

EDUARDO CHUMBINHO DE ANDRADE

CLONAGEM MOLECULAR DO *Tomato chlorotic mottle virus* (TCMV) E ESTUDOS DE PSEUDO-RECOMBINAÇÃO ENTRE BEGOMOVÍRUS DE TOMATEIROS E *Sida* sp.

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  
2002

EDUARDO CHUMBINHO DE ANDRADE

CLONAGEM MOLECULAR DO *Tomato chlorotic mottle virus* (TCMV) E ESTUDOS DE PSEUDO-RECOMBINAÇÃO ENTRE BEGOMOVÍRUS DE TOMATEIROS E *Sida* sp.

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”.

Aprovada: 3 de abril de 2002.

---

Prof. Derly José Henriques da Silva

---

Profa. Elizabeth Pacheco Batista Fontes  
(Conselheira)

---

Prof. Kiyoshi Matsuoka

---

Prof. Leandro Grassi de Freitas

---

Prof. Murilo Geraldo de Carvalho  
(Presidente da Banca)

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Murilo Zerbini, pela orientação e pela paciência durante seus imprescindíveis ensinamentos durante todo o curso de Mestrado.

Ao Departamento de Fitopatologia e à Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade da realização do programa de Mestrado.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa.

Aos professores Elizabeth Pacheco Batista Fontes, pelas sugestões apresentadas e Murilo Geraldo de Carvalho por me adotar temporariamente no momento primordial do curso.

A todos os professores e funcionários do DFP, que colaboraram com meus estudos e trabalho.

Aos amigos do laboratório, Raquel, Adriana Truta, Eliane, Danielle, Poliane, Marco, Fabrício, Ana Verônica, Ana Raquel e Adriana Moreira, pelas horas agradáveis que passamos juntos, ao Edimar, meu grande ajudante, ao meu amigo Leonardo “Shock”, e minha amiga Renata, por estar sempre testando meus conhecimentos.

Ao meu amigo e companheiro Marcos Orange pela sua amizade e companherismo.

Aos meus pais Tarcízio e Maria, e aos meus irmãos Marcelo, Rodrigo e Renato, por estarem sempre me incentivando, apoiando e acreditando no meu trabalho e nas minhas convicções.

A minha mulher Lidya por me apoiar e carinho nos momentos mais difíceis, e aos meus filhos Vitor, Guilherme e Pedro por me trazerem tanta felicidade e serem o motivo maior desta minha luta.

A minha sogra Ranete pelos valiosos dias e noites que cuidou de meus filhos para que pudesse estudar e trabalhar.

## **BIOGRAFIA**

EDUARDO CHUMBINHO DE ANDRADE, filho de Tarcízio de Andrade Araújo e Maria das Graças Chumbinho de Andrade, nasceu em 14 de dezembro de 1975, em Londrina, Estado do Paraná.

Cursou o segundo grau no Colégio Delta em Londrina.

Ingressou na Universidade Federal de Viçosa em 1994, graduando-se em agosto de 1999.

Em março de 2000, iniciou o Programa de Mestrado em Fitopatologia, na mesma universidade, com Virologia como área de concentração. Em abril de 2002 submeteu-se à defesa de tese de Mestrado.

## CONTEÚDO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUÇÃO .....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	05
2.1. Taxonomia, origem e evolução dos geminivirus .....	05
2.2. Características moleculares .....	07
2.3. Replicação do genoma viral .....	10
2.4. Movimento do vírus na planta.....	12
2.5. Interações geminivírus/hospedeiro .....	13
2.6. Transmissão natural.....	14
2.7. Geminivírus em tomateiro e variabilidade genética .....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	18
3.1. Obtenção e manutenção do isolado viral .....	18
3.2. Caracterização molecular do TMCV.....	18
3.2.1. Amplificação por PCR dos componentes genômicos completos utilizando oligonucleotídeos sobrepostos .....	19
3.2.2. Transformação de <i>Escherichia coli</i> .....	19
3.2.3. Sequenciamento.....	20
3.3. Análises filogenéticas.....	20
3.4. Estudos de pseudo-recombinação .....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	23

4.1. Caracterização molecular do TCMV, uma nova espécie do gênero <i>Begomovirus</i>	23
4.1.1. Clonagem molecular dos componentes genômicos.....	23
4.1.2. Sequenciamento do TCMV e análise comparativa de seqüências .....	26
4.1.3. Análise filogenética .....	33
4.2. Estudos de pseudo-recombinação .....	36
5. RESUMO E CONCLUSÕES .....	47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49

## RESUMO

ANDRADE, Eduardo Chumbinho, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa. Abril de 2002. Clonagem molecular do *Tomato chlorotic mottle virus* (TCMV) e estudos de pseudo-recombinação entre begomovírus de tomateiros e *Sida* sp. Orientador: Francisco Murilo Zerbini Júnior. Conselheiros: Elizabeth Pacheco Batista Fontes e Murilo Geraldo Carvalho.

