

RENATA FAIER CALEGARIO

CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO DO BEGOMOVÍRUS
Sida micrantha mosaic virus (SimMV)

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2004

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente à minha filha Pietra pelo amor, companheirismo e por compreender a intensidade do meu trabalho em determinados momentos, sabendo abdicar da minha atenção e comportando-se surpreendentemente com maturidade. Aos meus pais Luiz Gonzaga Calegario e Maria de Lourdes Faier por acreditarem no meu potencial, fornecendo todo apoio e por me ensinarem o valor da busca pelo conhecimento. À Dione, Flávio Rolim e Rita por me ajudarem a cuidar da Pietra. À minha irmã Fagoni por sempre me incentivar.

Ao professor Francisco Murilo Zerbini pela orientação, amizade e valiosos ensinamentos durante o curso de Mestrado. À Universidade Federal de Viçosa e a Capes pela concessão da bolsa.

Ao amigo Tutu pela amizade e por acrescentar conhecimento e boas opiniões. Ao meu estagiário Sávio que foi o ajudante de todas as horas. À todas as Atanas pelos bons momentos que passamos juntas estreitando nossa amizade e aos amigos do laboratório e do departamento de Fitopatologia. Aos amigos Marije, Amir, Thyaga, Shanti e filhos por serem a extensão da minha família e por me transmitirem paz. À Vanessa amiga e mestre, ao Mateus por todo amor e a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

RENATA FAIER CALEGARIO, filha de Luiz Gonzaga Calegario e Maria de Lourdes Faier, nasceu em 19 de dezembro de 1974, em Guarulhos, no estado de São Paulo.

Ingressou na Universidade Federal de Viçosa em 1996, graduando-se como Engenheiro Agrônomo no início de 2002. No mesmo ano, iniciou o Programa de Mestrado em Fitopatologia, na mesma universidade, com área de concentração em Virologia. Em maio de 2004 submeteu-se à defesa de tese de Mestrado.

ÍNDICE

Resumo	v
Abstract.....	vii
Introdução Geral	1
Características gerais dos geminivírus.....	1
Geminivírus em tomateiro	4
Literatura Citada	7
Artigo 1 - Caracterização de um isolado do begomovírus <i>Sida micrantha mosaic virus</i> (SimMV).....	12
Resumo	13
Abstract.....	14
Introdução	14
Materiais e Métodos	15
Obtenção e manutenção do isolado viral	15
Caracterização biológica	16
Caracterização molecular.....	17
Análise filogenética	18
Resultados.....	19
Gama de hospedeiros do isolado MG-Bi2	19
Seqüenciamento do genoma viral e análise comparativa das seqüências	19
Análise filogenética	20
Discussão	21
Literatura Citada	25

RESUMO

CALEGARIO, Renata Faier, M.S., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2004.
Caracterização de um isolado do begomovírus *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV). Orientador: Francisco Murilo Zerbini Junior. Conselheiros: Murilo Geraldo de Carvalho e Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

A família *Geminiviridae*, caracterizada pela morfologia de partículas icosaédricas geminadas e genoma composto por DNA de fita simples circular, é dividida em quatro gêneros, de acordo com o tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros, organização do genoma e relacionamento filogenético. Os begomovírus possuem dois componentes genômicos, são transmitidos por mosca-branca e infectam dicotiledôneas. A partir de 1994 houve relatos sucessivos de begomovírus em tomateiro em diversos estados brasileiros. O seqüenciamento parcial do genoma de alguns destes vírus revelou que há uma grande diversidade de espécies, provavelmente como resultado da disseminação de vírus nativos pelo biótipo B da mosca-branca *Bemisia tabaci*. O objetivo do presente trabalho foi a caracterização biológica e molecular de um isolado de begomovírus detectado em tomateiros do município de São Joaquim de Bicas, MG, denominado MG-Bi2. A caracterização biológica consistiu no teste de gama de hospedeiros, realizado por meio de inoculação via extrato foliar tamponado e biobalística. Os resultados indicaram que o isolado infecta plantas das famílias Solanaceae e Amaranthaceae e que a transmissão é altamente dependente do método de inoculação. Para a caracterização molecular, procedeu-se à amplificação do genoma viral (DNA-A e -B) utilizando a DNA polimerase do bacteriófago $\Phi 29$, seguida de clonagem e determinação de suas seqüências parciais de nucleotídeos. A comparação de seqüências e análise filogenética demonstraram relacionamento próximo com o genoma de *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV), indicando que o isolado MG-Bi2 pertence a esta espécie, e reforçando a hipótese de que

plantas daninhas e silvestres servem como reservatório natural para os geminivírus que infectam plantas cultivadas como o tomateiro.

ABSTRACT

CALEGARIO, Renata Faier, M.S., Universidade Federal de Viçosa, May 2004.
Characterization of an isolate of the begomovirus *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV). Advisor: Francisco Murilo Zerbini Junior. Committee Members: Murilo Geraldo de Carvalho and Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

The *Geminiviridae* family, characterized by a particle morphology of twinned incomplete icosahedra and a single-stranded, circular DNA genome, is divided into four genera according to the type of insect vector, host range, genomic organization and phylogeny. Begomoviruses have two genomic components and are transmitted by whiteflies to dicotyledoneous plants. Since 1994 there have been successive reports of begomovirus infection in tomatoes in several states of Brazil. Partial genome sequencing of several isolates revealed a high degree of genetic diversity, probably due to the dissemination of indigenous viruses by the B biotype of the whitefly *Bemisia tabaci*. The objective of the present work was the biological and molecular characterization of a begomovirus isolate detected in tomatoes in the city of São Joaquim de Bicas, MG, named MG-Bi2. Biological characterization consisted on a host range study using sap inoculation and particle bombardment. Results indicated that the isolate infects species of Solanaceae and Amaranthaceae, and that transmission is highly dependent on the inoculation method. For the molecular characterization, the full-length genome (DNA-A and -B) was amplified using the DNA polymerase of bacteriophage Φ 29, cloned and partially sequenced. Sequence comparisons and phylogenetic analyses demonstrated a close relationship with *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV), indicating that the isolate MG-Bi2 is a member of this species, and reinforcing the hypothesis that weeds and wild plants could act as a natural reservoir of indigenous begomoviruses which can infect crop plants such as the tomato.

INTRODUÇÃO GERAL

Características gerais dos geminivírus

Os geminivírus (família *Geminiviridae*) são considerados um grupo emergente de vírus de plantas, devido ao aumento na incidência e severidade das doenças por eles causadas nas últimas duas décadas (Brown & Bird, 1992). Estas viroses, que ocorrem em diversas culturas economicamente importantes, são consideradas uma grande ameaça à agricultura em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo por causarem grandes perdas (Polston & Anderson, 1997; Faria *et al.*, 2000; Morales & Anderson, 2001).

O genoma dos geminivírus é constituído de DNA circular de fita simples, com 2.500 a 3.000 nucleotídeos, encapsidado por um só tipo de proteína estrutural disposta na forma de 22 capsômeros, conferindo à partícula viral a aparência de dois icosaedros incompletos geminados com cerca de 18 x 30 nm (Lazarowitz, 1992; Rybicki, 1994; Zhang *et al.*, 2001). A família é dividida em quatro gêneros, *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus*, com base no número de componentes e organização do genoma, inseto vetor, gama de hospedeiros e relacionamento filogenético (Van Regenmortel *et al.*, 2000).

Em *Mastrevirus* há um só componente genômico e os vírus são transmitidos por cigarrinhas (Homoptera: Cicadellidae) a plantas monocotiledôneas. *Maize streak virus* (MSV) é a espécie-tipo deste gênero. O gênero *Curtovirus* é constituído de espécies com um único componente genômico, transmitidas por cigarrinhas a plantas dicotiledôneas. O *Beet curly top virus* (BCTV) é a espécie-tipo. Em *Topocuvirus* há também um só componente genômico, os vírus são transmitidos por cigarrinhas (Homoptera: Auchenorrhyncha) a dicotiledôneas e existe apenas uma espécie, o *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV). O gênero *Begomovirus* inclui espécies com um ou dois componentes genômicos que são transmitidos por “mosca-branca” (*Bemisia tabaci*,

Homoptera:Aleyrodidae) a dicotiledôneas. O *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) é a espécie-tipo.

O genoma da ampla maioria dos begomovírus é composto por duas moléculas de DNA, denominadas DNA-A e DNA-B, encapsidadas separadamente, e está organizado conforme indicado na Figura 1. Ambos os componentes são necessários à infecção sistêmica (Stanley, 1983), localizando-se no DNA-A os genes responsáveis pela replicação e encapsidamento do genoma viral, e no DNA-B os genes responsáveis pela movimentação do vírus na planta (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). Os dois componentes diferem quanto à sequência nucleotídica, exceto na região comum (RC), com cerca de 200 bases, que é altamente conservada para a mesma espécie viral e para a qual a identidade é normalmente superior a 90% entre o DNA-A e o DNA-B. Na região comum encontram-se a origem de replicação e os promotores da transcrição dos mRNAs virais (Lazarowitz, 1992; Fontes *et al.*, 1994b).

O DNA-A contém de quatro a seis genes. Na fita de sentido viral encontram-se o gene *cp* e a ORF AV2 (ou “precoat”, presente apenas nos begomovírus do hemisfério oriental). Na fita de sentido complementar encontram-se os genes *rep*, *trap* e *ren*. A função do gene *cp* é codificar a proteína do capsídeo viral. Além da montagem da partícula, a proteína capsidial é essencial à transmissão do vírus e determina a especificidade do inseto vetor. Entretanto, para a maioria dos begomovírus, essa proteína não é necessária para a infecção sistêmica da planta. A ORF AV2 codifica a proteína “precoat”, que está associada à movimentação sistêmica do vírus. O gene *rep* (“replication-associated protein”) codifica a única proteína essencial ao processo de replicação destes vírus. O gene *ren* (“replication-enhancer protein”) codifica uma proteína acessória à replicação viral. Embora esta proteína não seja essencial no processo de replicação, o DNA viral acumula-se em quantidade muito maior quando ela se encontra presente. O produto do gene *trap* (“trans-activating protein”) é uma proteína ativadora da transcrição dos genes localizados na fita viral (*cp* e *ns*). No DNA-B localizam-se os genes *ns*, na fita viral, e *mp*, na fita complementar (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). O gene *ns* codifica a proteína “nuclear shuttle”, necessária para o tráfego intracelular de DNA viral do núcleo para o citoplasma. O gene *mp* codifica a proteína envolvida no movimento célula-a-célula do DNA viral por meio do aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas (revisado por Gutierrez, 1999).

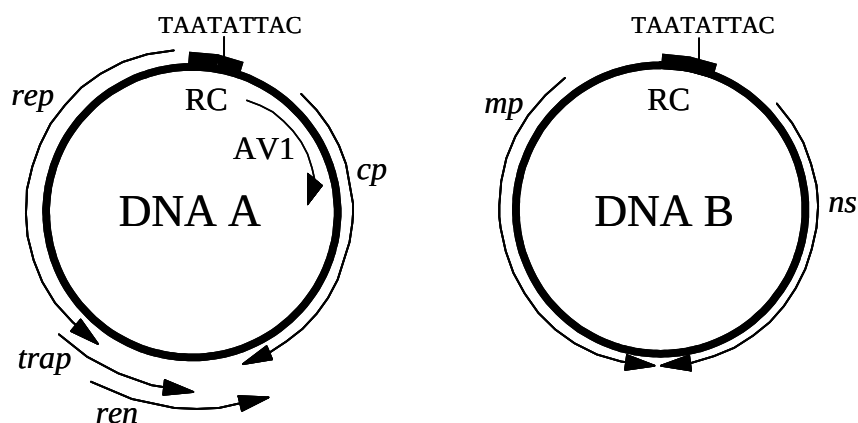


Figura 1. Representação esquemática do genoma de um begomovírus típico. Os círculos representam o genoma viral, constituído de dois componentes (DNA-A e DNA-B), cada um com aproximadamente 2.600 nucleotídeos. As setas indicam os genes virais e a direção em que ocorre a transcrição: rep, “replication-associated protein”; trap, “trans-activating protein”; ren, “replication-enhancer protein”; cp, proteína capsidial (“coat protein”); mp, “movement protein”; ns, “nuclear shuttle”. A região comum (RC) também está indicada. A sequência TAATATTAC, conservada em todos os membros da família *Geminiviridae*, constitui a origem de replicação do genoma 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 (provavelmente de forma espontânea) do capsídeo (Lazarowitz, 1992; Palmer & Rybicki, 1998). Em seguida o DNA viral é transportado para o núcleo da célula hospedeira, onde o ssDNA é convertido em 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 para os mRNAs virais. O genoma viral é replicado por meio do mecanismo de círculo rolante, semelhante ao utilizado pelos bacteriófagos ϕ X174 e M13, utilizando a RF como molde (Stanley, 1995).

