rey, M. E. C., Kochko, A., Beachy, R. N., and Fauquet, C. M. (2000). Evidence of synergism between African cassava mosaic virus and a new double-recombinant geminivirus infecting cassava in Cameroon. *J Gen Virol* 81, 287-297.
- Fontes, E. P. B., Santos, A. A., Luz, D. F., Waclawovsky, A. J., and Chory, J. (2004). The geminivirus nuclear shuttle protein is a virulence factor that suppresses transmembrane receptor kinase activity. *Genes Dev* 18, 2545-2556.

- Hall, R. D. (1991). Initiation and maintenance of callus cultures of carrot and tobacco. *In* Plant Tissue Culture Manual A2.
- Herskowitz, I. (1987). Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature* 329, 219-222.
- Hoefert, L. (1987). Association of squash leaf curl virus with nuclei of squash vascular cells. *Phytopathol* 77, 1596-1600.
- Horns, T., and Jeske, H. (1991). Localization of abutilon mosaic virus (AbMV) DNA within leaf tissue by *in situ* hybridization. *Virology* 181, 580-588.
- Hou, Y. M., Paplomatas, E. J., and Gilbertson, R. L. (1998). Host adaptation and replication properties of two bipartite geminiviruses and their pseudorecombinants. *Mol Plant Microbe Interact* 11, 208-217.
- Hou, Y. M., Sanders, R., Ursin, V. M., and Gilbertson, R. L. (2000). Transgenic plants expressing geminivirus movement proteins: Abnormal phenotypes and delayed infection by *Tomato mottle virus* in transgenic tomatoes expressing the *Bean dwarf mosaic virus* BV1 or BC1 proteins. *Mol Plant Microbe Interact* 13, 297-308.
- Legg, J. P., and Thresh, J. M. (2000). Cassava mosaic virus disease in East Africa: A dynamic disease in a changing environment. *Virus Res* 71, 135-149.
- Levy, A., and Czosnek, H. (2003). The DNA-B of the non-phloem-limited bean dwarf mosaic virus (BDMV) is able to move the phloem-limited Abutilon mosaic virus (AbMV) out of the phloem, but DNA-B of AbMV is unable to confine BDMV to the phloem. *Plant Mol Biol* 53, 789-803.
- McGivern, D. R., Findlay, K. C., Montague, N. P., and Boulton, M. I. (2005). An intact RBR-binding motif is not required for infectivity of Maize streak virus in cereals, but is required for invasion of mesophyll cells. *J Gen Virol* 86, 797-801.
- Monci, F., Sanchez-Campos, S., Navas-Castillo, J., and Moriones, E. (2002). A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Virology* 303, 317-326.
- Morales, F. J., and Anderson, P. K. (2001). The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Arch Virol* 146, 415-441.
- Morales, F. J., and Jones, P. G. (2004). The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. *Virus Res* 100, 57-65.
- Morilla, G., Krenz, B., Jeske, H., Bejarano, E. R., and Wege, C. (2004). Tête à tête of tomato yellow leaf curl virus and tomato yellow leaf curl sardinia virus in single nuclei. *J Virol* 78, 10715-10723.
- Morra, M. R., and Petty, I. T. D. (2000). Tissue specificity of geminivirus infection is genetically determined. *Plant Cell* 12, 2259-2270.
- Noris, E., Accotto, G. P., Tavazza, R., Brunetti, A., Crespi, S., and Tavazza, M. (1996). Resistance to tomato yellow leaf curl geminivirus in *Nicotiana benthamiana* plants transformed with a truncated viral C1 gene. *Virology* 224, 130-138.
- Petty, I. T. D., Miller, C. G., Meade-Hash, T. J., and Schaffer, R. L. (1995). Complementary and noncomplementary host adaptation defects in bipartite geminiviruses. *Virology* 212, 263-267.
- Petty, I. T. D., and Qin, Y. (2001). Genetic analysis of bipartite geminivirus tissue tropism. *Virology* 291, 311-323.
- Pita, J. S., Fondong, V. N., Sangare, A., Otim-Nape, G. W., Ogwal, S., and Fauquet, C. M. (2001). Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. *J Gen Virol* 82, 655-665.