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 molecular de uma nova espécie de begomovírus detectada no município de Igarapé, MG, denominada *Tomato chlorotic mottle virus*, isolado MG-Ig1 (TCMV-[MG-Ig1]), e o estudo da ocorrência de eventos de pseudo-recombinação entre begomovírus que infectam tomateiro e *Sida* sp. Para a caracterização molecular, foram sintetizados dois pares de oligonucleotídeos sobrepostos com sítios de restrição que possibilitaram a amplificação do genoma completo (fragmentos de aproximadamente 2.600 nucleotídeos para os componentes A e B) do TCMV-[MG-Ig1]. Para o sequenciamento, o genoma completo foi dividido em subclones sobrepostos e as seqüências foram montadas com o auxílio de programas apropriados. A análise comparativa das seqüências confirmou a identidade do TCMV-[MG-Ig1] como uma espécie do gênero *Begomovirus*. Para os estudos de pseudo-recombinação foram misturados componentes virais clonados em uma cópia e meia do TCMV (isolados

BA-Se1 e MG-Be1), *Tomato rugose mosaic virus* (TRMV), *Tomato yellow mottle virus* (TYMoV) e *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), provenientes de tomateiro, e *Sida yellow mosaic virus* (SYMV) e *Sida mottle virus* (SMoV), provenientes de *Sida rhombifolia*. A inoculação foi realizada via biobalística em plantas de *Nicotiana benthamiana*, e o diagnóstico da infecção foi confirmado via PCR, utilizando oligonucleotídeos universais para begomovírus. Foram observados sintomas sistêmicos nas plantas inoculadas com os pseudo-recombinantes recíprocos entre TRMV e TGMV, TCMV-[BA-Se1] e TGMV, além de TRMV-A + TYMoV-B, TRMV-B + TCMV-[MG-Be1]-A, TRMV-B + SYMV-A, TCMV-[BA-Se1]-A + TYMoV-B, TCMV-[BA-Se1]-B + SMoV e TCMV-[BA-Se1]-B + SYMV-A. As infecções foram confirmadas via PCR em todos os casos. Os sintomas observados variaram de acordo com a combinação, desde leve clorose entre as nervuras até mosaico amarelo e encarquilhamento severo das folhas. Não foram observados sintomas sistêmicos nas plantas inoculadas com os pseudo-recombinantes recíprocos entre TRMV e TCMV-[BA-Se1], além de TCMV-[BA-Se1]-B + TCMV-[MG-Be1]-A. Na combinação entre TRMV-B + SMoV-A foram observados sintomas sistêmicos, porém apenas o componente A de SMoV foi detectado via PCR.

## ABSTRACT

ANDRADE, Eduardo Chumbinho, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa. April 2002. Molecular cloning of *Tomato chlorotic mottle virus* (TCMV) and pseudorecombination studies among begomoviruses from tomato and *Sida* sp. Advisor: Francisco Murilo Zerbini Júnior. Committee members: Elizabeth Pacheco Batista Fontes and Murilo Geraldo Carvalho.

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. The begomoviruses have two genomic components, are transmitted by whiteflies and infect dicot plants. Since 1994 there have been successive reports of begomovirus infection in tomato, in several states of Brazil. Partial sequencing of the genome of some of the 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 molecular characterization of a new species of begomovirus detected at the city of Igarapé, MG, named *Tomato chlorotic mottle virus*, isolate MG-Ig1 (TCMV-[MG-Ig1]), and the study of pseudorecombination events among begomoviruses from tomato and *Sida* sp. for the molecular characterization, two sets of overlapping primers with a common restriction site were designed to amplify the full-length viral genome (approximately 2.600 nucleotide fragments for the DNA-A and DNA-B) of TCMV-[MG-Ig1]. The full-length clones were subcloned for sequencing, and the sequences were assembled using the appropriate computer programs. Comparative analysis confirmed the identity of TCMV-[MG-Ig1] as a species of the genus *Begomovirus*. For the pseudorecombination studies, cloned DNA components TCMV (isolates BA-Se1 and MG-Be1), *Tomato rugose mosaic virus* (TRMV), *Tomato yellow mottle virus* (TYMoV) and *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), from tomato, and *Sida yellow mosaic virus* (SYMV) and *Sida mottle virus* (SMoV), from *Sida rhombifolia* were mixed and inoculated by particle bombardment into *Nicotiana*

*benthamiana* plants. Viral infection was confirmed by PCR with general begomovirus primers. Systemic symptoms were observed in plants inoculated with the reciprocal pseudorecombinants between TRMV and TGMV, TCMV-[BA-Se1] and TGMV, and also with TRMV-A + TYMoV-B, TRMV-B + TCMV-[MG-Be1]-A, TRMV-B + SYMV-A, TCMV-[BA-Se1]-A + TYMoV-B, TCMV-[BA-Se1]-B + SMoV and TCMV-[BA-Se1]-B + SYMV-A. Infections were confirmed by PCR in all cases. The symptoms observed varied with each combination, from a mild internervial chlorosis to yellow mosaic and severe leaf crumpling. Systemic symptoms were not observed in plants inoculated with the reciprocal pseudorecombinants between TRMV and TCMV-[BA-Se1], and also with TCMV-[BA-Se1]-B + TCMV-[MG-Be1]-A. The combination of TRMV-B + SMoV-A yielded systemic symptoms, but only the SMoV DNA-A was detected by PCR.

## 1. INTRODUÇÃO

A família *Geminiviridae* constitui uma das famílias de maior importância econômica dentre os vírus de plantas, englobando vírus cujo genoma é composto por uma fita simples de DNA circular, encapsidado em uma partícula icosaédrica geminada (Lazarowitz, 1992). A família é dividida em quatro gêneros (*Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus* e *Topocuvirus*), de acordo com o tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros, organização do genoma e relacionamento filogenético (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 e Anderson, 1997). Estão amplamente distribuídos, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, sendo uma das maiores ameaças à agricultura nestas regiões do globo (Brown e Bird, 1992; Polston e Anderson, 1997). O mosaico dourado do feijoeiro, nas Américas (Gilbertson et al., 1991a), o enrolamento amarelo das folhas do tomateiro, no Mediterrâneo e no Oriente Médio (Navot et al., 1991), e o mosaico da mandioca, na África (Fauquet e Fargette, 1988), são exemplos de doenças causadas por begomovírus que constituem fatores limitantes para a produtividade das respectivas culturas. Recentemente, a emergência de novas espécies de begomovírus infectando tomateiros nas Américas (Polston e Anderson, 1997) veio ressaltar de forma dramática o impacto causado por esses patógenos à agricultura. O controle das doenças causadas por begomovírus é dificultado pela ausência de fontes naturais de resistência e pela diversidade genética do inseto vetor, o que leva à rápida seleção de populações resistentes a inseticidas.