A origem de replicação está localizada na região intergênica, comum entre os dois componentes genômicos. Nesta região está localizada uma sequência repetida e invertida composta predominantemente por guanina e citosina, que forma uma estrutura conservada (“structurally-conserved element”, SCE) em forma de grampo, com uma alça contendo a sequência conservada 5’-TAATATTAC-3’, encontrada em todos os geminivírus (Lazarowitz, 1992). É neste nonanucleotídeo que ocorre a clivagem (TAATATT↓AC) que inicia o processo de replicação por círculo rolante, realizada pela proteína Rep, que

funciona como uma endonuclease sítio-específica com requerimento de estrutura e de sequência (Laufs *et al.*, 1995; Orozco & Hanley-Bowdoin, 1998). Na região comum encontram-se também sequências específicas para a ligação da proteína Rep (Fontes *et al.*, 1992; Fontes *et al.*, 1994a) e regiões promotoras da RNA polimerase tipo II, 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 & Hanley-Bowdoin, 1998), sendo constituído de duas sequências 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 cliva o nonanucleotídeo localizado na SCE, dando início à replicação por círculo rolante (Gutierrez, 1999).

Após a replicação viral na primeira célula infectada, é necessário que o vírus mova para outras células e se espalhe por toda planta para o estabelecimento de infecção sistêmica. O movimento no interior do hospedeiro pode ser dividido em dois processos: movimento célula-a-célula, via plasmodesmas, e movimento a longa distância, no qual o vírus atinge o sistema vascular e é transportado sistemicamente para toda a planta hospedeira. Para isto, os begomovírus codificam uma proteína não estrutural denominada MP. Essa proteína associa-se à membrana celular e 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 & Rybicki, 1998), que é realizada por uma segunda proteína de movimento denominada NS. Estas duas proteínas de movimento, atuando de maneira cooperativa (Sanderfoot & Lazarowitz, 1995), permitem ao vírus infectar sistemicamente o hospedeiro.

Geminivírus em tomateiro

A cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é uma das mais afetadas pelos geminivírus (Polston & Anderson, 1997; Ribeiro *et al.*, 1998; Moriones & Navas-Castillo, 2000; Morales & 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 reportadas em diversas regiões das Américas, incluindo-se os EUA (principalmente o estado da Flórida), México, Caribe, América Central e Venezuela, como resultado de infecção por begomovírus (Polston & Anderson, 1997). A incidência pode ser tão severa a ponto de impossibilitar o

cultivo comercial em determinadas regiões, a exemplo do *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) na República Dominicana (Polston & Anderson, 1997). No México, diversos geminivírus que infectam tomateiros foram descritos nos últimos dez anos (Brown & Nelson, 1988; Brown & Poulos, 1990; Torres-Pacheco *et al.*, 1993; Paplomatas *et al.*, 1994).

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 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 novo biótipo (biótipo B) de *B. tabaci*, provavelmente introduzido pela importação de plantas ornamentais da Europa ou dos EUA (Melo, 1992). Comparado ao A, o biótipo B de *B. tabaci* apresenta maior grau de adaptação e dispersão, além de gama de hospedeiros muito mais ampla, que inclui solanáceas como o tomateiro, e diversas espécies de plantas silvestres e/ou daninhas.

A presença do biótipo B no Distrito Federal foi confirmada em 1993, associada a sintomas de infecção por begomovírus em tomateiros para processamento industrial. Esses sintomas incluíam clorose, redução de crescimento, encrespamento das folhas, floração reduzida, frutos com áreas descoloridas e redução do grau brix (Ribeiro *et al.*, 1994; França *et al.*, 1996). A partir de plantas com sintomas típicos, fragmentos de DNA correspondendo aos dois componentes genômicos dos begomovírus foram amplificados via PCR. A sequência de nucleotídeos nesses 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* (TYVSV), 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 industrialização no Brasil, acarretando perdas de até 100% em

diversas áreas (Bezerra *et al.*, 1997) e o virtual abandono da tomaticultura intensiva na região. 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 por Rezende *et al.* (1996) e Zerbini *et al.* (1996b). A comparação da sequência nucleotídica completa dos componentes A e B com as de outros begomovírus comprovou tratar-se de uma nova espécie, denominada *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) (Fernandes *et al.*, 2000; Ribeiro *et al.*, 2003). Levantamento de campo realizado em junho de 2000 nos municípios de Araguari, Indianópolis e Uberlândia indicou a prevalência do ToRMV, detectado em 108 (73%) das 148 amostras coletadas e positivas para begomovírus (Fernandes, 2001).

Na Zona Metalúrgica de Minas Gerais, outro begomovírus foi isolado de amostras de tomateiro (Zerbini *et al.*, 1996a) e caracterizado biológica e molecularmente (Ambrozevicius *et al.*, 1999; Andrade *et al.*, 2002). A comparação da sequência completa de nucleotídeos dos DNA-A e -B com outros begomovírus (incluindo o TCIVV, ToRMV e TYVSV) 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).

Além do ToRMV e ToCMoV, um isolado distinto de begomovírus foi detectado em São Joaquim de Bicas, Minas Gerais, causando sintomas em tomateiros mais severos do que aqueles causados pelo ToCMoV e ToRMV. Esse isolado, denominado “C12” por Ambrozevicius *et al.* (2002), foi posteriormente renomeado para “MG-Bi2”, a fim de padronizar a nomenclatura de isolados brasileiros de begomovírus infectando o tomateiro (Ribeiro *et al.*, 2003). Plantas de tomateiro infectadas pelo isolado MG-Bi2 apresentam mosaico amarelo intenso e subcrescimento acentuado, com redução de área foliar e enrolamento foliolar.

Estes relatos, considerados em conjunto, indicam claramente que o surgimento de novos begomovírus em tomateiros no Brasil foi favorecido pela rápida disseminação do biótipo B de *B. tabaci* (Lourenção & Nagai, 1994; Haji *et al.*, 1999). Agindo como vetor, o inseto teria permitido que vírus infectando plantas silvestres e daninhas chegassem ao tomateiro e, por meio de recombinação e/ou reagrupamento de componentes do genoma, se

adaptassem ao novo hospedeiro em um processo evolutivo que procurou explorar da melhor forma possível este novo nicho ecológico, culminando com o surgimento de novas espécies de geminivírus. Estudos anteriores realizados no México e nos EUA sugerem que esse processo de evolução e adaptação pode ocorrer em períodos de tempo relativamente curtos (Hou & Gilbertson, 1996; Torres-Pacheco *et al.*, 1996).

Este trabalho teve como objetivos a caracterização biológica e molecular do isolado MG-Bi2, a fim de estabelecer o relacionamento do vírus em estudo com outras espécies anteriormente descritas, além de proporcionar suporte para a definição de estratégias mais eficazes no controle de begomovírus em tomateiro.

LITERATURA CITADA

- Alfenas, P.C., Galvão, R.M., Andrade, E.C., Mandelli, M.S., Fernandes, A.V., Zerbini, F.M. & Fontes, E.P.B. Detecção e caracterização molecular de novos geminivírus que infectam tomateiros. *Fitopatologia Brasileira*, v. 23, p. 311, 1998.
- Ambrozevicius, L.P., Andrade, E.C., Zambolim, E.M., Fontes, E.P.B. & Zerbini, F.M. Incidence and host range of TGV-Ig, a bipartite *Begomovirus* from the "Zona Metalúrgica" of Minas Gerais, Brazil. *Virus Reviews and Research*, v. 4, p. 155, 1999.
- Ambrozevicius, L.P., Calegario, R.F., Fontes, E.P.B., Carvalho, M.G. & Zerbini, F.M. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 27, p. 372-377, 2002.
- Andrade, E.C., Ambrozevicius, L.P., Calegario, R.F., Fontes, E.P.B. & Zerbini, F.M. Molecular cloning and characterization of *Tomato chlorotic mottle virus* (TCMV), a new tomato-infecting begomovirus. *Virus Reviews and Research*, v. 7, p. 153, 2002.
- Bedford, I.D., Briddon, R.W., Brown, J.K., Rosell, R.C. & Markham, P.G. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographical regions. *Annals of Applied Biology*, v. 125, p. 311-325, 1994.
- Bezerra, I.C., Lima, M.F., Ribeiro, S.G., Giordano, L.B., Zerbini, F.M. & Ávila, A.C. Occurrence of geminivirus in tomato-producing areas in Submédio São Francisco. *Fitopatologia Brasileira*, v. 22, p. 331, 1997.
- Bezerra, I.C., Ribeiro, S.G., Ávila, A.C. & Giordano, L.B. Survey of geminivirus infection in tomato producing areas in Federal District. VIII Encontro Nacional de Virologia. São Lourenço, MG, p. 289, 1996.
- Brown, J.K. & Bird, J. Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean basin. *Plant Disease*, v. 76, p. 220-225, 1992.

- Brown, J.K. & Nelson, M.R. Transmission, host range, and virus-vector relationships of chilo del tomate virus, a whitefly-transmitted geminivirus from Sinaloa, Mexico. *Plant Disease*, v. 72, p. 866-869, 1988.
- Brown, J.K. & Poulos, B.T. Serrano golden mosaic virus: A newly identified whitefly-transmitted geminivirus of pepper and tomato in the United States and Mexico. *Plant Disease*, v. 74, p. 720, 1990.
- Costa, A.S., Oliveira, A.R. & Silva, D.M. Transmissão mecânica do mosaico dourado do tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 6, p. 147, 1975.
- Faria, J.C., Bezerra, I.C., Zerbini, F.M., Ribeiro, S.G. & Lima, M.F. Situação atual das geminiviroses no Brasil. *Fitopatologia brasileira*, v. 25, p. 125-137, 2000.
- Faria, J.C., Souza-Dias, J.A.C., Slack, S. & Maxwell, D.P. A new geminivirus associated with tomato in the State of São Paulo, Brazil. *Plant Disease*, v. 81, p. 423, 1997.
- 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, 192 p., 2001.
- Fernandes, J.J., Fontes, E.P.B., Brommonschenkel, S.H., Carvalho, M.G. & Zerbini, F.M. Molecular cloning and sequencing of *Tomato rugose mosaic virus*, a geminivirus isolated from tomatoes at "Triângulo Mineiro", Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 25, p. 440, 2000.
- Fontes, E.P.B., Eagle, P.A., Sipe, P.S., Luckow, V.A. & Hanley-Bowdoin, L. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, p. 8459-8465, 1994a.
- Fontes, E.P.B., Gladfelter, H.J., Schaffer, R.L., Petty, I.T.D. & Hanley-Bowdoin, L. Geminivirus replication origins have a modular organization. *Plant Cell*, v. 6, p. 405-416, 1994b.
- Fontes, E.P.B., Luckow, V.A. & Hanley-Bowdoin, L. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. *Plant Cell*, v. 4, p. 597-608, 1992.
- França, F.H., Villas-Boas, G.L. & Castelo-Branco, M. Ocorrência de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera:Aleyrodidae) no Distrito Federal. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v. 25, p. 369-372, 1996.
- Galvão, R.M., Almeida, J.A., Camini, N., Zerbini, F.M. & Fontes, E.P.B. Molecular detection and biobalistic propagation of novel Malvaceae- and tomato-infecting geminiviruses. *Fitopatologia Brasileira*, v. 22, p. 335, 1997.
- Gutierrez, C. Geminivirus DNA replication. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 56, p. 313-329, 1999.

- Haji, F.N.P., Lima, M.F., Mattos, M.A., Nunes, A.M., Alencar, J.A. & 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, 1999.
- Hanley-Bowdoin, L., Settlege, S.B., Orozco, B.M., Nagar, S. & Robertson, D. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 18, p. 71-106, 1999.
- Hou, Y.M. & Gilbertson, R.L. Increased pathogenicity in a pseudorecombinant bipartite geminivirus correlates with intermolecular recombination. *Journal of Virology*, v. 70, p. 5430-5436, 1996.
- Laufs, J., Schumacher, S., Geisler, N., Jupin, I. & Gronenborn, B. Identification of the nicking tyrosine of geminivirus Rep protein. *FEBS Letters*, v. 377, p. 258-262, 1995.
- Lazarowitz, S.G. Geminiviruses: genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 11, p. 327-349, 1992.
- Lourenção, A.L. & Nagai, H. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. *Bragantia*, v. 53, p. 53-59, 1994.
- Matyis, J.C., Silva, D.M., Oliveira, A.R. & Costa, A.S. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. *Summa Phytopathologica*, v. 1, p. 267-275, 1975.
- Melo, P.C.T. Mosca branca ameaça produção de hortaliças. Campinas, SP, Brazil: Asgrow do Brasil Sementes Ltda., Technical Bulletin, 1992.
- Morales, F.J. & Anderson, P.K. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology*, v. 146, p. 415-441, 2001.
- Moriones, E. & Navas-Castillo, J. *Tomato yellow leaf curl virus*, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Research*, v. 71, p. 123-134, 2000.
- Noueiry, A.O., Lucas, W.J. & Gilbertson, R.L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell*, v. 76, p. 925-932, 1994.
- Orozco, B.M. & Hanley-Bowdoin, L. Conserved sequence and structural motifs contribute to the DNA binding and cleavage activities of a geminivirus replication protein. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, p. 24448-24456, 1998.
- Palmer, K.E. & Rybicki, E.P. The molecular biology of mastreviruses. *Advances in Virus Research*, v. 50, p. 183-234, 1998.
- Paplomatas, E.J., Patel, V.P., Hou, Y.M., Noueiry, A.O. & Gilbertson, R.L. Molecular characterization of a new sap-transmissible bipartite genome geminivirus infecting tomatoes in Mexico. *Phytopathology*, v. 84, p. 1215-1224, 1994.