- Pohl, D., and Wege, C. (2007). Synergistic pathogenicity of a phloem-limited begomovirus and tobamoviruses, despite negative interference. *J Gen Virol* 88, 1034-1040.
- Polston, J. E., and Anderson, P. K. (1997). The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Dis* 81, 1358-1369.
- Qi, Y., and Ding, B. (2002). Replication of *Potato tuber viroid* in cultured cells of tobacco and *Nicotiana benthamiana*: The role of specific nucleotides in determining replication levels for host adaptation. *Virology* 302, 445-456.
- 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., and Zerbini, F. M. (2003). Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Arch Virol* 148, 281-295.
- Rojas, M. R., Gilbertson, R. L., Russell, D. R., and Maxwell, D. P. (1993). Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Dis* 77, 340-347.
- Rojas, M. R., Hagen, C., Lucas, W. J., and Gilbertson, R. L. (2005). Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. *Annu Rev Phytopathol* 43, 361-394.
- Rojas, M. R., Jiang, H., Salati, R., Xoconostle-Cazares, B., Sudarshana, M. R., Lucas, W. J., and Gilbertson, R. L. (2001). Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, tomato yellow leaf curl virus. *Virology* 291, 110-125.
- Rothenstein, D., Krenz, B., Selchow, O., and Jeske, H. (2007). Tissue and cell tropism of Indian cassava mosaic virus (ICMV) and its AV2 (precoat) gene product. *Virology* 359, 137-145.
- Rushing, A. E., Sunter, G., Gardiner, W. E., Dute, R. R., and Bisaro, D. M. (1987). Ultrastructural aspects of tomato golden mosaic virus infection in tobacco. *Phytopathol* 77, 1231-1236.
- Sambrook, J., and Russel, D. (2001). "Molecular Cloning - A Laboratory Manual (3^a ed.)." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Shivaprasad, P. V., Thillaichidambaram, P., Balaji, V., and Veluthambi, K. (2006). Expression of full-length and truncated Rep genes from Mungbean yellow mosaic virus-Vigna inhibits viral replication in transgenic tobacco. *Virus Genes* 33, 365-374.
- Stanley, J., Bisaro, D. M., Briddon, R. W., Brown, J. K., Fauquet, C. M., Harrison, B. D., Rybicki, E. P., and Stenger, D. C. (2005). Family *Geminiviridae*. In "Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses" (C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball, Eds.), pp. 301-326. Elsevier Academic Press, San Diego.
- Sudarshana, M. R., Wang, H. L., Lucas, W. J., and Gilbertson, R. L. (1998). Dynamics of bean dwarf mosaic geminivirus cell-to-cell and long-distance movement in *Phaseolus vulgaris* revealed, using the green fluorescent protein. *Mol Plant Microbe Interact* 11, 277-291.
- Vanitharani, R., Chellappan, P., Pita, J. S., and Fauquet, C. M. (2004). Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *J Virol* 78, 9487-9498.
- von Arnim, A., and Stanley, J. (1992). Inhibition of *African cassava mosaic virus* systemic infection by a movement protein from the related geminivirus *Tomato golden mosaic virus*. *Virology* 187, 555-564.

- Wang, H. L., Gilbertson, R. L., and Lucas, W. J. (1996). Spatial and temporal distribution of bean dwarf mosaic geminivirus in *Phaseolus vulgaris* and *Nicotiana benthamiana*. *Phytopathol* 86, 1204-1214.
- Wege, C., Gotthardt, R. D., Frischmuth, T., and Jeske, H. (2000). Fulfilling Koch's postulates for *Abutilon mosaic virus*. *Arch Virol* 145, 2217-2225.
- Wege, C., Saunders, K., Stanley, J., and Jeske, H. (2001). Comparative analysis of tissue tropism of bipartite geminivirus. *J. Phytopathol.* 149, 359-368.
- Wege, C., and Siegmund, D. (2007). Synergism of a DNA and an RNA virus: Enhanced tissue infiltration of the begomovirus *Abutilon mosaic virus* (AbMV) mediated by *Cucumber mosaic virus* (CMV). *Virology* 357, 10-28.
- Were, H. K., Winter, S., and Maiss, E. (2004). Viruses infecting cassava in Kenya. *Plant Dis* 88, 17-22.