No Brasil, após diversos relatos de doenças transmitidas por mosca-branca ocorridos na década de 1950 (Costa e Bennet, 1950; Costa, 1955), Costa (1965) descreveu o mosaico dourado do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), denominando o agente etiológico *Bean golden mosaic virus* (BGMV). Posteriormente, o BGMV foi caracterizado como o primeiro

geminivírus, e atualmente é o membro-tipo do gênero *Begomovirus* (Goodman, 1977; Van Regenmortel et al., 2000). Na época, o mosaico dourado do feijoeiro foi considerado uma doença de importância econômica secundária, mas hoje vem causando grandes perdas em pelo menos 12 países da América Latina (Gilbertson et al., 1991b). O aumento populacional de seu inseto vetor, a mosca-branca *Bemisia tabaci*, durante a década de 70 foi determinante para a disseminação do BGMV (Costa, 1976). No Brasil, esse aumento explosivo de *Bemisia tabaci* foi atribuído ao aumento da área plantada com soja, uma excelente hospedeira do inseto (Costa, 1975).

O primeiro relato mundial de begomovírus em tomateiro ocorreu no estado de São Paulo, em 1960 (Flores et al., 1960). O agente etiológico foi posteriormente caracterizado e denominado *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), também transmitido por *Bemisia tabaci* (Maytis et al., 1975). Entretanto, o aumento da incidência do inseto vetor não causou aumento da incidência de TGMV em tomateiro no Brasil, ao contrário do que foi observado para o BGMV em feijoeiro, provavelmente porque o biótipo A de *Bemisia tabaci*, o único que ocorria no Brasil durante as décadas de 1970 e 1980, raramente coloniza o tomateiro. Entretanto, ao longo da década de 1980, perdas substanciais foram relatadas em tomateiros na Flórida, América Central, Caribe, México e Venezuela como resultado de infecção por begomovírus. A incidência era tão severa a ponto de inviabilizar o cultivo comercial em determinadas regiões, a exemplo do *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) na República Dominicana (Polston e Anderson, 1997). Nessas regiões predominava o biótipo B de *B. tabaci*, relatado pela primeira vez no Brasil no início da década de 1990 (Melo, 1992). Este biótipo, considerado por alguns autores como uma nova espécie, denominada *Bemisia argentifolii*, é também conhecido como “mosca-branca da folha prateada” (“silverleaf whitefly”) (França, 1996). A distinção entre os dois biótipos é feita com base em características morfológicas, padrões de aloenzimas e RFLP (Perring et al., 1993).

O biótipo B de *B. tabaci* possui maior gama de hospedeiros, maior fecundidade e maior capacidade de dispersão em relação ao biótipo A (Bedford et al., 1994). Populações do biótipo A possuem limitada capacidade de alimentação e oviposição em plantas de tomateiro, o que diminui a probabilidade de transmissão de begomovírus para essa planta. Já o biótipo B é altamente adaptado para alimentação e oviposição em plantas de tomateiro (Schuster et al., 1990), facilitando a transmissão de begomovírus a partir de outras plantas infectadas das quais ele também se alimenta, incluindo *Sida rhombifolia*, uma planta daninha de ocorrência freqüente no Brasil e que serve como reservatório natural de begomovírus (Frischmuth et al., 1997).

Devido a suas características de maior adaptabilidade, o biótipo B de *B. tabaci* se disseminou rapidamente pelas regiões quentes e secas do Brasil, incluindo as principais regiões produtoras de tomate, durante o início da década de 1990 (Lourenção e Nagai, 1994). Simultaneamente, relatos de sintomas típicos de infecção por begomovírus em tomateiros ocorreram no Distrito Federal (França, 1996), Triângulo Mineiro (Resende et al., 1996; Zerbini et al., 1996), Rio de Janeiro (Galvão et al., 1998) e na região Nordeste, incluindo o estado da Bahia (Ribeiro et al., 1996) e a região do Sub-Médio São Francisco (Bahia e Pernambuco), então a principal região produtora de tomate para processamento industrial no Brasil (Bezerra et al., 1997).

Os begomovírus associados às epidemias em tomateiro nos diversos estados brasileiros foram isolados e caracterizados por Ribeiro et al. (2002). O sequenciamento parcial do genoma desses vírus revelou uma grande diversidade genética, com a descrição de diversas novas espécies. A explicação mais provável para esse surgimento repentino de novos begomovírus em tomateiro no Brasil está relacionada à presença do novo biótipo de mosca branca, que colonizaria plantas silvestres e daninhas, transmitindo vírus nativos que infectam essas plantas para o tomateiro, inclusive formando infecções mistas. A presença de begomovírus em uma nova espécie hospedeira, somada à co-existência de begomovírus distintos em uma mesma planta, possibilitaria a recombinação e/ou pseudo-recombinação de componentes do genoma viral, gerando novas espécies de vírus provavelmente mais adaptados ao novo hospedeiro. Além disso, muitas vezes pode ocorrer sinergismo entre vírus em infecções mistas, conforme relatado no continente africano com o *African cassava mosaic virus* (ACMV) e o *East african cassava mosaic virus* (EACMV) (Fauquet et al., 2000). Resultados obtidos por grupos de pesquisadores no México e nos EUA sugerem que esse processo de evolução e adaptação de novas espécies de begomovírus pode ocorrer em períodos de tempo relativamente curtos (Hou e Gilbertson, 1996; Torres-Pacheco et al., 1993).