- Polston, J.E. & Anderson, P.K. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Disease*, v. 81, p. 1358-1369, 1997.
- Rezende, E.A., Filgueira, F.A.R., Zerbini, F.M., Maciel-Zambolim, E., Fernandes, J.J. & Gilbertson, R.L. Tomato infected with geminivirus in greenhouse conditions at Uberlândia-MG, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 21, p. 424, 1996.
- Ribeiro, S.G., Ambrozevicius, L.P., Ávila, A.C., Bezerra, I.C., Calegario, R.F., Fernandes, J.J., Lima, M.F., Mello, R.N., Rocha, H. & Zerbini, F.M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology*, v. 148, p. 281-295, 2003.
- Ribeiro, S.G., Ávila, A.C., Bezerra, I.C., Fernandes, J.J., Faria, J.C., Lima, M.F., Gilbertson, R.L., Zambolim, E.M. & 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. & Giordano, L.B. Occurrence of geminivirus in tomato plants in Bahia. VIII Encontro Nacional de Virologia (Resumos), São Lourenço, MG, p. 290, 1996.
- Ribeiro, S.G., Mello, L.V., Boiteux, L.S., Kitajima, E.W. & Faria, J.C. Tomato infection by a geminivirus in the Federal District, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 19, p. 330, 1994.
- Rybacki, E.P. A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of Geminiviridae. *Archives of Virology*, v. 139, p. 49-77, 1994.
- Sanderfoot, A.A. & Lazarowitz, S.G. Cooperation in viral movement: The geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery. *Plant Cell*, v. 7, p. 1185-1194, 1995.
- Stanley, J. Infectivity of the cloned geminivirus genome requires sequences from both DNAs. *Nature*, v. 305, p. 643-645, 1983.
- Stanley, J. Analysis of African cassava mosaic virus recombinants suggest strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. *Virology*, v. 206, p. 707-712, 1995.
- Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, J.A., Brown, J.K., Becerra-Flora, A. & Rivera-Bustamante, R. Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the Southern United States. *Phytopathology*, v. 86, p. 1186-1192, 1996.
- Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, J.A., Herrera-Estrela, L. & Rivera-Bustamante, R.F. Complete nucleotide sequence of pepper huasteco virus: Analysis and comparison with bipartite geminiviruses. *Journal of General Virology*, v. 74, p. 2225-2231, 1993.
- Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R. & Wickner, R.B.,

Eds. Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press, 1162 p., 2000.

Zerbini, F.M., Zambolim, E.M., Carrijo, I.V. & 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. & Carrijo, I.V. Um novo geminivírus isolado de tomateiro (*L. esculentum*) em Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira*, v. 21, p. 430, 1996b.

Zhang, W., Olson, N.H., Baker, T.S., Faulkner, L., Agbandje-Mckenna, M., Boulton, M.I., Davies, J.W. & Mckenna, R. Structure of the *Maize streak virus* geminate particle. *Virology*, v. 279, p. 471-477, 2001.

ARTIGO 1

CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO DO BEGOMOVÍRUS *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV)

Calegario, R.F., Ferreira, S.S., Andrade, E.C. & Zerbini, F.M. Caracterização de um isolado do begomovírus *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV).

CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO DO BEGOMOVÍRUS *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV)

Renata F. Calegario, Sávio S. Ferreira, Eduardo C. de Andrade e F. Murilo Zerbini

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa MG, 36570-000.
E-mail: zerbini@ufv.br

(Aceito para publicação em / /)

Autor para correspondência: F. Murilo Zerbini

Calegario, R.F., Ferreira, S. S., Andrade, E.C. & Zerbini, F.M. Caracterização de um isolado do begomovírus *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV).

RESUMO

A família *Geminiviridae*, caracterizada pela morfologia de partículas icosaédricas geminadas e genoma composto por DNA de fita simples circular, é dividida em quatro gêneros, de acordo com o tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros, organização do genoma e relacionamento filogenético. Os begomovírus possuem dois componentes genômicos, são transmitidos por mosca-branca e infectam dicotiledôneas. A partir de 1994 houve relatos sucessivos de begomovírus em tomateiro em diversos estados brasileiros. O sequenciamento parcial do genoma de alguns destes vírus revelou que há uma grande diversidade de espécies, provavelmente como resultado da disseminação de vírus nativos pelo biótipo B da mosca-branca *Bemisia tabaci*. O objetivo do presente trabalho foi a caracterização biológica e molecular de um isolado de begomovírus detectado em tomateiros no município de São Joaquim de Bicas, MG, denominado MG-Bi2. A caracterização biológica consistiu em um teste de gama de hospedeiros, realizado por meio de inoculação via extrato foliar tamponado e biobalística. Os resultados indicaram que o isolado infecta plantas das famílias Solanaceae e Amaranthaceae e que a transmissão é altamente dependente do método de inoculação. A caracterização molecular consistiu na amplificação do genoma viral (DNA-A e -B), clonagem e determinação de sua sequência parcial de nucleotídeos. A comparação de seqüências e análise filogenética demonstraram relacionamento próximo com o genoma de *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV), indicando que o isolado MG-Bi2 pertence a esta espécie, e reforçando a hipótese de que plantas daninhas e silvestres servem como reservatório natural para os geminivírus que infectam plantas cultivadas como o tomateiro.

ABSTRACT

The *Geminiviridae* family is characterized by a particle morphology of twinned incomplete icosahedra and a single-stranded, circular DNA genome, and is divided into four genera according to the type of insect vector, host range, genomic organization and phylogeny. Begomoviruses have two genomic components and are transmitted by whiteflies to dicotyledoneous plants. Since 1994 there have been successive reports of begomovirus infection in tomatoes in several states of Brazil. Partial genome sequencing of several isolates revealed a high degree of genetic diversity, probably due to the dissemination of indigenous viruses by the B biotype of the whitefly *Bemisia tabaci*. The objective of the present work was the biological and molecular characterization of a begomovirus isolate detected in the city of São Joaquim de Bicas, MG, named MG-Bi2. Biological characterization consisted on a host range study using sap inoculation and particle bombardment. Results indicated that the isolate infects species of Solanaceae and Amaranthaceae, and that transmission is highly dependent on the inoculation method. For the molecular characterization, the full-length genome (DNA-A and -B) was amplified using the DNA polymerase of bacteriophage Φ 29, cloned and partially sequenced. Sequence comparisons and phylogenetic analyses demonstrated a close relationship with *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV), indicating that the isolate MG-Bi2 is a member of this species, and reinforcing the hypothesis that weeds and wild plants could act as a natural reservoir of indigenous begomoviruses which can infect crop plants such as the tomato.

INTRODUÇÃO

A família *Geminiviridae* engloba vírus de plantas cujo genoma é composto por DNA circular de fita simples, encapsidado em uma partícula icosaédrica geminada (Lazarowitz, 1992). A família é organizada em quatro gêneros (*Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus*), de acordo com o tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros, organização do genoma e relacionamento filogenético (Van Regenmortel *et al.*, 2000).

Os begomovírus são considerados um grupo emergente de vírus de plantas, devido ao aumento da incidência e severidade das doenças por eles causadas nas últimas décadas (Polston & Anderson, 1997; Morales & Anderson, 2001). Estão amplamente distribuídos,

principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Brown & Bird, 1992; Polston & Anderson, 1997). São transmitidos naturalmente pela “mosca-branca” *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae).

Novas espécies de begomovírus infectando tomateiros foram detectadas ao longo da década de 1990 em várias regiões do Brasil, provavelmente como resultado da rápida disseminação do biótipo B de *B. tabaci* (Ribeiro *et al.*, 2003). No Triângulo Mineiro, uma nova espécie de begomovírus foi identificada em tomateiros por Rezende *et al.* (1996) e Zerbini *et al.* (1996b). A comparação da sequência nucleotídica completa dos componentes A e B com outros begomovírus comprovou tratar-se de uma nova espécie, denominada *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) (Fernandes *et al.*, 2000; Ribeiro *et al.*, 2003). Na Zona Metalúrgica de Minas Gerais, outro begomovírus foi isolado de amostras de tomateiro (Zerbini *et al.*, 1996a) e caracterizado biológica e molecularmente (Ambrozevicius *et al.*, 1999; Andrade *et al.*, 2002). A comparação da sequência completa de nucleotídeos dos DNA-A e -B com outros begomovírus (incluindo o 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.

Além do ToRMV e ToCMoV, um isolado distinto de begomovírus foi detectado em São Joaquim de Bicas, Minas Gerais, causando sintomas em tomateiros mais severos do que aqueles causados pelo ToCMoV e ToRMV. Esse isolado foi denominado MG-Bi2 (Ribeiro *et al.*, 2003). Tomateiros infectados pelo isolado MG-Bi2 apresentam mosaico amarelo intenso e subcrescimento acentuado, com redução de área foliar e enrolamento foliolar.

Este trabalho teve como objetivos a caracterização biológica e molecular do isolado MG-Bi2, por meio da determinação de sua gama de hospedeiros e clonagem dos componentes genômicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção e manutenção do isolado viral

O isolado MG-Bi2 foi encontrado na Zona Metalúrgica de MG, no município de São Joaquim de Bicas, a partir de tomateiro apresentando sintomas de mosaico amarelo, distorção foliar e nanismo. A caracterização parcial do isolado foi realizada por

Ambrozevicius *et al.* (2002). A forma replicativa (RF) do genoma viral foi extraída a partir de plantas infectadas, conforme procedimento descrito por Gilbertson *et al.* (1991), e utilizada para a inoculação de plantas de *Nicotiana benthamiana* via biobalística (Aragão *et al.*, 1996), após tratamento com RNase para eliminar possíveis vírus contaminantes presentes em infecção mista. O isolado foi mantido em plantas de *N. glutinosa*, em casa de vegetação, por meio de inoculações sucessivas via extrato foliar tamponado em fosfato de sódio 0,1 M, pH 8,0, contendo sulfito de sódio a 0,1% (p/v). A identidade do isolado foi confirmada por meio da amplificação de fragmentos genômicos via PCR, utilizando os oligonucleotídeos universais PAL1v1978 e PAR1c496 (Rojas *et al.*, 1993), capazes de amplificar parte do gene *rep*, a região comum e parte do gene *cp*. A reação de PCR foi preparada em um total de 25 µL, contendo tampão 10× (Tris-HCl 100 mM, pH 8,3 e KCl 500 mM), MgCl₂ 25 mM, mistura de dNTPs a 2,5 mM, 20 pmol de cada oligonucleotídeo, uma unidade de *Taq* DNA polimerase e 5 µL de DNA molde, completando-se o volume com água. Foram realizados 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. Os resultados foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose (0,9%). Após eletroforese o gel foi corado com brometo de etídeo a fim de verificar a presença de banda com aproximadamente 1.400 nucleotídeos (nt), correspondente ao fragmento amplificado pelo par de oligonucleotídeos utilizado.

Caracterização biológica

A caracterização biológica consistiu em um teste de gama de hospedeiros, utilizando-se espécies de plantas das famílias Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Cucurbitaceae, Fabaceae e Solanaceae: *Capsicum annuum* L. 'Ikeda', *Chenopodium quinoa* Willd., *Cucurbita pepo* L. 'Caserta', *Datura stramonium* L., *Gomphrena globosa* L., *Lycopersicon esculentum* Mill. 'Miller Early Pack', 'Rutgers' e 'Santa Clara', *Nicotiana benthamiana* Domin., *Nicotiana clelandii*, *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana rustica* L., *Nicotiana glauca*, *Nicotiana tabacum* L. 'Havana 425', 'Sansum', 'TNN', e 'Xanthi', *Phaseolus vulgaris* L. 'Ouro Negro' e 'Pérola' e *Solanum melongena* L..

As plantas foram inoculadas via extrato vegetal tamponado (fosfato de sódio 0,1 M, sulfito de sódio 0,1%, pH 8,0) e por biobalística. O DNA utilizado para a biobalística foi extraído macerando-se 2 gramas de folhas infectadas em N₂ líquido. O pó das folhas foi transferido para tubos de 1,5 mL e em seguida foram adicionados 500 µL de tampão de lise (Tris-HCl 50 mM pH7,5, NaCl 100 mM, EDTA 50 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, SDS

0,5%). O conteúdo foi agitado vigorosamente por 2 minutos e incubado em temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida foram adicionados 150 µL de fenol a cada tubo, agitou-se vigorosamente por 2 minutos e incubou-se a temperatura ambiente por 2 minutos. Após incubação adicionou-se 150 µL de clorofórmio, agitou-se por 2 minutos e centrifugou-se a 12.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e foi adicionado igual volume de isopropanol, incubando-se a -20°C por 12 horas. Em seguida centrifugou-se a 12.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, o “pellet” lavado com 500 µL de etanol 70% e ressuscitado em 200 µL de TE com RNase (1 mg/ml). Em seguida foi adicionado um volume de fenol:clorofórmio, agitou-se por 1 minuto e centrifugou-se a 12.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi coletado, adicionaram-se 500 µL de etanol 100% e procedeu-se nova incubação por 10 minutos a -20°C. Realizou-se nova centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. O “pellet” foi lavado com 500 µL de etanol 70 % e ressuscitado em 30 µL de TE com RNase (1 mg/ml).