Table 1. Infectivity and latent period in tomato and *N. benthamiana* plants inoculated with ToYSV and ToRMV separately or in combination.

	Tomato		<i>N. benthamiana</i>	
	Infectivity ^a (% infected plants)	Latent period (dpi) ^b	Infectivity (% infected plants)	Latent period (dpi)
no DNA	0/4 (0)	-	0/4 (0)	-
ToYSV	37/46 (80.4)	10	27/27 (100)	5
ToRMV	36/49 (73.5)	14	27/28 (96.4)	14
ToYSV+ToRMV	42/49 (85.7)	10	26/26 (100)	5

^a Number of infected plants/Number of inoculated plants, verified by visual observation of symptoms and confirmed by PCR amplification of viral genomic fragments at 28 dpi, using either species-specific primers. Results correspond to the sum of three independent experiments.

^b Period of time, in days, between inoculation and the onset of systemic symptoms (in non-inoculated leaves).

Table 2. Infectivity in tomato and *N. benthamiana* plants inoculated in a single leaf with ToYSV and ToRMV, separately or in combination.

Tomato		<i>N. benthamiana</i>	
Treatments	Infectivity ^a (% infected plants)	Treatments	Infectivity (% infected plants)
Apex control ^b	4/5 (80)	Apex control	5/5 (100)
no DNA	0/10 (0)	no DNA	0/9 (0)
ToRMV 4dpi ^c	1/15 (6.67)	ToRMV 2dpi ^d	2/18 (11.11)
ToRMV 8dpi	0/16 (0)	ToRMV 4dpi	1/18 (5.55)
ToRMV 12dpi	1/16 (6.25)	ToRMV 6dpi	3/16 (18.75)
ToYSV 4dpi	4/16 (25)	ToYSV 2dpi	16/26 (61.54)
ToYSV 8dpi	1/14 (7.14)	ToYSV 4dpi	12/22 (54.55)
ToYSV 12dpi	3/15 (20)	ToYSV 6dpi	18/23 (78.26)
ToY + ToR 4 dpi ^e	1/15 (6.67)	ToY + ToR 2 dpi	3/17 (17.65)
ToY + ToR 8dpi	1/16 (6.25)	ToY + ToR 4dpi	9/16 (56.25)
ToY + ToR 12 dpi	2/16 (12.5)	ToY + ToR 6 dpi	11/16 (68.75)
ToR (ToY+ToR) 4dpi ^f	0/15 (0)	ToR (ToY+ToR) 2 dpi	0/17 (0)
ToR (ToY+ToR) 8dpi	0/16 (0)	ToR (ToY+ToR) 4 dpi	1/16 (6.25)
ToR (ToY+ToR) 12dpi	0/16 (0)	ToR (ToY+ToR) 6 dpi	0/16 (0)
ToY (ToY+ToR) 4dpi ^g	1/15 (6.67)	ToY (ToY+ToR) 2 dpi	0/17 (0)
ToY (ToY+ToR) 8dpi	0/16 (0)	ToY (ToY+ToR) 4 dpi	4/16 (25)
ToY (ToY+ToR) 12dpi	1/16 (6.25)	ToY (ToY+ToR) 6 dpi	2/16 (12.5)

^a Number of infected plants/Number of inoculated plants, verified by visual observation of symptoms and confirmed by PCR amplification of viral genomic fragments at 28 dpi, using either species-specific primers. Results correspond to the sum of three independent experiments.

^b Inoculation with ToYSV, targeted to the apical meristem.

^c Tomato plants had the inoculated leaf detached at 4, 8 or 12 dpi.

^d *N. benthamiana* plants had the inoculated leaf detached at 2, 4 or 6 dpi.

^e Plants inoculated with both viruses, in which both viruses were present at 28 dpi.

^f Plants inoculated with both viruses, in which only ToRMV was present at 28 dpi.

^g Plants inoculated with both viruses, in which only ToYSV was present at 28 dpi.