A caracterização molecular das novas espécies de begomovírus que estão surgindo no Brasil aumentará o conhecimento com relação a diferenças e semelhanças patogênicas, bioquímicas e moleculares entre begomovírus. O estudo de pseudo-recombinação entre espécies virais distintas é uma das formas de estudar o relacionamento taxonômico e evolutivo entre esses vírus. A médio e longo prazo, estes conhecimentos fornecerão subsídios científicos para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes para o controle de begomovírus em tomateiro.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Taxonomia, origem e evolução dos geminivírus

A família *Geminiviridae* é caracterizada por possuir material genético composto por DNA de fita simples (ssDNA), circular, com 2.500 a 3.000 nucleotídeos (nt), encapsidado por uma única proteína estrutural que se arranja na forma de 22 capsômeros formando dois icosaedros incompletos com cerca de 18×30 nm, que dão um aspecto geminado ao vírion, característico desta família de vírus de plantas (Lazarowitz, 1992).

Os geminivírus, de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), são classificados na família *Geminiviridae*, subdividida em quatro gêneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus* e *Topocuvirus* (Van Regenmortel et al., 2000). O gênero *Mastrevirus* inclui os geminivírus com um componente genômico transmitidos por cigarrinhas (Homoptera:Cicadellidae) a plantas monocotiledôneas. O *Maize streak virus* (MSV) é a espécie-tipo. Este gênero inclui alguns patógenos importantes de culturas como o milho e o trigo. O gênero *Curtovirus* engloba geminivírus com um componente genômico transmitidos por cigarrinhas à espécies dicotiledôneas, sendo o *Beet curly top virus* (BCTV) a espécie-tipo. O gênero *Begomovirus* inclui as espécies com um ou dois componentes genômicos, denominados A e B, transmitidas por mosca-branca (*Bemisia tabaci*). Cada componente de aproximadamente 2.600 nt é encapsidado separadamente em partículas geminadas, sendo necessárias as duas partículas para que a infecção ocorra. O *Bean golden mosaic virus* (BGMV) é a espécie-tipo. Entre os begomovírus de maior importância econômica pode-se citar o BGMV, o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) e o *African cassava mosaic virus* (ACMV) (Lazarowitz, 1992; Rybicki, 1994; Timmermans et al., 1994). O gênero *Topocuvirus* possui apenas uma espécie (*Tomato pseudo-curly top virus*, TPCTV),

com um componente genômico e transmitida por cigarrinhas (Homoptera:Auchenorrhyncha) a espécies dicotiledôneas.

Dentre as diversas hipóteses sobre a origem dos geminivírus, a mais aceita é aquela que propõe a origem a partir de bacteriófagos, como  $\phi$ X174, ou de plasmídeos bacterianos com genoma composto de ssDNA (Koonin e Ilyina, 1992). Esta hipótese é baseada na similaridade entre seqüências e em processos como o mecanismo de círculo rolante utilizado na replicação do genoma destes organismos. Além disso, já foi demonstrado que o promotor da proteína capsidial dos geminivírus é funcional em *E. coli* (Petty et al., 1986) e que o *Tomato leaf curl virus* (TLCV) é replicado eficientemente em *Agrobacterium tumefaciens* (Ridgen et al., 1996). Estas observações fornecem evidências para a teoria de que estes vírus com genoma composto por ssDNA circular evoluíram a partir de replicons epissomais de células procarióticas.

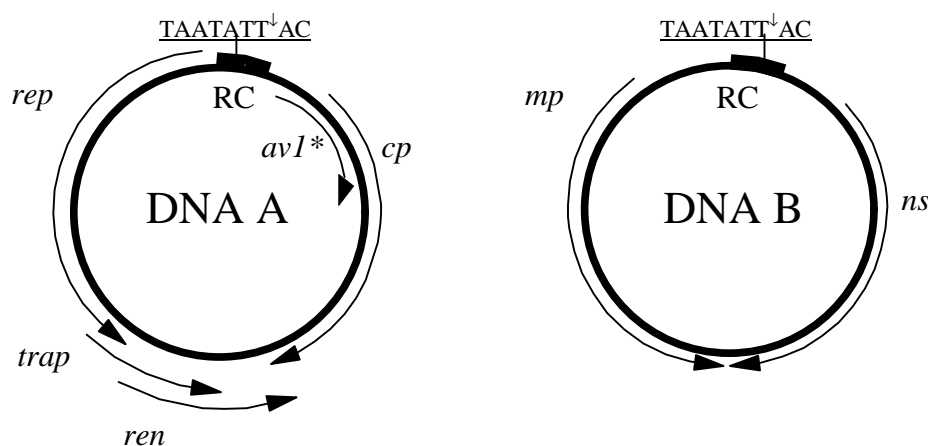
Dados comparativos de filogenia obtidos por Rybicki (1994) sugerem que os geminivírus e os nanovírus, que também possuem genoma composto por ssDNA, evoluíram a partir de um ancestral comum ou de um evento evolucionário semelhante. Evidências adicionais obtidas por Saunders e Stanley (1999) apontam a existência de um ancestral comum entre nanovírus e geminivírus. Partindo deste ancestral comum teria ocorrido um processo de especiação que, de acordo com características relativas a estrutura do genoma, transmissão pelo vetor e tipo de hospedeiro, levou ao agrupamento em três gêneros (Rybicki, 1994; Padidam, 1995). Para o gênero *Mastrevirus* parece ter havido um período mais longo de evolução, já que as espécies deste gênero são mais divergentes entre si do que as espécies de curtovírus e de begomovírus. As espécies de mastrevírus podem ser divididas em dois grupos, denominados “African streak group” e “Australian striate mosaic group”. Analisando os dois grupos verifica-se que a separação é essencialmente devida ao isolamento geográfico. Os begomovírus, segundo Rybicki (1994), também podem ser divididos em dois grupos, aqueles originários das Américas (“Novo Mundo”) e aqueles originários da Europa, Ásia e África (“Velho Mundo”). Estes dois grupos podem ser claramente diferenciados pela ausência ou presença da ORF AV1 (“pre-coat”), ausente nos begomovírus das Américas. O componente B está presente somente nos begomovírus, um indicativo de que ele teria surgido após a divergência desse gênero. O componente B pode ter se originado como um satélite do componente A ou como um componente A degenerado, que teria permanecido dependente do seu respectivo vírus parental. Ainda de acordo com Rybicki (1994), os curtovírus seriam espécies originadas de antigas recombinações entre espécies de mastrevírus e begomovírus. O