Para cada método de inoculação (extrato vegetal tamponado e biobalística) foram inoculadas cinco plantas e duas testemunhas de cada espécie/cultivar. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação e observadas com relação ao surgimento de sintomas, até 30 dias após a inoculação. A fim de confirmar os resultados obtidos com a avaliação visual, extraiu-se DNA de acordo com o método de Dellaporta *et al.* (1983), a partir de discos foliares de todas as plantas inoculadas e das testemunhas. O DNA foi utilizado para a amplificação de fragmentos genômicos via PCR utilizando-se os oligonucleotídeos universais PAL1v1978 e PAR1c496 (Rojas *et al.*, 1993). Os resultados foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose (0,9%). Após eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídeo a fim de verificar a presença da banda de aproximadamente 1.400 nt, correspondente ao fragmento amplificado do isolado MG-Bi2.

Caracterização molecular

A caracterização molecular constituiu no seqüenciamento parcial dos componentes A e B do genoma viral.

O DNA viral foi extraído de acordo com o método de Dellaporta *et al.* (1983), e a forma replicativa foi amplificada utilizando-se o kit “Templiphi” (Amersham Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração do DNA amplificado foi estimada utilizando-se padrões de concentração por meio de eletroforese em gel de agarose (0,9%) corado com brometo de etídeo. Após a quantificação, 500 ng do DNA viral foram

submetidos à clivagem com nove diferentes enzimas de restrição: *Apa* I, *Bam*H I, *Cla* I, *Hind* III, *Not* I, *Sac* I, *Sma* I, *Xba* I e *Xho* I. Uma alíquota do DNA clivado foi aplicada em gel de agarose (0,9%) a fim de determinar sua concentração e para identificar quais as enzimas de restrição que clivariam cada componente em apenas um ponto, linearizando-o e permitindo assim sua clonagem no plasmídeo vetor.

O plasmídeo vetor pBLUESCRIPT II KS+ (pKS+, Stratagene) foi clivado com as mesmas enzimas de restrição que linearizaram o genoma viral e desfosforilado com a enzima fosfatase alcalina. O plasmídeo desfosforilado foi purificado utilizando-se o kit Sephaglass BandPrep (Amersham Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante.

Para a reação de ligação utilizou-se uma proporção 1:12 de vetor:inserto. A reação foi incubada a 25°C por 1 hora. Células competentes de *E. coli* DH5 foram transformadas utilizando-se o método do choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989). A clonagem foi confirmada por meio de digestão enzimática dos plasmídeos recombinantes, a fim de verificar se o inserto realmente possuía o tamanho correspondente ao componente genômico completo (aprox. 2.600 nt). Os clones correspondentes ao genoma viral completo foram mantidos em *E. coli*, na forma de culturas armazenadas na presença de glicerol a -80°C.

As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando-se o kit “BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (Perkin Elmer), de acordo com as instruções do fabricante, e analisadas em um seqüenciador automático ABI 310 (Applied Biosystems). Com base nas seqüências geradas com os oligonucleotídeos M13F e M13R, sintetizaram-se oligonucleotídeos específicos a fim de permitir o seqüenciamento do genoma do isolado MG-Bi2 (Quadro 1).

Análise filogenética

As seqüências de aminoácidos da proteína capsidial (CP) (DNA-A) e das proteínas de movimento (MP) e NS (DNA-B) foram comparadas às seqüências de outros begomovírus (Quadro 2). As seqüências foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal W (www.ebi.ac.uk/clustalw). Árvores filogenéticas foram preparadas utilizando-se o programa MEGA (www.megasoftware.net).

RESULTADOS

Gama de hospedeiros do isolado MG-Bi2

Os resultados do teste de gama de hospedeiros são apresentados no Quadro 3. A infecção foi confirmada por meio de PCR com oligonucleotídeos universais para begomovírus, que amplificam um fragmento com aproximadamente 1.400 nt (Figura 1).

O isolado MG-Bi2 foi capaz de infectar sistemicamente plantas da família Amaranthaceae (*G. globosa*) e Solanaceae, incluindo *C. annuum* 'Ikeda', *D. stramonium*, *L. esculentum* 'Miller Early Pack', *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. glutinosa*, *N. rustica*, *N. tabacum* e *N. sylvestris*.

De modo geral, os sintomas induzidos pelo isolado MG-Bi2 nas plantas hospedeiras foram bastante severos, consistindo em mosaico amarelo, encarquilhamento das folhas, bolhosidade e redução de crescimento da planta (Figura 2). Plantas de *N. sylvestris* e *N. tabacum* 'Havana' apresentaram infecção latente quando inoculadas via extrato vegetal tamponado, e plantas de *G. globosa* e tomateiro 'Miller Early Pack' apresentaram infecção latente quando inoculadas via biobalística.

Em relação às duas formas de inoculação, foram observadas diferenças na capacidade do vírus em infectar sistemicamente as plantas. A inoculação via extrato vegetal tamponado mostrou-se mais eficiente do que a inoculação via biobalística. Dentre as plantas inoculadas via biobalística, apenas *N. benthamiana*, pimentão, tomateiro 'Miller Early Pack' e *G. globosa* foram infectadas sistemicamente. O oposto foi observado em plantas de *D. stramonium*, *N. glutinosa*, *N. tabacum*, *N. clevelandii*, *N. rustica* e *N. sylvestris*, que foram infectadas sistemicamente somente por meio de inoculação via extrato vegetal tamponado. Plantas de *N. benthamiana* e pimentão foram infectadas sistemicamente com ambos os métodos de inoculação, e nesses casos não foram observadas diferenças na natureza dos sintomas induzidos nas duas espécies.

Seqüenciamento do genoma viral e análise comparativa das seqüências

O genoma completo do MG-Bi2 foi amplificado utilizando-se a DNA polimerase do bacteriófago Φ 29, resultando em uma banda com aproximadamente 2.600 nt (Figura 3). Após amplificação, os padrões de restrição para o DNA-A e -B foram determinados por meio de digestão enzimática. Os resultados (Figura 4) indicaram que a enzima *Apa* I linearizou um componente de DNA e cortou o outro em dois sítios, sendo portanto descartada para a clonagem. As enzimas *Bam*H I, *Cla* I, *Not* I, *Sma* I e *Xho* I não cortaram

nenhum dos dois componentes de DNA viral, e também foram descartadas. A enzima *Hind* III linearizou apenas um dos componentes e não cortou o outro. As enzimas *Sac* I e *Xba* I foram capazes de linearizar ambos componentes do genoma viral (Figura 5), sendo portanto utilizadas para a clonagem.

Após linearização do inserto e do vetor, procedeu-se à reação de ligação e transformação de *E. coli*. Foram obtidas várias colônias recombinantes, cujos plasmídeos apresentaram o comprimento esperado de aproximadamente 5.500 nt. Estes plasmídeos foram submetidos à digestão com as enzimas *Sac* I ou *Xba* I, liberando um fragmento de 2.600 nt correspondente aos clones do DNA-A e -B do isolado MG-Bi2 (Figura 6).

O DNA-A e DNA-B foram parcialmente seqüenciados. Na seqüência obtida para o DNA-A foi identificada a ORF CP (251 aminoácidos deduzidos). Na seqüência obtida para o DNA-B foram identificadas as ORFs NS (256 aminoácidos deduzidos) e MP (293 aminoácidos deduzidos).

As análises comparativas das seqüências de aminoácidos das proteínas CP, NS e MP são apresentadas nos Quadros 4 e 5. A região amino-terminal da CP (aminoácidos 1 a 109) apresentou identidade superior a 80% com algumas espécies de begomovírus das Américas (p.ex., CdTV) e com todas as espécies que infectam a planta daninha *Sida* sp. Além disso, apresentou 90% de identidade com a CP do *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV). A identidade com a CP de begomovírus que infectam o tomateiro em Minas Gerais (ToCMoV e ToRMV) foi inferior a 80%. A identidade com espécies de outros continentes (AbMV, TLCND e ACMV) foi inferior a 62%. A região carboxi-terminal da CP (aminoácidos 144 a 251) mostrou-se mais conservada, apresentando identidade superior a 90% para todas as espécies do continente americano. As seqüências de aminoácidos das proteínas NS e MP apresentaram similaridade superior a 80% com as espécies de begomovírus que infectam *Sida* sp. De modo geral, a seqüência da proteína NS foi mais variável em comparação com a proteína MP.

Análise filogenética

As seqüências de aminoácidos das proteínas CP, NS e MP de diversas espécies de begomovírus foram utilizadas para construção de árvores filogenéticas. As árvores filogenéticas relativas à CP (Figuras 7 e 8) agruparam em três ramos distintos espécies de begomovírus das Américas, Índia e África. O isolado MG-Bi2 foi agrupado com o SimMV na árvore baseada na região amino-terminal da CP (Figura 7), e em um subgrupo mais abrangente, contendo outros begomovírus do continente americano, na árvore baseada na

região carboxi-terminal da CP (Figura 8). A árvore baseada na região carboxi-terminal foi menos eficiente na separação dos isolados/espécies em comparação com a árvore baseada na região amino-terminal.

Resultado semelhante foi verificado nas árvores referentes ao DNA-B (Figuras 9 e 10). No caso da proteína NS, as espécies brasileiras SimMV e ToRMV foram agrupadas com o isolado MG-Bi2 (Figura 9). Para a proteína MP, um grande ramo agrupou as espécies de begomovírus das Américas. Dentro deste grupo, formou-se um subgrupo com as espécies SimMV e ToRMV (Figura 10).

DISCUSSÃO

A incidência de begomovírus em tomateiros no Brasil vem aumentando gradativamente desde a introdução do biótipo B de *B. tabaci*, no início da década de 1990. Atualmente, as “geminiviroses” constituem um dos maiores problemas fitossanitários da cultura.

Trabalhos anteriores de caracterização identificaram sete novas espécies de begomovírus associadas ao tomateiro no Brasil (Ambrozevicius *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2003). Duas dessas espécies (ToRMV e ToCMoV) tiveram seus genomas totalmente seqüenciados, enquanto as demais encontram-se parcialmente seqüenciadas. Levantamentos de campo identificaram o ToRMV, ToCMoV e TYVSV como os vírus prevalentes na região Sudeste (estados de SP e MG) e no estado de Goiás, principais regiões produtoras de tomate no Brasil (Fernandes, 2001; Ambrozevicius *et al.*, 2002; F.M. Zerbini *et al.*, *dados não publicados*).

O isolado de begomovírus MG-Bi2 foi obtido de plantas infectadas no município de São Joaquim de Bicas, MG, região onde a espécie predominante é o ToCMoV (Ambrozevicius *et al.*, 2002). Os sintomas induzidos em tomateiro pelo isolado são muito mais severos do que aqueles induzidos pelo ToCMoV. A caracterização do isolado MG-Bi2 é o primeiro passo na elucidação dos mecanismos envolvidos na severidade de sintomas de begomovírus em tomateiro, e no esclarecimento dos aspectos envolvidos na prevalência de certas espécies de begomovírus em um determinado hospedeiro e região geográfica, em detrimento de outras.

A determinação da gama de hospedeiros é fundamental para identificação das plantas hospedeiras do vírus, podendo indicar potenciais fontes de inóculo no campo e plantas cultivadas que poderão ser infectadas por este patógeno.

O ensaio de gama de hospedeiros utilizando inoculação via extrato vegetal tamponado (EVT) demonstrou que a inoculação do isolado MG-Bi2 por este método é possível e eficaz, ao contrário do que é observado para outros begomovírus (Figueira & Costa, 1986; Ambrozevicius, 2000; Fernandes, 2001; Mello *et al.*, 2002). O isolado infectou outras quatro espécies de *Nicotiana* e três cultivares de *N. tabacum*. Os hospedeiros *N. benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. rustica* e *N. tabacum* ‘Xhanti’ apresentaram taxa de infecção de 100% por este método. Curiosamente, não foi observada transmissão do isolado MG-Bi2 para tomateiro via EVT. Infecção latente foi observada em *N. sylvestris* e *N. tabacum* ‘Havana’, sendo confirmada via PCR, em geral com índices baixos. É possível que os sintomas não apareçam durante as fases iniciais de desenvolvimento da planta, mas sejam perceptíveis em fases finais do seu desenvolvimento, além do período de avaliação utilizado neste trabalho. Os baixos índices de infecção podem estar relacionados à possibilidade do isolado não ser bem adaptado a estes hospedeiros, por exemplo, quanto à capacidade de infectar células da epiderme e de tecidos parenquimáticos antes de atingirem o floema. Entre as espécies infectadas via EVT, o pimentão (*C. annuum*) e o fumo (*N. tabacum*) merecem destaque pelo fato de serem plantas de importância econômica. Além dessas, a planta daninha *D. stramonium*, comumente associada a plantios de tomateiro, também foi infectada pelo isolado MG-Bi2 e poderia funcionar como reservatório natural desse vírus.