Figure legends

Figure 1. Symptoms induced by ToYSV and ToRMV in tomato and *Nicotiana benthamiana* plants at 14 days post-inoculation. Tomato plants infected with ToYSV (**A**) display yellow mosaic and leaf distortion, in contrast to plants infected with ToRMV (**C**), which display a milder mosaic with minimal leaf distortion. Plants with mixed infection (**B**) display more severe symptoms than those induced by each virus alone. The arrow indicates the leaf roll symptom observed only in plants with mixed infection. *N. benthamiana* plants infected with ToYSV (**D**) display mosaic and severe leaf curl, while those infected with ToRMV (**F**) display only a mild mosaic and down-cupping of the leaves. Plants with mixed infection (**E**) display symptoms which are similar to those induced by ToYSV alone.

Figure 2. Kinetics of the establishment of systemic infection in tomato and *N. benthamiana* plants infected with ToYSV and ToRMV, alone or in combination, when the inoculated leaf was detached from the plant at 4, 8 and 12 days post inoculation (dpi) (tomato) or 2, 4 and 6 dpi (*N. benthamiana*). (**A**) and (**C**), Percentage of tomato and *N. benthamiana* plants, respectively, displaying systemic symptoms at different time points following inoculation, for each treatment. (**B**) e (**D**), Percentage of tomato and *N. benthamiana* plants, respectively, in which viral infection was confirmed by PCR at 28 dpi using species-specific primers, for each treatment. Treatments as in Table 2.

Figure 3. Viral DNA accumulation in tomato and *Nicotiana benthamiana* plants inoculated with ToYSV and ToRMV separately or in combination. Total DNA was extracted from systemically infected leaves at 14 and 28 days post-inoculation (dpi), and 2 µg of DNA were separated by electrophoresis. DNA accumulation was analyzed by hybridization with virus-specific probes (indicated at the left). The relative positions

of open circular (oc), covalently closed (cc) and single stranded (ss) DNA forms are indicated at the right. The numbers below each lane indicate the relative intensity of the signal (average of three independent experiments), based on the average pixel intensity measured with the program Multi Gauge v. 3.0. For each blot, average values followed by the same letter do not differ statistically according to Tukey's test at 5% probability.

Figure 4. Replication of ToYSV and ToRMV in *Nicotiana benthamiana* protoplasts. Protoplasts were electroporated with infectious clones corresponding to the DNA-A of ToYSV and ToRMV, separately or in combination. Cells were collected at 48 and 96 hours post-electroporation (hpe), total DNA was extracted, and 2 µg of DNA were separated by electrophoresis. DNA accumulation was analyzed by hybridization with virus-specific probes (indicated at the left). The relative positions of open circular (oc), covalently closed (cc) and single stranded (ss) DNA forms are indicated at the right. The numbers below each lane indicate the relative intensity of the signal (average of three independent experiments), based on the average pixel intensity measured with the program Multi Gauged v. 3.0. For each blot, average values followed by the same letter do not differ statistically according to Tukey's test at 5% probability.

Figure 5. Localization of ToYSV and ToRMV in tomato and *N. benthamiana* by *in situ* hybridization at 28 days post-inoculation. Semi thin sections prepared from infected plants were hybridized with virus-specific probes and examined in a light microscope. In tomato plants infected by ToRMV (**A**) or ToYSV (**B**), viral DNA was detected only in cells of the vascular tissues (indicated by arrowheads). In *N. benthamiana* plants ToRMV was detected only in the vasculature, while ToYSV was detected in mesophyll cells (**C**), (**D**). In mixed infection, ToRMV was detected in mesophyll cells (**E**). The ToRMV-specific probe did not detect ToYSV in plants with single infection by this virus (**F**).