gene da proteína capsidial é derivado de um mastrevírus ancestral, e os genes que codificam proteínas associadas à replicação viral são derivados de um begomovírus ancestral.

As etapas de evolução da família *Geminiviridae* foram resumidas por Padidam et al., (1995) citados por Faria e Zerbini (1999). Um ancestral comum originou os mastrevírus e begomovírus. Tal ancestral infectava monocotiledôneas, tinha apenas um componente genômico e era transmitido por cigarrinhas. Isto explica a maior variabilidade genética em mastrevírus. Eventualmente, o *Tobacco yellow dwarf virus* (TobYDV) e o *Bean yellow dwarf virus* (BeYDV), que são mastrevírus, adquiriram a capacidade de infectar dicotiledôneas. Posteriormente, mudanças na CP permitiram a transmissão por mosca-branca, e em seguida ocorreu a aquisição do segundo componente genômico. Os curtovírus possuem características em comum com os mastrevírus e os begomovírus, sendo considerados recombinantes entre vírus pertencentes aos dois gêneros. Um outro evento de recombinação foi identificado para o TPCTV. Este vírus surgiu provavelmente da recombinação entre um begomovírus e um outro vírus distinto, o que sugere que outros geminivírus não relacionados com vírus pertencentes aos quatro gêneros atualmente reconhecidos possam estar presentes no campo.

## **2.2. Características moleculares**

O genoma da maioria dos begomovírus está representado na Figura 1. O componente A dos begomovírus é responsável pela replicação e encapsidamento do genoma viral, enquanto o componente B contém os genes requeridos para o movimento célula-a-célula e a longa distância, gama de hospedeiros e desenvolvimento de sintomas (Timmermans et al., 1994; Palmer e Rybicki, 1998). Para a infecção sistêmica são necessários ambos os componentes (Stanley, 1983). Os componentes não possuem homologia de seqüência, exceto por uma região intergênica de aproximadamente 200 nucleotídeos denominada região comum (RC), que é altamente conservada entre os dois componentes de uma determinada espécie viral (acima de 90% de homologia). A partir desta região intergênica divergem os genes virais, nos sentidos viral e complementar (Stanley e Gay, 1983; Howarth et al., 1985).



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

Nos begomovírus o componente A codifica de quatro a seis proteínas: uma proteína essencial para a replicação (Rep, “replication-associated protein”, anteriormente denominada AC1 ou AL1) (Hanley-Bowdoin et al., 1999); uma proteína transativadora (TrAP, “trans-activating protein”, anteriormente AC2 ou AL2), fator de transcrição atuando *in trans* nos promotores dos genes de sentido viral (*cp* e *ns*) (Sunter e Bisaro, 1991, 1992); a proteína Ren (“replication-enhancer protein”, anteriormente AC3 ou AL3), fator de amplificação da replicação viral (Hanley-Bowdoin et al., 1999); e a proteína capsidial (CP, “coat protein”, anteriormente AV1 ou AR1), essencial para a transmissão do vírus pelo inseto vetor (Briddon et al., 1990; Hofer et al., 1997). O componente B codifica as proteínas MP (“movement protein”, anteriormente BC1 ou BL1) e NS (“nuclear shuttle”, anteriormente BV1 ou BR1), a primeira envolvida no movimento célula-a-célula do vírus por meio do aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas (Noueiry et al., 1994) e a segunda responsável pelo transporte do DNA através do envelope nuclear (Sanderfoot et al., 1995, 1996).

Mutagênese *in vitro* e expressão em plantas transgênicas demonstraram que a proteína Rep é a única proteína viral essencial para a replicação (Hayes e Buck, 1989; Hanley-Bowdoin et al., 1990). O componente B não tem autonomia de replicação (Davies et al., 1987). A proteína Rep não é considerada uma replicase, mas está associada à replicação do

DNA, com propriedade de ligação específica a DNA de fita simples e dupla (Fontes et al., 1992), clivagem e ligação do DNA em seqüências específicas (Laufs et al., 1995) e hidrólise de ATP (Desbriez et al., 1995). A proteína Rep é uma proteína multifuncional, que atua na regulação da replicação e transcrição do DNA viral (Eagle et al., 1994; Sunter et al., 1993). A proteína age na forma de multímeros, com domínios responsáveis pela oligomerização da proteína, ligação ao DNA e clivagem do DNA de forma seqüência-específica (Orozco et al., 1998). O sítio de ligação para Rep é requerido não só para o reconhecimento da origem de replicação mas também para regulação negativa da transcrição do gene *rep* (Eagle et al., 1994). Outra função da proteína Rep é induzir indiretamente a expressão de proteínas responsáveis pela síntese de DNA do hospedeiro em células totalmente diferenciadas, criando um ambiente que permite a replicação viral de forma eficiente (Ach et al., 1997).