A inoculação de plantas via biobalística levou a um menor número de espécies infectadas comparado à inoculação via EVT. Verifica-se assim que o fato de determinada espécie ser considerada hospedeira ou não do isolado MG-Bi2 é dependente do método de inoculação. É interessante ressaltar que, no caso do tomateiro, foram testadas três variedades e apenas uma foi suscetível ao isolado viral quando inoculada via biobalística, e mesmo assim não apresentou sintomas. A biobalística é normalmente um método mais eficiente de inoculação quando comparado ao EVT, pois deposita o DNA viral diretamente no interior da célula vegetal facilitando a infecção da planta pelo vírus. Desta forma, os resultados obtidos são aparentemente contraditórios uma vez que a inoculação via EVT foi mais eficiente do que a biobalística. Uma hipótese para este fato é que a concentração viral utilizada para o bombardeamento não foi suficiente para infectar a planta. Além disso, é possível que o DNA viral não tenha atingido a região da planta adequada para que ocorresse a infecção sistêmica. A explicação mais provável, entretanto, é que o isolado MG-Bi2 seja um vírus que infecte eficientemente o mesófilo e a epiderme das plantas de *N. benthamiana*, utilizadas como fonte de inóculo para as inoculações via EVT, sendo

assim transmitido com alta eficiência por este método. Estudos de localização do vírus nos tecidos da planta, utilizando imunomarcação ou PCR *in situ*, podem confirmar essa hipótese.

Em conjunto, os resultados indicam que a gama de hospedeiros do isolado MG-Bi2 inclui, além do tomateiro, pelo menos outras duas espécies economicamente importantes, pimentão (*C. annuum*) e fumo (*N. tabacum*). O pimentão foi infectado tanto via biobalística quanto via EVT, sugerindo que realmente trata-se de um hospedeiro natural que possibilitaria a manutenção do vírus nas épocas em que o tomateiro não está presente no campo, servindo como reservatório de inóculo para o próximo plantio.

A gama de hospedeiros do isolado MG-Bi2 é semelhante à do ToCMoV e ToRMV. O ToCMoV, da mesma forma que o isolado MG-Bi2, também foi capaz de infectar espécies importantes como pimentão e fumo, além de *N. benthamiana*, *N. glutinosa* e *D. stramonium*, utilizando-se os mesmos métodos de inoculação utilizados neste trabalho (Ambrozevicius, 2000). Porém, a inoculação via biobalística se mostrou mais eficiente do que a via EVT. O ToRMV, assim como o isolado MG-Bi2 e o ToCMoV, infectou espécies de solanáceas como *N. benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. tabacum*, *N. clevelandii* e *N. rustica*.

A comparação das seqüências parciais da proteína capsidial do isolado MG-Bi2 com outros begomovírus sugere que o isolado pertence à espécie SimMV, pois apresentou identidade de 90% com esta espécie. O sétimo relatório do ICTV (Van Regenmortel *et al.*, 2000) estabelece um valor mínimo de 90% de identidade para a seqüência de aminoácidos da CP, ou 89% de identidade para a seqüência de nucleotídeos completa do DNA-A, para que dois isolados de begomovírus sejam considerados como pertencentes à mesma espécie. Mais recentemente, uma revisão dos critérios taxonômicos da família *Geminiviridae* (Fauquet *et al.*, 2003) manteve esses critérios, porém com duas ressalvas. Em primeiro lugar, embora a seqüência de aminoácidos da CP seja um indicativo razoavelmente preciso do posicionamento taxonômico, a seqüência completa de nucleotídeos do DNA-A é necessária para decisões definitivas. Em segundo lugar, o posicionamento taxonômico deve levar em conta as propriedades biológicas do isolado, principalmente quando o nível de identidade está próximo de 90%.

Segundo Padidam *et al.* (1995) e Brown *et al.* (2001), a seqüência da região 5' do gene *cp*, com aproximadamente 200 nucleotídeos, pode ser utilizada para a identificação preliminar de begomovírus, por ser altamente variável entre as espécies do gênero. Árvores filogenéticas construídas a partir de seqüências da extremidade 5' da proteína capsidial de vários begomovírus foram melhores para revelar diferenças entre isolados estreitamente

relacionados quando comparadas a árvores feitas a partir do DNA-A completo, da sequência completa do gene *cp* ou apenas da região central do gene *cp* (Brown *et al.*, 2001).

No presente trabalho, a região amino-terminal da CP, provavelmente por ser mais variável, foi mais útil para a análise filogenética em comparação à região carboxi-terminal, embora ambas as árvores tenham apresentado valores de “bootstrap” baixos. Da mesma forma, a proteína NS foi mais útil do que a proteína MP para a análise, pois a proteína MP é extremamente conservada entre os begomovírus, particularmente as espécies do continente americano. Mesmo levando-se em conta essas limitações, as árvores baseadas na região amino-terminal da CP e na proteína NS agruparam o isolado MG-Bi2 e o SimMV em um mesmo ramo, indicando uma origem comum para esses isolados e reforçando o resultado das comparações de sequências. A confirmação definitiva do posicionamento taxonômico do isolado MG-Bi2 depende da determinação da sequência completa de nucleotídeos do DNA-A.

A confirmação de que o isolado MG-Bi2 é um membro da espécie SimMV, relatada pela primeira vez infectando *Sida micrantha* no Brasil na década de 70 (Jovel *et al.*, 2004), consistiria no primeiro relato de uma espécie de begomovírus isolada de uma planta daninha infectando naturalmente o tomateiro no Brasil. Caso confirmado, esse resultado reforçará a hipótese de que plantas daninhas e silvestres servem como reservatório natural para os geminivírus. O fato de o isolado MG-Bi2 ser de ocorrência infrequente no campo, especialmente em comparação ao ToRMV, ToCMoV e TYVSV, provavelmente reflete sua menor adaptação ao tomateiro. Essa observação reforça a hipótese de que a “mosca-branca”, agindo como vetora, permitiria que vírus que infectam plantas silvestres e daninhas invadam o tomateiro e, por meio de recombinação e/ou reagrupamento de componentes do genoma, se adaptem ao novo hospedeiro, culminando com o surgimento de novas espécies de geminivírus. Estudos futuros envolvendo a análise de regiões do genoma responsáveis pela severidade dos sintomas, assim como estudos epidemiológicos que identifiquem os fatores responsáveis pela prevalência de certas espécies de begomovírus no campo, devem confirmar essas hipóteses.

LITERATURA CITADA

- Ambrozevicius, L.P. Caracterização parcial de uma nova espécie de *Begomovirus* e diversidade genética de geminivírus associados ao tomateiro no Sudeste do Brasil. (Tese M.S.) Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 81p., 2000.
- Ambrozevicius, L.P., Andrade, E.C., Zambolim, E.M., Fontes, E.P.B. & Zerbini, F.M. Incidence and host range of TGV-Ig, a bipartite *Begomovirus* from the "Zona Metalúrgica" of Minas Gerais, Brazil. *Virus Reviews and Research*, v. 4, p. 155, 1999.
- Ambrozevicius, L.P., Calegario, R.F., Fontes, E.P.B., Carvalho, M.G. & Zerbini, F.M. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 27, p. 372-377, 2002.
- Andrade, E.C., Ambrozevicius, L.P., Calegario, R.F., Fontes, E.P.B. & Zerbini, F.M. Molecular cloning and characterization of *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), a new tomato-infecting begomovirus. *Virus Reviews and Research*, v. 7, p. 153, 2002.
- Aragão, F.J.L., Barros, L.M.G., Brasileiro, A.C.M., Ribeiro, S.G., Smith, F.D., Sanford, J.C., Faria, J.C. & Rech, E.L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 93, p. 142-150, 1996.
- Brown, J.K. & Bird, J. Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean basin. *Plant Disease*, v. 76, p. 220-225, 1992.
- Brown, J.K., Idris, A.M., Torres-Jerez, I., Banks, G.K. & Wyatt, S.D. The core region of the coat protein gene is highly useful for establishing the provisional identification and classification of begomoviruses. *Archives of Virology*, v. 146, p. 1581-1598, 2001.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. & Hicks, J.B. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 1, p. 19-21, 1983.
- Fauquet, C.M., Bisaro, D.M., Briddon, R.W., Brown, J.K., Harrison, B.D., Rybicki, E.P., Stenger, D.C. & Stanley, J. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family *Geminiviridae*, and an updated list of begomovirus species. *Archives of Virology*, v. 148, p. 405-421, 2003.
- Fernandes, 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, 192 p., 2001.
- Fernandes, J.J., Fontes, E.P.B., Brommonschenkel, S.H., Carvalho, M.G. & Zerbini, F.M. Molecular cloning and sequencing of *Tomato rugose mosaic virus*, a geminivirus isolated from tomatoes at "Triângulo Mineiro", Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 25, p. 440, 2000.

- Figueira, A.R. & Costa, A.S. Tentativas de transmissão mecânica do vírus do mosaico dourado do feijoeiro do Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 11, p. 433-442, 1986.
- Gilbertson, R.L., Faria, J.C., Hanson, S.F., Morales, F.J., Ahlquist, P.G., Maxwell, D.P. & Russell, D.R. Cloning of the complete DNA genomes of four bean-infecting geminiviruses and determining their infectivity by electric discharge particle acceleration. *Phytopathology*, v. 81, p. 980-985, 1991.
- Jovel, J., Reski, G., Rothenstein, D., Ringel, M., Frischmuth, T. & Jeske, H. *Sida micrantha* mosaic is associated with a complex infection of begomoviruses different from *Abutilon mosaic virus*. *Archives of Virology*, v. 149, p. 829-841, 2004.
- Lazarowitz, S.G. Geminiviruses: genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 11, p. 327-349, 1992.
- Mello, R.N., Cotrim, M.A.A., Lopes, E.F., Moreira, A.G., Contin, F.S., Fontes, E.P.B., Almeida, A.M.R. & Zerbini, F.M. Survey of begomoviruses associated with soybean and identification of *Sida mottle virus* (SiMoV) infecting this crop in Brazil. *Virus Reviews and Research*, v. 7(Supplement), p. 157, 2002.
- Morales, F.J. & Anderson, P.K. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology*, v. 146, p. 415-441, 2001.
- Padidam, M., Beachy, R.N. & Fauquet, C.M. Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. *Journal of General Virology*, v. 76, p. 249-263, 1995.
- Polston, J.E. & Anderson, P.K. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Disease*, v. 81, p. 1358-1369, 1997.
- Rezende, E.A., Filgueira, F.A.R., Zerbini, F.M., Maciel-Zambolim, E., Fernandes, J.J. & Gilbertson, R.L. Tomato infected with geminivirus in greenhouse conditions at Uberlândia-MG, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 21, p. 424, 1996.
- Ribeiro, S.G., Ambrozevicius, L.P., Ávila, A.C., Bezerra, I.C., Calegario, R.F., Fernandes, J.J., Lima, M.F., Mello, R.N., Rocha, H. & Zerbini, F.M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology*, v. 148, p. 281-295, 2003.
- Rojas, M.R., Gilbertson, R.L., Russell, D.R. & Maxwell, D.P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease*, v. 77, p. 340-347, 1993.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R. & Wickner, R.B., Eds. *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Academic Press, 1162 p., 2000.

Zerbini, F.M., Zambolim, E.M., Carrijo, I.V. & 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. & Carrijo, I.V. Um novo geminivírus isolado de tomateiro (*L. esculentum*) em Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira*, v. 21, p. 430, 1996b.

Quadro 1. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos componentes genômicos do isolado MG-Bi2.

DNA-A	P1R	5'-CACGGTATTACTCACC-3
DNA-B	P1R	5'-CAATCATTTTCGCTCGCTGG-3'
	P2F	5'-CGTCTCCGTTTAACCGGC-3'
	P3R	5'-CAATGTGAGACGACGTCC-3'
	P4F	5'-CAGGTTCCGTTATCGTGG-3'
	P5R	5'-GTTTATTCCCAACCCTC-3'
	P6F	5'-CGATTACCAATTGTCGG-3'

Quadro 2. Sequências de begomovírus utilizadas para a análise filogenética.