Figure 1

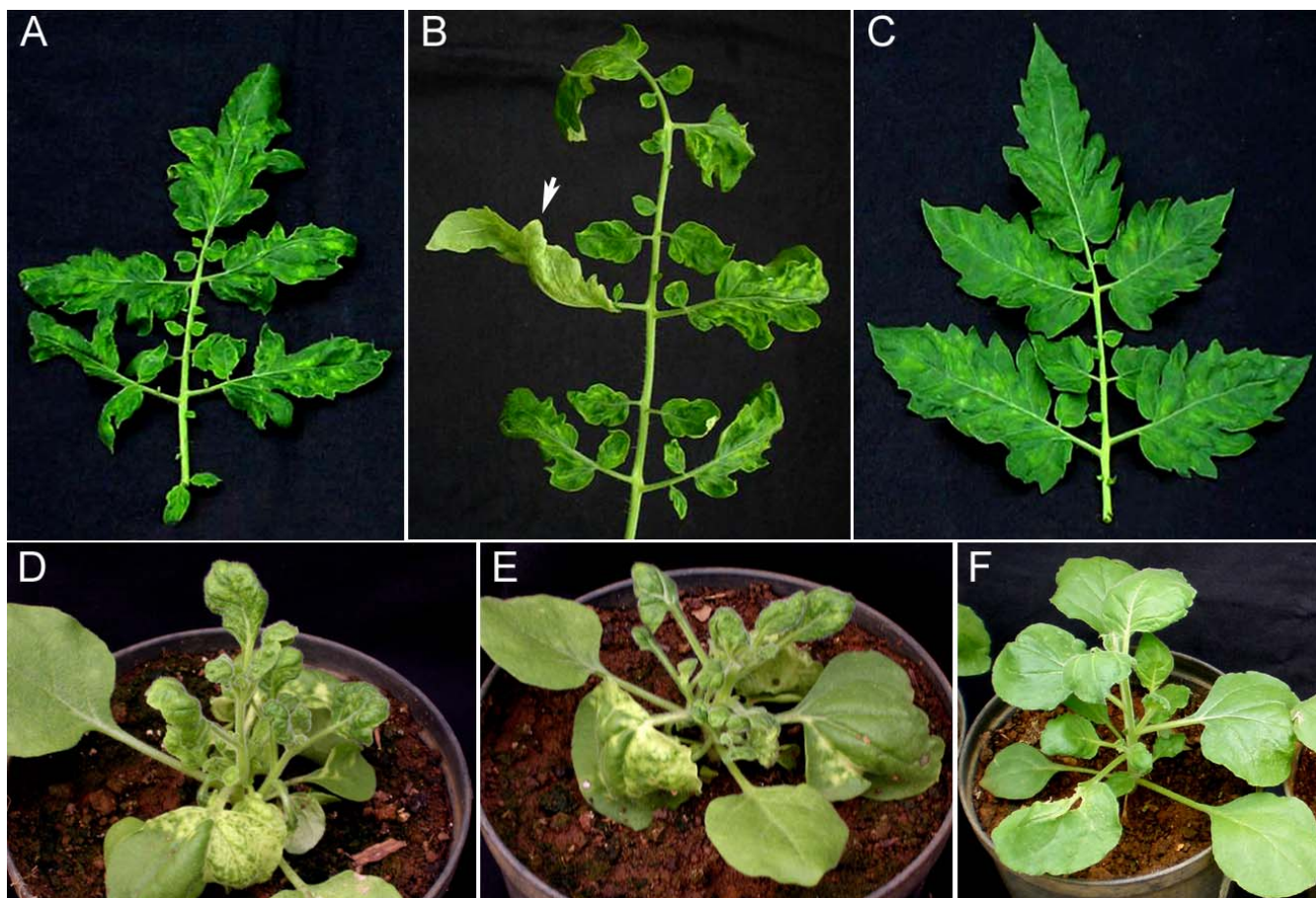


Figure 2