O produto do gene *trap* é um fator de transcrição, que atua *in trans* no promotor de genes de sentido viral (*cp* e *ns*) (Sunter e Bisaro, 1991; Sunter e Bisaro, 1992). Na presença de TrAP, a expressão do promotor da proteína capsidial foi aumentada em cerca de 60 a 90 vezes (Brough et al., 1992).

A função do produto do gene *ren* é aumentar a eficiência da replicação de maneira inespecífica, porém esta função não é essencial (Morris et al., 1991). A replicação do TGMV, na ausência de Ren, é reduzida em cerca de 50 vezes (Sunter et al., 1990). Experimentos realizados por Settlage et al. (1996) demonstraram que ocorre interação entre as proteínas Rep e Ren, formando oligômeros funcionais responsáveis pelo aumento da eficiência da replicação viral. Esses autores sugerem que Ren estabiliza o complexo de replicação formado por Rep e fatores do hospedeiro, mas o seu mecanismo de atuação ainda não foi elucidado completamente.

A ORF AC4 se encontra inserida dentro do gene *rep*, mas é codificada em uma fase de leitura distinta. A ORF AC4 possui o potencial de codificar uma proteína de 10 kDa. Gröning et al. (1994) demonstraram por meio de experimentos de expressão transiente que AC4 em TGMV provavelmente reprime a expressão de Rep através da regulação negativa do promotor AL61 do gene *rep*. Esta repressão é independente do sítio de ligação para Rep, pois um cassete de expressão em plantas codificando AC4 foi capaz de reprimir o gene da luciferase sob o comando de um promotor AL61 cuja região de ligação a Rep havia sido deletada (Eagle e Hanley-Bowdoin, 1997). Outros autores (Pooma e Petty, 1996) questionam se o gene *ac4* é realmente expresso em TGMV e em outros begomovírus.

A proteína capsidial (CP) é necessária para a infecção sistêmica de alguns geminivírus e dispensável para a maioria dos outros (Qin et al., 1998). Outra função da CP parece estar

relacionada à movimentação célula-a-célula do vírus e transmissão pelo vetor (Mullineaux et al., 1984; Höfer et al., 1997b). Briddon et al. (1990) demonstraram que a troca do gene CP do ACMV, um begomovírus (transmitido por mosca-branca), pelo correspondente do BCTV, um curtovírus (transmitido por cigarrinha), resultou na alteração de especificidade do inseto vetor. A conformação tridimensional correta da proteína capsidial e a transmissão pelo vetor são controladas pelos aminoácidos 129 e 134 (Noris et al., 1998).

A ORF AV1 (“precoat”) está presente somente em begomovírus do “Velho Mundo” e parece estar associada ao movimento sistêmico do vírus. Plantas de *Nicotiana benthamiana* inoculadas com DNA infeccioso do TYLCV contendo mutações no gene *av1* desenvolveram sintomas moderados de infecção viral e apresentaram baixo acúmulo de DNA viral, tanto de fita simples quanto de fita dupla. Porém, protoplastos inoculados com essa mesma construção apresentaram acúmulo normal de DNA viral, sugerindo que AV1 está envolvida no movimento sistêmico do vírus (Padidam et al., 1996).

Para que o DNA dos begomovírus se movimente célula-a-célula há necessidade da interação entre as proteínas NS e MP. Este modelo de movimento intracelular foi desenvolvido a partir de estudos com o BDMV e o SqLCV (Noueiry et al., 1994; Pascal et al., 1994). Recentemente, Rojas et al. (1998) demonstraram que as proteínas MP e NS de BDMV interagem diretamente com o DNA viral, reconhecendo-o com base em sua forma e tamanho.

### **2.3. Replicação do genoma viral**

O sítio de replicação dos geminivírus localiza-se no núcleo de células infectadas. A replicação viral é dependente da maquinaria do hospedeiro, o que faz com que os geminivírus sejam modelos ideais para o estudo da replicação e expressão gênica em plantas. Esse fato possibilitou um grande acúmulo de informações sobre a replicação destes vírus.

As partículas virais acumulam-se exclusivamente no núcleo, na forma de agregados irregulares ou arranjos cristalinos hexagonais (Kim et al., 1978). Geminivírus replicam o seu genoma circular de fita simples de DNA por meio de um intermediário de fita dupla (conhecido como forma replicativa, RF), utilizando o mecanismo de círculo rolante, semelhante ao utilizado pelos bacteriófagos  $\phi$ X174 e M13 (Saunders et al., 1991; Stanley, 1995). Nestes fagos, proteínas do hospedeiro convertem a fita simples de DNA em fita dupla, que é amplificada e serve como molde para transcrição e síntese do DNA de fita simples (Revington et al., 1989). Nos begomovírus não se sabe exatamente como ocorre essa conversão, mas todas as evidências indicam que ela é realizada por fatores do hospedeiro (Nagar et al., 1995). Em mastrevírus já foi identificado um “primer” que poderia ser o

iniciador da síntese da fita complementar, mas o mesmo ainda não foi encontrado para os begomovírus (Donson et al., 1984).