Espécie	Nº de acesso no GenBank
<i>Abutilon mosaic virus</i> (AbMV)	NC_001928 (DNA-A) e NC_001929 (DNA-B)
<i>African cassava mosaic virus</i> (ACMV)	NC_001467 (DNA-A) e NC_001468 (DNA-B)
<i>Bean dwarf mosaic virus</i> (BDMV)	NC_001931 (DNA-A) e NC_001930 (DNA-B)
<i>Bean golden mosaic virus</i> (BGMV)	NC_004042 (DNA-A) e NC_004043 (DNA-B)
<i>Bean golden yellow mosaic virus</i> (BGYMV)	NC_001439 (DNA-A) e NC_001438 (DNA-B)
<i>Chino del tomate virus</i> (CdTV)	NC_003830 (DNA-A) e NC_003831 (DNA-B)
<i>Dicliptera yellow mottle virus</i> (DYMV)	NC_003856 (DNA-A) e NC_003857 (DNA-B)
<i>Macropodium mosaic Puerto Rico virus</i> (MMPRV)	NC_004097 (DNA-A) e NC_004098 (DNA-B)
<i>Pepper golden mosaic virus</i> (PGMV)	NC_004101 (DNA-A) e NC_004096 (DNA-B)
<i>Pepper huasteco yellow vein virus</i> (PHYVV)	NC_001359 (DNA-A) e NC_001369 (DNA-B)
<i>Potato yellow mosaic virus</i> (PYMV)	NC_001934 (DNA-A) e NC_001935 (DNA-B)
<i>Potato yellow mosaic Trinidad virus</i> (PYMTV)	NC_004638 (DNA-A) e NC_004644 (DNA-B)
<i>Sida golden mosaic virus</i> (SGMV)	NC_002046 (DNA-A) e NC_002047 (DNA-B)
<i>Sida golden mosaic Costa Rica virus</i> (SGMCRV)	NC_004657 (DNA-A) e NC_004658 (DNA-B)
<i>Sida golden mosaic Honduras virus</i> (SGMHoV)	NC_004659 (DNA-A) e NC_004660 (DNA-B)
<i>Squash leaf curl virus</i> (SqLCV)	NC_001936 (DNA-A) e NC_001937 (DNA-B)
<i>Sida micrantha mosaic virus</i> (SimMV)	NC_005330 (DNA-A) e NC_005331 (DNA-B)
<i>Sida yellow vein virus</i> (SYVV)	NC_004661 (DNA-A) e NC_004662 (DNA-B)
<i>Tomato golden mosaic virus</i> (TGMV)	NC_001507 (DNA-A) e NC_001508 (DNA-B)
<i>Tomato leaf curl New Delhi virus</i> (TLCNDV)	NC_004611 (DNA-A) e NC_004612 (DNA-B)
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i> (ToCMoV)	NC_003664 (DNA-A) e NC_003665 (DNA-B)
<i>Tomato mottle virus</i> (ToMoV)	NC_001938 (DNA-A) e NC_001939 (DNA-B)
<i>Tomato rugose mosaic virus</i> (ToRMV)	NC_002555 (DNA-A) e NC_002556 (DNA-B)
<i>Watermelon chlorotic stunt virus</i> (WCSV)	NC_003708 (DNA-A) e NC_003709 (DNA-B)

Quadro 3. Espécies de plantas infectadas pelo isolado MG-Bi2, de acordo com o método de inoculação empregado.

Espécie/Cultivar	Método de Inoculação			
	Extrato vegetal tamponado		Biobalística	
	Plantas infectadas/inoculadas	Sintomas	Plantas infectadas/inoculadas	Sintomas
<i>Capsicum annuum</i>	1/5	ma, df ¹	3/5	ma, df, rc
<i>Chenopodium quinoa</i>	0/5	-	0/5	-
<i>Cucurbita pepo</i> ‘Caserta’	0/3	-	n.i.	n.i.
<i>Datura stramonium</i>	3/5	ma, df, rc	0/5	-
<i>Gomphrena globosa</i>	0/5	-	1/3	-
<i>Lycopersicon. esculentum</i> ‘Miller Early Pack’	0/5	-	1/5	-
<i>L. esculentum</i> ‘Rutgers’	0/5	-	0/5	-
<i>L. esculentum</i> ‘Santa Clara’	0/5	-	0/5	-
<i>Nicotiana benthamiana</i>	5/5	ma, df, rc	1/5	ma, df
<i>N. clevelandii</i>	3/5	ma, df, rc	0/5	-
<i>N. glutinosa</i>	5/5	ma, df, rc	0/5	-
<i>N. rustica</i>	5/5	ma, df, rc	0/5	-
<i>N. sylvestris</i>	1/5	-	0/5	-
<i>N. tabacum</i> ‘Havana’	2/5	-	0/5	-
<i>N. tabacum</i> ‘Samsun’	2/5	ma, df	0/5	-
<i>N. tabacum</i> ‘TNN’	1/5	ma, df, b	0/5	-
<i>N. tabacum</i> ‘Xanthi’	5/5	ma	0/5	-
<i>Phaseolus vulgaris</i> ‘Ouro Negro’	0/5	-	0/5	-
<i>P. vulgaris</i> ‘Pérola’	0/5	-	0/5	-
<i>Solanum melongela</i>	0/5	-	0/5	-

1. Os sintomas em folhas não inoculadas estão representados por: **b**, bolhosidade; **df**, distorção foliar; **ma**, mosaico amarelo; **rc**, redução de crescimento; -, assintomática no período e condições avaliados; **n.i.**, não inoculada. A infecção foi avaliada visualmente aos 30 dias após a inoculação, e confirmada por PCR utilizando oligonucleotídeos universais para begomovírus.

Quadro 4. Porcentagem de identidade entre as seqüências de aminoácidos das proteínas MP (valores acima da diagonal) e NS (valores abaixo da diagonal) do isolado MG-Bi2 com outros begomovírus.

	MG-Bi2	AbMV	ACMV	BDMV	BGMV	BGYMV	CdTV	DYMV	MMPRV	PGMV	PHYVV	PYMV	PYMTV	SGMV	SGMCRV	SGMHoV	SqLCV	SimMV	SYVV	TGMV	TLCNDV	ToCMV	ToMoV	ToRMV	WCSV
MG-Bi2	--	77	58	82	80	79	82	78	80	71	76	82	83	81	80	82	76	82	82	87	34	79	82	80	38
AbMV	77	--	59	90	80	85	89	85	86	89	84	90	91	92	91	92	82	84	92	94	33	82	91	80	36
ACMV	5	8	--	58	51	55	55	56	55	37	56	56	58	58	59	58	56	54	58	56	35	43	56	54	60
BDMV	84	83	5	--	82	82	93	87	89	90	87	91	91	94	93	95	81	86	95	94	6	82	96	86	37
BGMV	82	76	8	74	--	81	82	81	82	83	77	78	80	81	80	80	78	81	79	88	7	78	82	80	55
BGYMV	79	73	6	71	70	--	82	86	88	88	83	83	84	86	84	85	81	86	85	94	45	80	85	83	40
CdTV	81	79	6	80	76	69	--	84	86	88	84	89	90	92	93	95	83	83	95	91	43	83	94	83	35
DYMV	81	72	40	73	69	74	73	--	86	88	83	83	84	87	84	84	83	81	84	90	6	80	87	82	38
MMPRV	82	75	32	74	72	73	75	76	--	88	82	86	85	88	85	88	79	87	88	93	6	80	89	84	37
PGMV	80	72	29	70	70	72	71	75	72	--	85	90	90	90	88	91	86	88	90	89	6	74	90	86	59
PHYVV	71	69	9	73	80	73	74	74	78	74	--	83	84	85	84	86	78	80	86	91	8	78	85	78	58
PYMV	73	75	9	78	75	71	75	75	76	73	71	--	96	92	89	92	80	83	91	93	33	80	91	82	37
PYMTV	73	76	9	80	75	72	76	75	75	74	68	89	--	93	90	93	82	85	92	93	33	82	92	83	37
SGMV	82	79	8	84	8	77	85	78	79	80	71	77	77	--	92	95	81	85	95	93	8	83	94	83	37
SGMCRV	82	80	18	86	49	79	83	80	81	80	76	74	75	85	--	95	79	83	95	91	34	82	92	82	35
SGMHoV	84	82	8	91	82	76	89	76	84	81	74	77	78	88	92	--	82	86	98	94	35	83	95	84	36
SqLCV	69	64	10	60	68	69	68	69	68	59	63	64	55	60	64	62	--	80	82	90	7	80	82	79	60
SimMV	83	72	34	73	80	74	81	78	75	70	6	68	70	71	75	76	60	--	86	93	8	79	86	89	38
SYVV	82	82	33	82	78	79	89	80	84	71	68	69	71	81	87	91	63	75	--	94	35	83	95	84	36
TGMV	80	71	28	67	72	76	76	79	76	75	72	69	68	75	69	70	60	69	69	--	8	91	93	91	58
TLCNDV	4	8	27	29	11	5	12	6	7	11	10	11	11	16	29	31	29	29	30	14	--	10	8	34	38
ToCMV	76	69	26	70	78	76	78	77	78	75	71	74	74	69	70	74	61	70	73	73	6	--	84	79	60
ToMoV	68	85	32	80	61	75	78	78	78	69	73	85	80	79	76	77	58	70	78	63	9	76	--	85	36
ToRMV	79	70	9	75	80	73	75	74	76	75	70	73	72	68	73	72	58	75	73	75	5	72	78	--	37
WCSV	7	32	8	12	12	7	8	7	9	28	7	8	12	29	28	32	31	28	29	14	11	7	9	28	--

Quadro 5. Porcentagem de identidade entre as seqüências de aminoácidos da proteína capsidial (CP) do isolado MG-Bi2 com outros begomovírus. MG-Bi2-AT refere-se à seqüência da região amino-terminal da proteína (aminoácidos 1 a 109) e MG-Bi2-CT refere-se à seqüência carboxi-terminal (aminoácidos 144 a 251).

	MG-Bi2 AT	MG-Bi2 CT	AbMV	ACMV	BDMV	BGMV	BGYMV	CdTV	DYMV	MMPRV	PGMV	PHYVV	PYMV	PYMTV	SGMV	SGMCRV	SGMHoV	SqLCV	SimMV	SYVV	TGMV	TLCNDV	ToCMV	ToMoV	ToRMV	WCSV
AbMV	83	94	--																							
ACMV	54	83	77	--																						
BDMV	86	95	93	39	--																					
BGMV	85	98	91	39	92	--																				
BGYMV	81	95	89	76	87	87	--																			
CdTV	85	97	94	39	96	95	88	--																		
DYMV	82	97	93	79	89	89	90	94	--																	
MMPRV	79	94	89	77	91	89	89	92	91	--																
PGMV	77	95	86	38	87	88	88	88	86	89	--															
PHYVV	74	94	91	36	86	86	88	87	88	92	88	--														
PYMV	84	93	92	37	93	90	88	96	87	90	88	88	--													
PYMTV	82	94	92	38	93	90	87	96	87	89	88	88	98	--												
SGMV	84	96	95	76	94	93	89	96	96	92	88	88	94	93	--											
SGMCRV	84	98	92	40	92	95	89	93	96	91	89	88	91	91	94	--										
SGMHoV	85	93	93	76	93	92	87	95	93	90	86	86	93	92	95	92	--									
SqLCV	83	96	88	39	90	91	91	92	90	90	90	88	91	91	91	92	91	--								
SimMV	90	99	95	79	92	95	90	94	96	91	88	87	91	90	93	95	93	93	--							
SYVV	84	95	94	75	93	93	88	96	94	90	87	86	93	92	96	93	97	90	93	--						
TGMV	80	95	89	77	89	92	93	90	90	89	93	88	90	89	89	92	85	95	92	88	--					
TLCNDV	62	81	79	37	78	81	80	79	81	79	81	74	73	73	80	80	78	80	80	78	81	--				
ToCMV	78	100	89	40	89	91	88	92	90	92	87	88	90	90	91	92	89	89	91	89	93	81	--			
ToMoV	82	94	93	37	92	91	85	95	91	89	86	84	94	94	93	91	92	89	91	93	89	79	89	--		
ToRMV	77	100	90	80	88	90	87	92	89	92	87	88	90	89	91	91	88	88	90	89	93	81	99	89	--	
WCSV	57	79	6	79	20	12	72	6	73	75	72	32	20	11	7	75	20	70	75	7	72	32	77	20	77	--