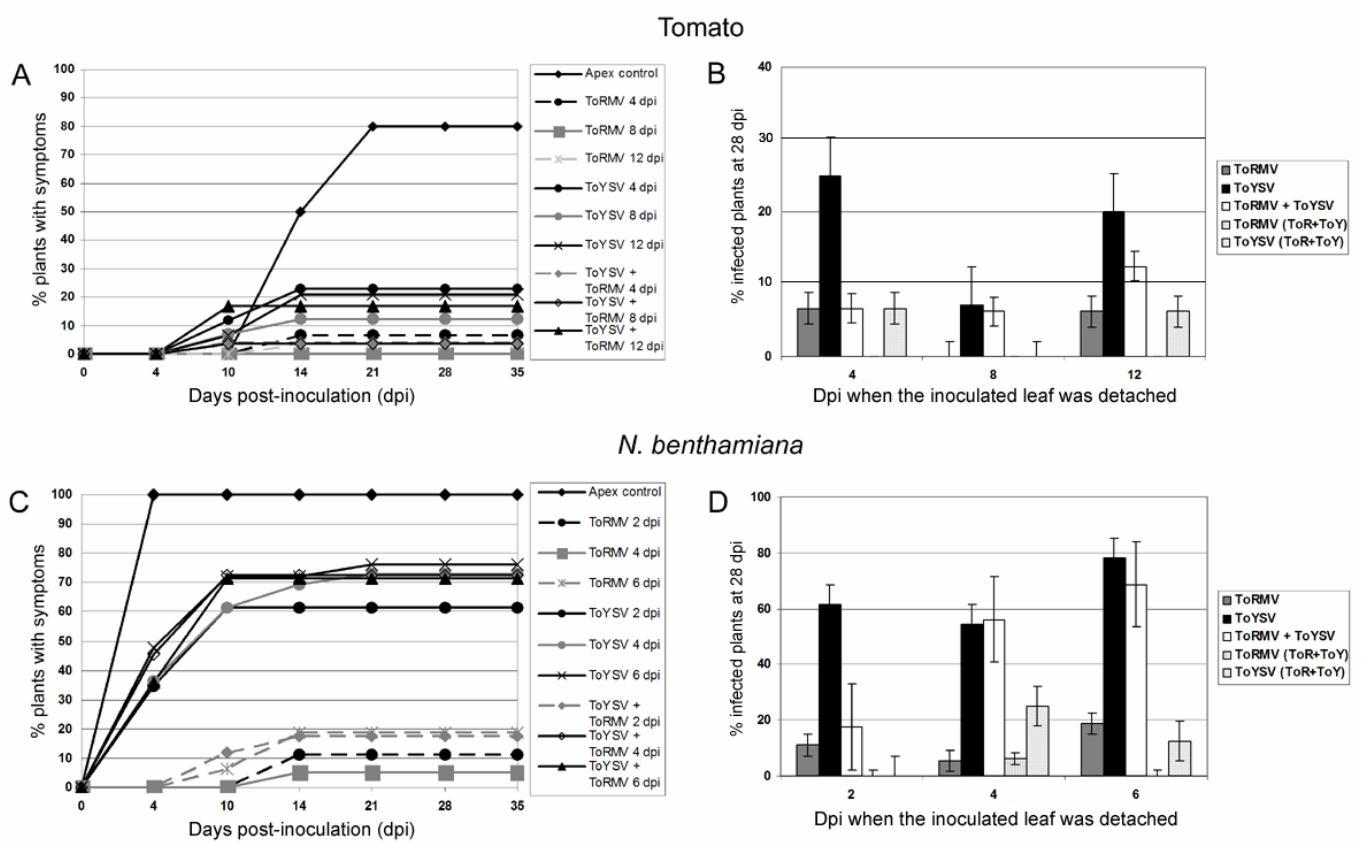


Figure 3

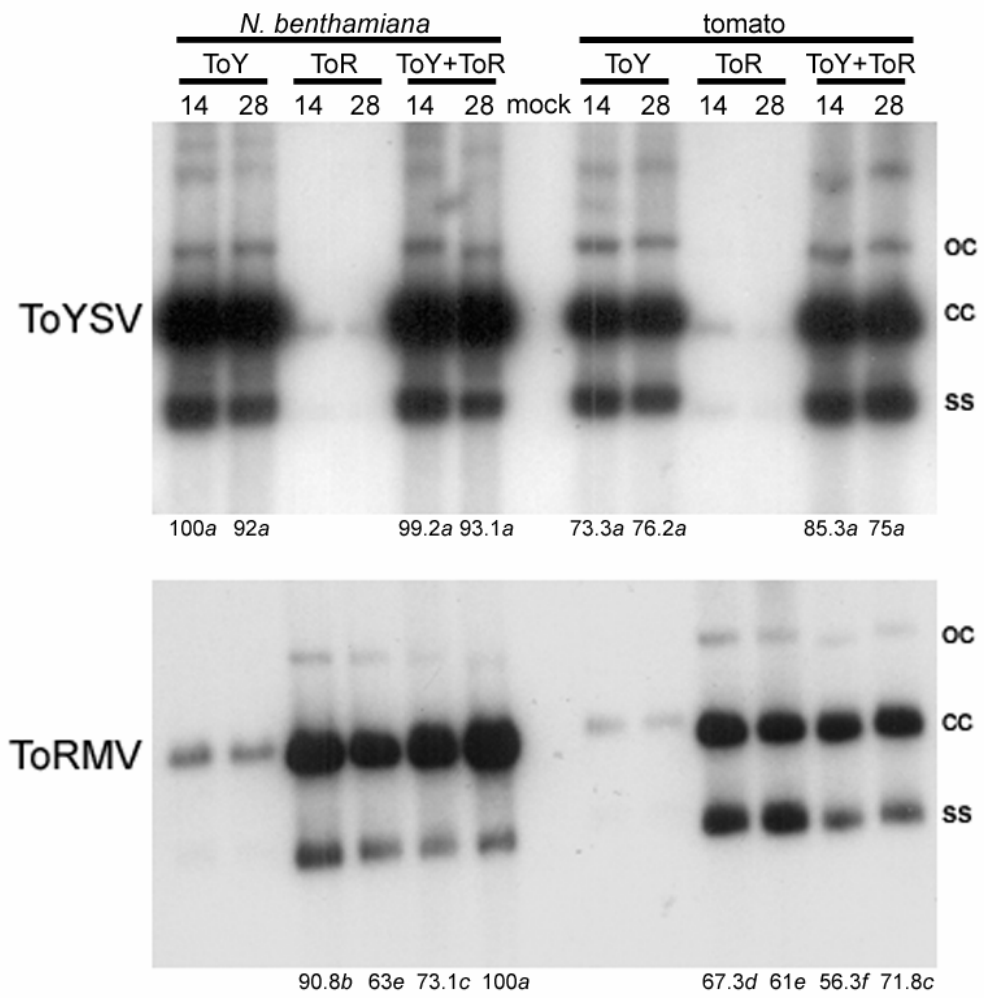