Na replicação dos geminivírus a fita complementar serve de molde para a síntese de várias cópias do DNA genômico, que formam uma longa fita simples de DNA linear contendo vários genomas unitários (multímero ou concatômero). O multímero é clivado gerando monômeros (os DNAs genômicos), que serão religados gerando moléculas circulares de ssDNA correspondentes ao genoma viral, as quais por sua vez serão encapsuladas formando os vírions (Lazarowitz, 1992; Timmermans, et al., 1994; Laufs et al., 1995). A origem de replicação (*ori*) está localizada na região intergênica comum entre os dois componentes genômicos. A *ori* possui uma organização modular, com pelo menos três módulos funcionais (Fontes et al., 1994b). A seqüência de nucleotídeos da região comum é altamente conservada para uma determinada espécie viral, mas variável entre diferentes espécies de vírus, com exceção de um elemento de 30 nucleotídeos essencial para a replicação (Lazarowitz, 1992). Este elemento, contendo uma seqüência repetida e invertida composta predominantemente por guanina e citosina, forma uma estrutura conservada (“structurally-conserved element”, SCE) em forma de grampo com uma seqüência invariável (5'-TAATATTAC-3') encontrada em todos os geminivírus (Davies et al., 1987; Lazarowitz et al., 1992) e que constitui um domínio funcional da origem de replicação (Orozco e Hanley-Bowdoin, 1998). É neste nonanucleotídeo que ocorre a clivagem (TAATATT↓AC) para início do processo de replicação por círculo rolante (Stanley, 1995). Esta clivagem é feita pela proteína Rep, que funciona como uma endonuclease sítio-específica, com requerimento de estrutura e de seqüência (Laufs et al., 1995; Orozco e Hanley-Bowdoin, 1998). Dentro da RC existem também seqüências que funcionam como determinantes específicos da replicação, como o sítio de ligação de Rep (Fontes et al., 1992; Fontes et al., 1994a) e regiões promotoras da RNA polimerase tipo II responsável pela transcrição dos genes virais.

O begomovírus mais bem estudado quanto a replicação é o TGMV. Este vírus codifica duas proteínas que atuam na replicação, Rep e Ren. A RC do TGMV inclui repetições em ordem direta de seqüências de cinco nucleotídeos, separadas entre si por três nucleotídeos, onde se liga Rep. A síntese da fita positiva se inicia na estrutura conservada em forma de grampo, o SCE (Fontes et al., 1994a; Orozco et al., 1998). O sítio de ligação de Rep ao DNA do TGMV está localizado 34 nt a 5' deste (variável de 23 a 82 nt para outros begomovírus), entre a caixa TATA do gene *rep* e a SCE (Arguello-Astorga et al., 1994a,b; Orozco et al., 1998). Esta ligação é necessária para a autoregulação negativa que Rep exerce em sua própria expressão. 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 (revisado por Gutierrez, 1999).

#### **2.4. Movimento do vírus na planta**

Para o sucesso da infecção de plantas por vírus é necessário que o vírus mova-se para fora da célula inoculada e se espalhe sistemicamente pela planta. Este 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 para toda a planta hospedeira.

Infecções causadas por mastrevírus e curtovírus são restritas ao floema, com exceção do *Chloris striate mosaic virus* (CSMV) e MSV, que já foram encontrados em células do mesófilo. Os begomovírus são encontrados em diversos tipos de células do mesófilo, córtex e epiderme (Timmermans et al., 1994; Wang et al., 1996).

A parede celular é a principal barreira à propagação de todos os vírus de plantas. Os begomovírus codificam uma proteína não estrutural, não envolvida na replicação e encapsulamento, denominada proteína de movimento (MP). Essa proteína associa-se à membrana celular e altera a arquitetura dos plasmodesmas, facilitando o transporte do genoma viral (Noueiry et al., 1994). Como os begomovírus se multiplicam no núcleo da célula infectada e não no citoplasma, é necessária uma etapa adicional de transporte, o transporte do núcleo para o citoplasma (Palmer e Rybicki, 1998). Para isto os begomovírus codificam uma segunda proteína de movimento denominada NS, com a função de transportar o DNA viral do núcleo para o citoplasma e vice-versa. Estas duas proteínas de movimento atuam de maneira cooperativa (Sanderfoot et al., 1995). O sucesso da infecção sistêmica depende do transporte do vírus a longa distância e de sua entrada no floema. Qualquer bloqueio neste processo acarreta o aparecimento de sintomas atenuados, ou mesmo a resistência do hospedeiro à infecção sistêmica (Lucas e Gilbertson, 1994).

Mastrevírus e curtovírus são geralmente restritos ao floema, dependendo largamente do fluxo de fotoassimilados para sua dispersão. A proteína capsial (CP) é essencial para este processo, e o movimento no floema ocorre na forma de vírions. Também existem evidências de que a forma encapsulada esteja envolvida na dispersão a longa distância de begomovírus (Palmer e Rybicki, 1998; Padidam et al., 1996). No entanto, tanto MP quanto NS reconhecem o DNA viral de maneira específica em relação a forma e comprimento (Rojas et al., 1998), o que eliminaria a necessidade da presença da proteína capsial 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 (Gilbertson e Lucas, 1996).

Estudos sobre o movimento a longa distância de begomovírus por meio de mutações no gene da proteína capsidial levaram à identificação de três tipos de movimento: 1) movimento local (célula-a-célula), não requerendo a CP, utilizando as proteínas MP e NS para atravessar respectivamente os plasmodesmas e a membrana nuclear; 2) movimento sistêmico independente de CP, ocorrendo em hospedeiros aos quais o vírus é bem adaptado; 3) movimento sistêmico dependente de CP, ocorrendo em relações de pouca adaptação entre o vírus e o hospedeiro (Schaffer et al., 1995).