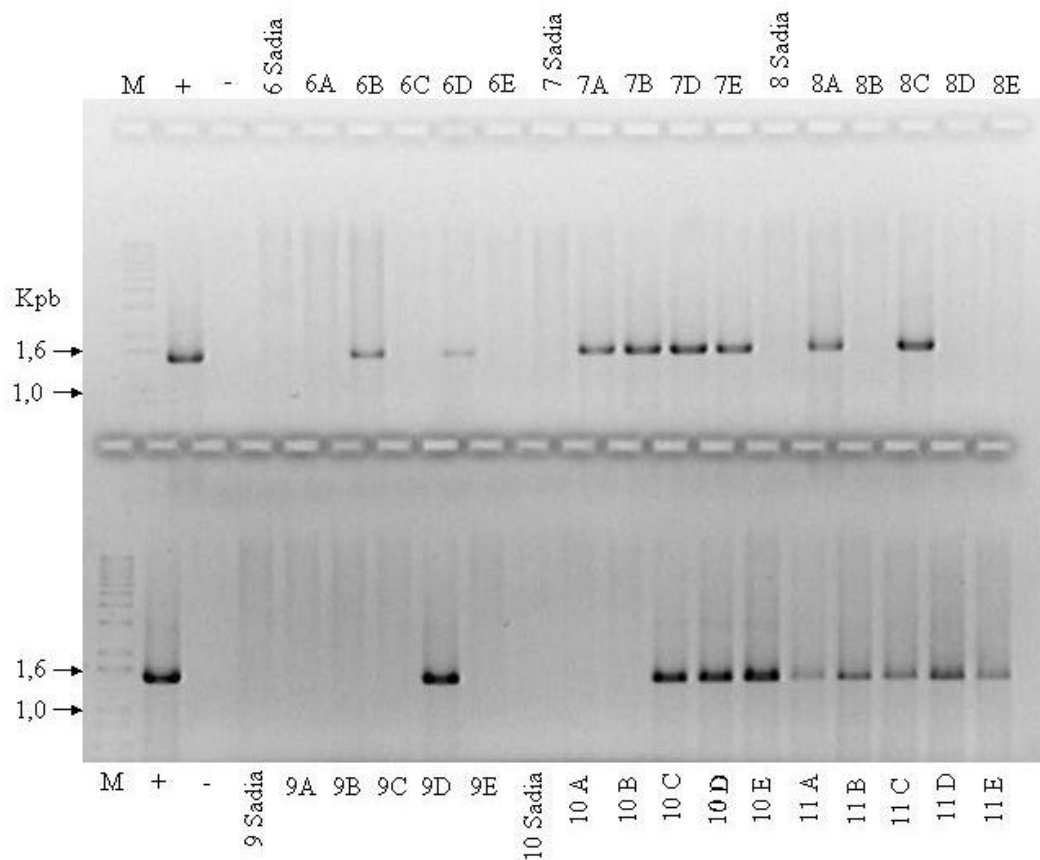


Figura 1. Padrão eletroforético em gel de agarose (0,9%) de fragmentos do DNA-A do isolado MG-Bi2, amplificados por PCR a partir de DNA extraído de plantas inoculadas no teste de gama de hospedeiros. **M**, Marcador de comprimento (“1 kb plus DNA ladder”); **+**, Controle positivo (*N. benthamiana* infectada com o isolado MG-Bi2); **-**, Controle negativo (tomateiro sadio); **6**, *N. tabacum* ‘Havana 425’; **7**, *N. tabacum* ‘Xanthi’; **8**, *N. tabacum* ‘Samsun’; **9**, *N. tabacum* ‘TNN’; **10**, *N. clevelandii*; **11**, *N. rustica*.



Figura 2. Sintomas observados em plantas de algumas espécies inoculadas no teste de gama de hospedeiros, aos 30 dias após a inoculação. **A e B**, *N. tabacum* 'Samsun'; **C e D**, *N. clevelandii*; **E e F**, *C. anuum*; **G e H**, *N. glutinosa*; **I, J e K**, *N. benthamiana*. Em **D, E, G e I** a planta infectada está à direita, e a planta sadia à esquerda.



Figura 2 (cont.)

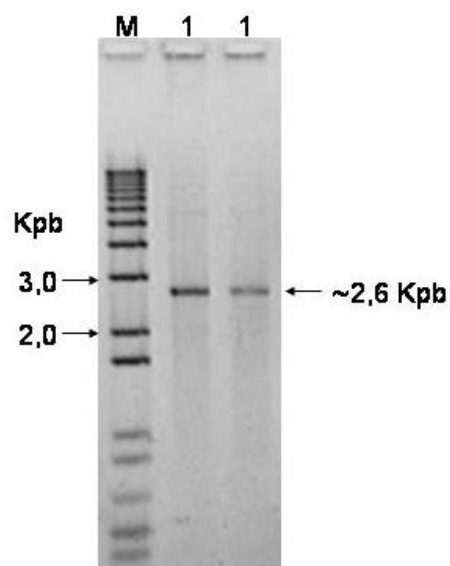


Figura 3. Padrão eletroforético em gel de agarose (0,9%) do produto da amplificação do genoma completo do isolado MG-Bi2, utilizando a DNA polimerase do bacteriófago Φ 29. **M**, Marcador de comprimento ("1 kb plus DNA ladder"); **1**, Amplificação do genoma viral a partir de plantas infectadas, observando-se o fragmento esperado com aproximadamente 2.600 nucleotídeos.

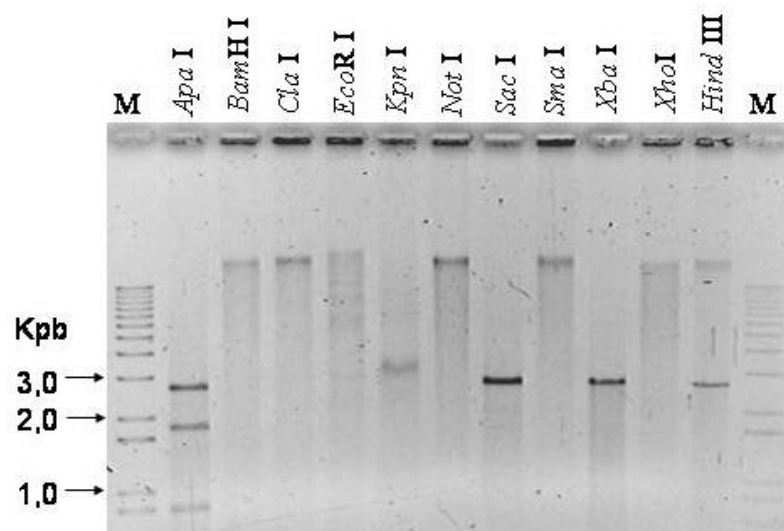


Figura 4. Padrão eletroforético em gel de agarose (0,9%) da clivagem dos componentes genômicos do isolado MG-Bi2 mediada por enzimas de restrição. As bandas superiores a 2.600 nucleotídeos (nt) correspondem a componentes não clivados, cuja migração é mais lenta devido à forma circular do DNA. As bandas com comprimento aproximado de 2.600 nt correspondem a componentes clivados em apenas um ponto (linearizados). As bandas com comprimento inferior a 2.600 nt correspondem aos fragmentos de componentes clivados em mais de um ponto. **M**, Marcador de comprimento ("1 kb plus DNA ladder"); **Apa I**, Um componente linearizado e o outro clivado em dois sítios; **BamH I**, **Cla I**, **Not I**, **Sma I** e **Xho I**, Nenhum dos dois componentes clivados; **Sac I** e **Xba I**, Ambos os componentes linearizados; **Hind III**, Um dos componentes linearizados e o outro não clivado.

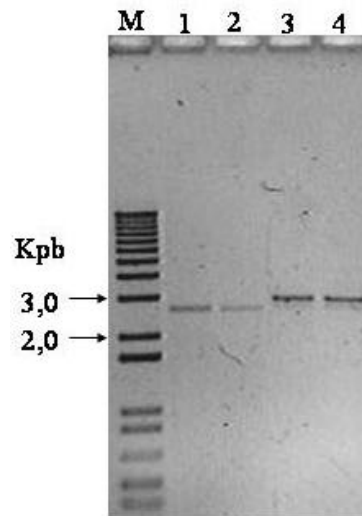


Figura 5. Padrão eletroforético em gel de agarose (0,9%) da linearização de ambos os componentes do isolado MG-Bi2 e do vetor pKS+, por meio da clivagem com enzimas de restrição em um único sítio. **M**, Marcador de comprimento (“1 kb plus DNA ladder”); **1**, DNA-A e -B do isolado MG-Bi2 clivados com *Sac* I; **2**, DNA-A e -B do isolado MG-Bi2 clivados com *Xba* I; **3**, Plasmídeo vetor pKS+ clivado com *Sac* I; **4**, pKS+ clivado com *Xba* I.

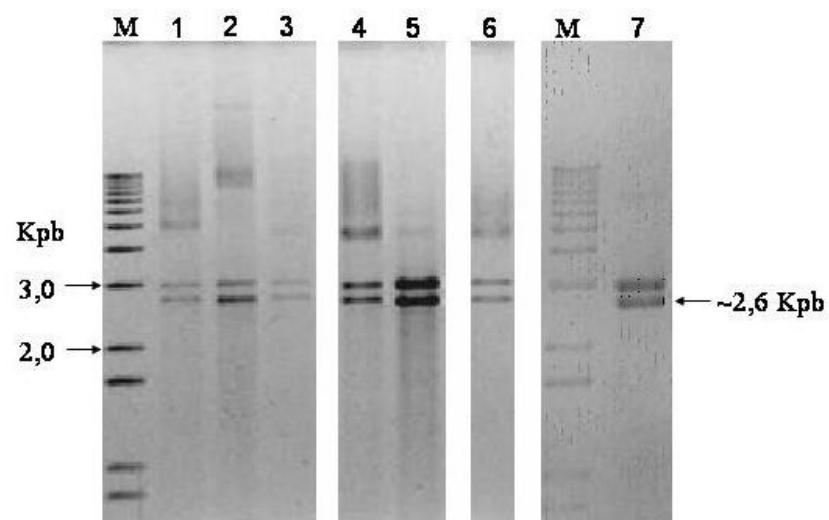


Figura 6. Padrão eletroforético em gel de agarose (0,9%) dos plasmídeos recombinantes purificados e clivados com *Sac* I ou *Xba* I. **M**, Marcador de comprimento (“1 kb DNA ladder”); **1-5 e 7**, Plasmídeos recombinantes clivados com *Sac* I; **6**, Plasmídeo recombinante clivado com *Xba* I.

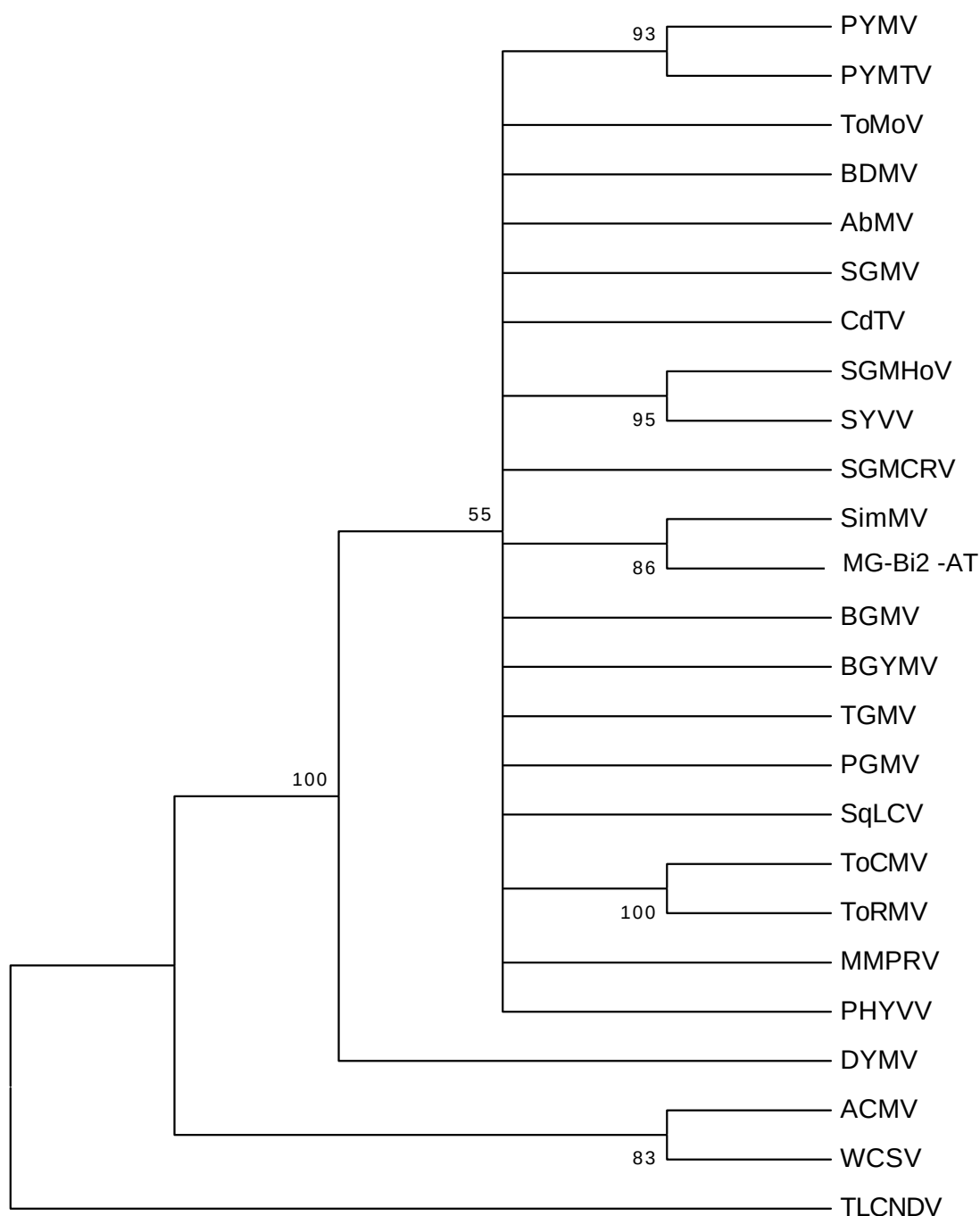


Figura 7. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento da seqüência de aminoácidos da região amino-terminal (aminoácidos 1 a 109) da proteína capsidial do DNA-A de espécies de begomovírus, incluindo o isolado MG-Bi2. A árvore foi construída com o programa Mega 2, utilizando o método de “neighbour-joining” a análise de “bootstrap” com 2000 repetições. Apenas os ramos com valor de “bootstrap” superior a 50% foram considerados.