Figure 4

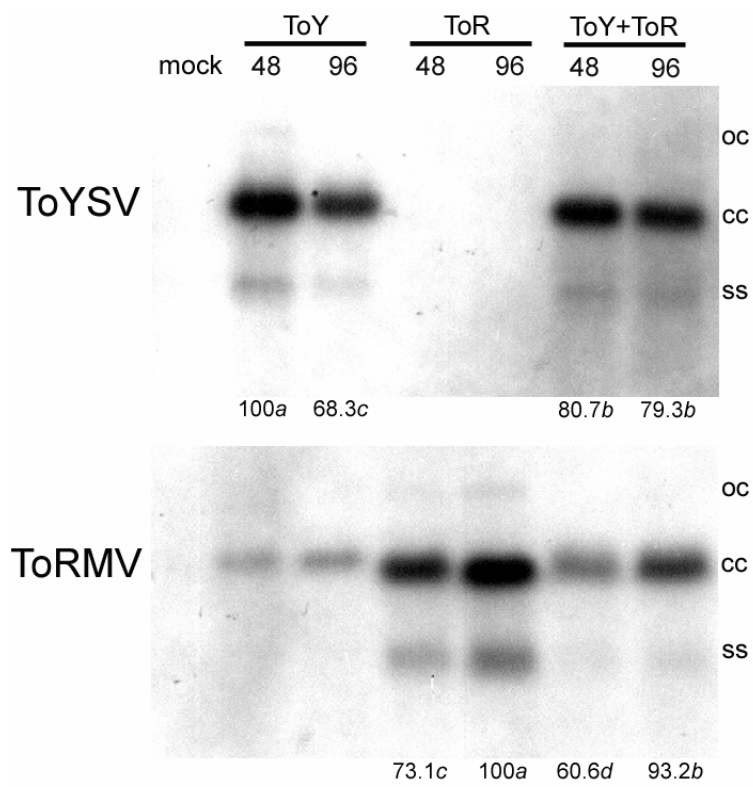


Figure 5