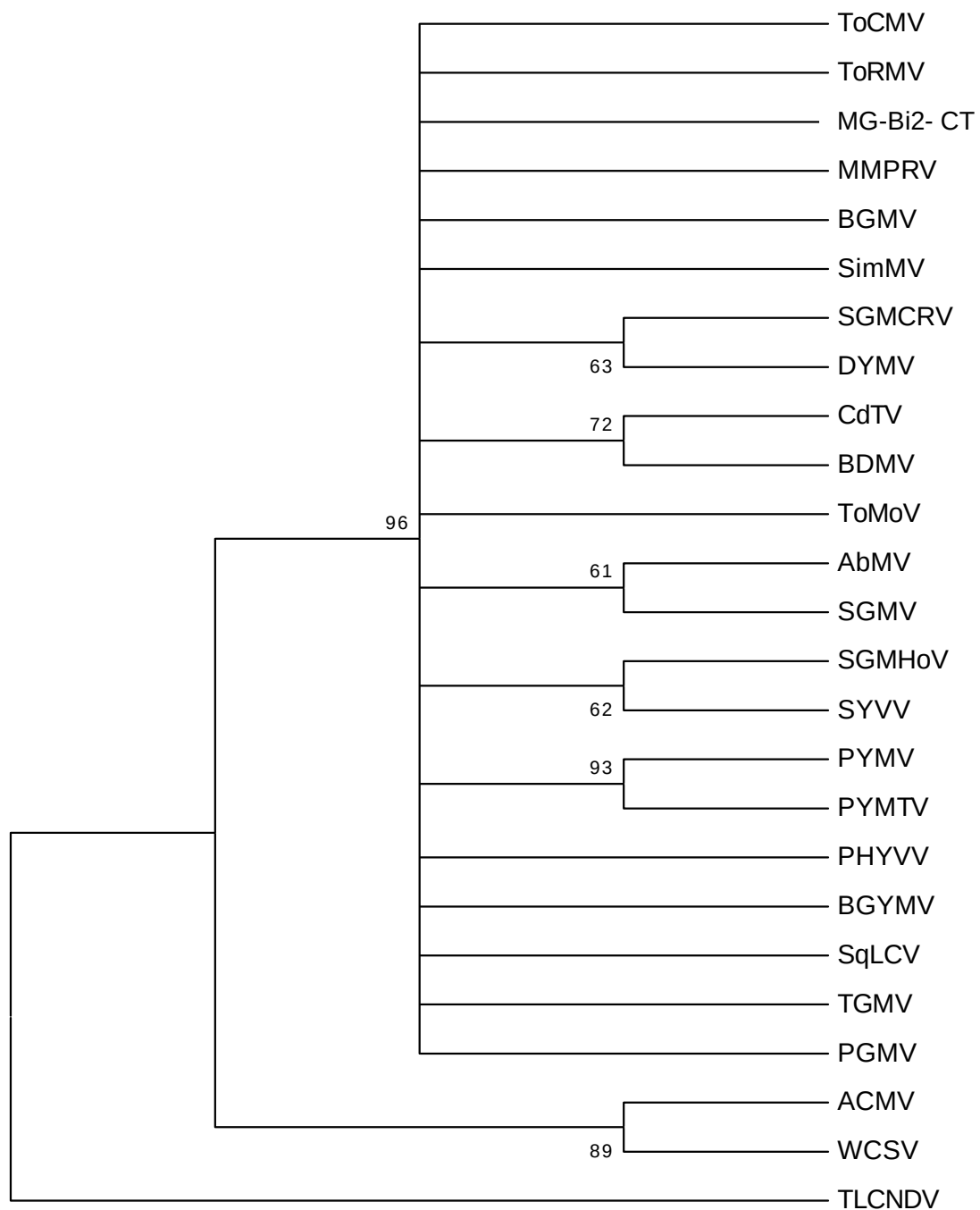


Figura 8. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento da sequência de aminoácidos da região carboxi-terminal (aminoácidos 144 a 251) da proteína capsidial do DNA-A de espécies de begomovírus, incluindo o isolado MG-Bi2. A árvore foi construída com o programa Mega 2, utilizando o método de “neighbour-joining” a análise de “bootstrap” com 2000 repetições. Apenas os ramos com valor de “bootstrap” superior a 50% foram considerados.

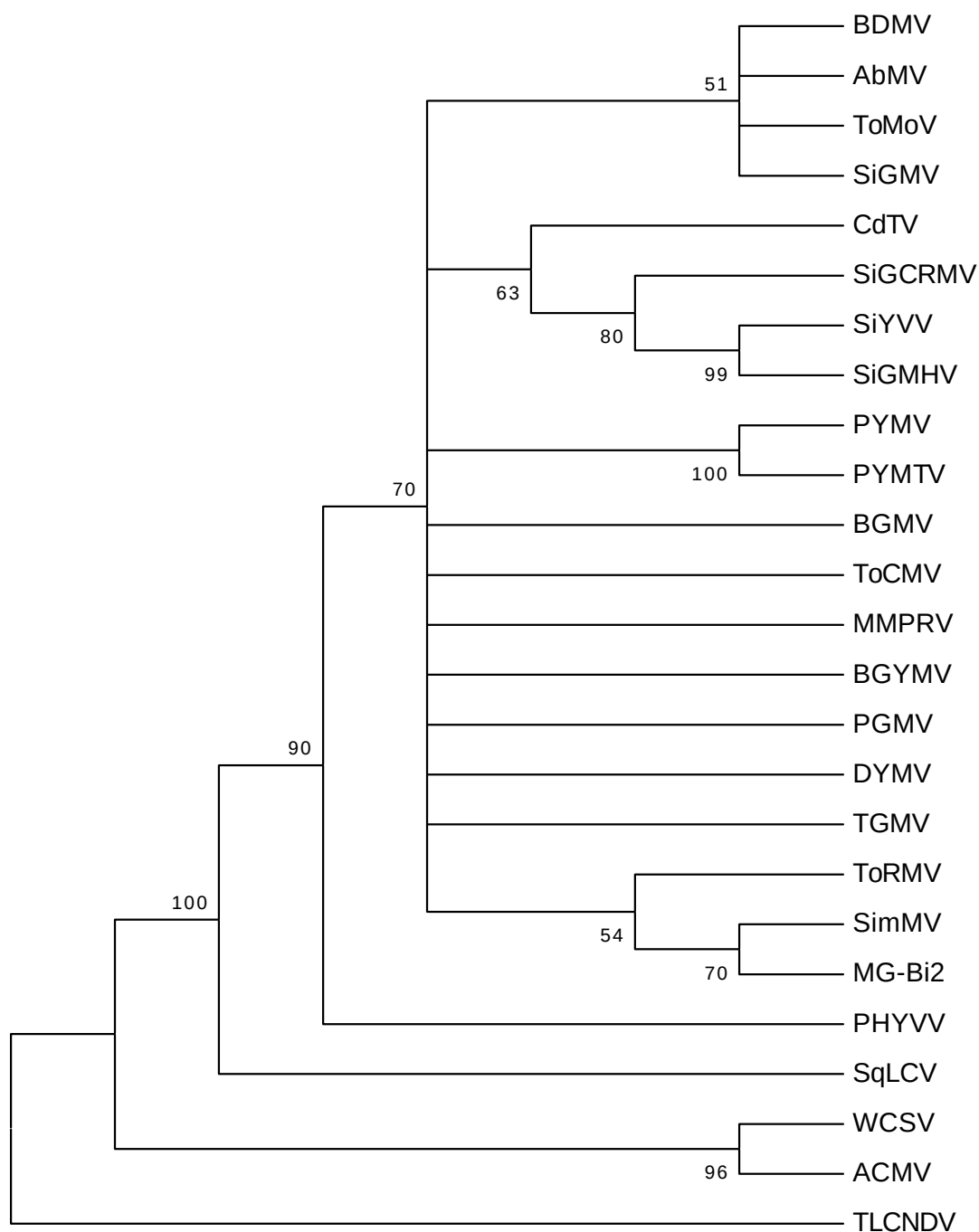


Figura 9. Árvore filogenética obtida apartir do alinhamento da seqüência de aminoácidos da proteína NS do DNA-B de espécies de begomovírus, incluindo o isolado MG-Bi2. A árvore foi construída com o programa Mega 2, utilizando o método de “neighbour-joining” a análise de “bootstrap” com 2000 repetições. Apenas os ramos com valor de “bootstrap” superior a 50% foram considerados.

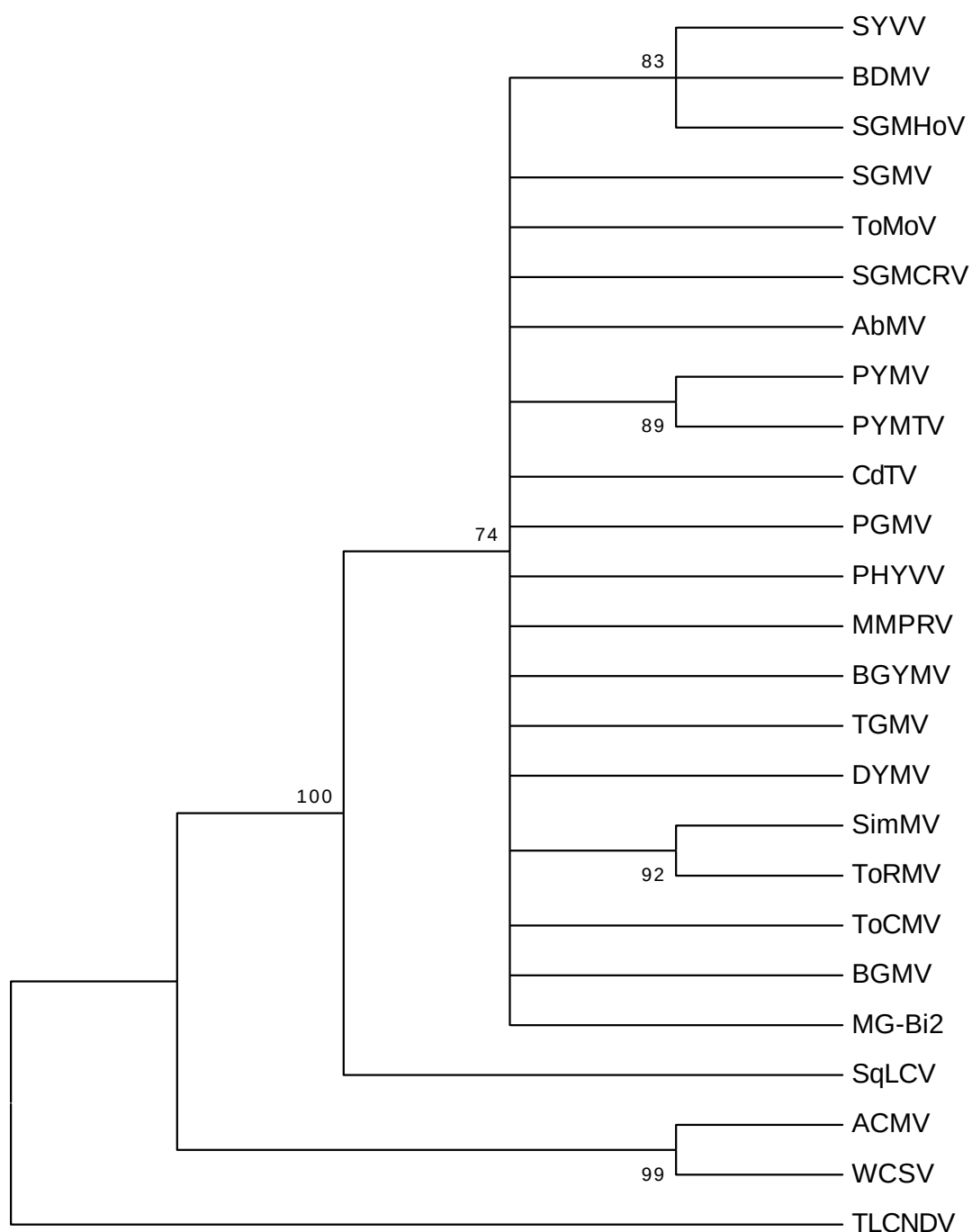


Figura 10. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína MP do DNA-B de espécies de begomovírus, incluindo o isolado MG-Bi2. A árvore foi construída com o programa Mega 2, utilizando o método de “neighbour-joining” a análise de “bootstrap” com 2000 repetições. Apenas os ramos com valor de “bootstrap” superior a 50% foram considerados.