## **2.5. Interações geminivírus/hospedeiro**

Os vírus de plantas infectam células vegetais diferenciadas, nas quais não ocorre nova síntese de DNA. Entretanto, no caso específico dos geminivírus, as proteínas do hospedeiro associadas com a replicação do genoma viral devem incluir enzimas envolvidas na replicação do DNA da própria planta. Dessa forma, o vírus deve ser capaz de ativar a transcrição dos genes do hospedeiro envolvidos na síntese dessas enzimas, pois elas não estão normalmente presentes em células diferenciadas. Uma vez presentes no núcleo, essas proteínas do hospedeiro poderiam, além de participar na replicação do DNA viral, reativar a síntese de DNA da própria célula hospedeira, revertendo a célula a um estado de divisão celular. Nagar et al. (1995) comprovaram este fenômeno, encontrando proteínas do hospedeiro associadas à replicação do DNA em células diferenciadas infectadas pelo TGMV, as quais normalmente não apresentam níveis detectáveis dessas proteínas. Também observaram que a replicação do TGMV pode levar ao acúmulo de um fator de processividade da replicação do DNA vegetal, encontrado na fase S do ciclo celular em células diferenciadas. Estudos utilizando plantas transgênicas expressando Rep do TGMV confirmaram que este efeito é mediado por Rep. Isto implica que Rep induz a replicação do DNA em células que normalmente não realizam esse processo (Palmer e Rybicki, 1998).

A proteína TrAP, por sua vez, interage com uma proteína cinase homóloga à proteína SNF1 de leveduras. Essa proteína cinase está envolvida na resposta de defesa da planta à fitopatógenos (não apenas vírus, mas também fungos e bactérias).. Recentemente, Voinnet et al. (1999) sugeriram que a proteína TrAP do ACMV é capaz de inativar o mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional, um dos principais componentes da resposta de defesa de plantas à infecção por vírus.

## 2.6. Transmissão natural

Geminivírus não são transmitidos pela semente ou por contato manual. A dispersão natural destes vírus ocorre via insetos vetores (Dhar e Singh, 1995). A transmissão é do tipo circulativa não-propagativa, envolvendo a passagem de partículas virais do intestino para a hemolinfa do inseto, da hemolinfa para as glândulas salivares e da saliva para outras plantas. Evidências da replicação do vírus no inseto vetor existem somente para o TYLCV (Rubinstein e Czosnek, 1997; Guanin e Czosnek., 1998), mas não para as outras espécies de geminivírus, de forma que a eficiência da transmissão está relacionada à concentração do vírus na planta e à duração do período de aquisição (Timmermans et al., 1994). Os insetos transmissores de geminivírus pertencem à ordem Homoptera, e incluem as moscas-brancas (Homoptera: Aleyrodidae) e cigarrinhas (Homoptera:Cicadellidae e Homoptera:Auchenorrhyncha) (Lazarowitz, 1992). Espécies pertencentes aos gêneros *Curtovirus* e *Topocuvirus* são transmitidas cada uma por uma única e distinta espécie de cigarrinha, enquanto aquelas pertencentes ao gênero *Mastrevirus* podem ser transmitidos por quatro diferentes espécies de cigarrinha. Já os begomovírus são transmitidos pela mosca-branca *Bemisia tabaci* (Faria e Zerbini, 1999).

No Brasil, o biótipo A de *B. tabaci* era predominante até 1990/91, quando foi relatada a introdução do biótipo B, provavelmente via plantas ornamentais importadas dos EUA (França et al., 1996). Segundo Bedford et al. (1994), as fêmeas do biótipo B de *B. tabaci* possuem taxas maiores de ovoposição, alta capacidade reprodutiva, baixa mortalidade em novos hospedeiros e uma gama de hospedeiros muito mais ampla em comparação com o biótipo A, incluindo o tomateiro e outras solanáceas. Essas características indicam uma grande capacidade de adaptação e elevada taxa de dispersão deste biótipo, que geralmente desloca populações do biótipo A tornando-se predominante nas áreas onde é introduzido. Polston e Anderson (1997) atribuem o surgimento de novas espécies de begomovírus infectando o tomateiro à distribuição do biótipo B de *B. tabaci* por áreas cada vez maiores ao longo das Américas.

## 2.7. Begomovírus em tomateiro e variabilidade genética

Até o início da década de 80, begomovírus causavam danos principalmente na produção de leguminosas, enquanto apenas casos isolados e não significativos eram relatados em lavouras de tomateiro. Atualmente, regiões produtoras de tomate no Brasil, Venezuela, América Central, México, Caribe e Flórida têm sofrido os efeitos de uma alta incidência de begomovírus, acarretando grandes perdas na produção (Polston e Anderson, 1997).

Dentre os geminivírus transmitidos para o tomateiro por cigarrinhas encontram-se o BCTV e o TPCTV (Bridson et al., 1996). Os geminivírus transmitidos por mosca-branca incluem o TGMV, TYLCV, *Tomato mottle virus* (ToMoV), *Tomato yellow dwarf virus* (TYDV), *Tomato yellow mosaic virus* (TYMV), *Tomato leaf crumple virus* (TLCrV), *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) e *Chino del tomate virus* (CdTV) (Pour, 1991; Abouzid et al., 1992; Paplomatas et al., 1994). Muitos desses vírus estão restritos a certas regiões, como o ToMoV à Flórida e o TYMV à Venezuela. No México, entretanto, diversos begomovírus podem ser encontrados em tomateiro, inclusive em infecções mistas. É possível que a ocorrência de infecções mistas favoreça a evolução de begomovírus, via recombinação ou rearranjo dos componentes genômicos (pseudo-recombinação).

Além das diversas espécies de begomovírus que infectam o tomateiro, uma outra fonte de variabilidade seriam os begomovírus que infectam plantas daninhas e silvestres. Um exemplo é *Sida rhombifolia*, que funcionaria como um reservatório natural de begomovírus, a partir do qual plantas agronomicamente importantes seriam infectadas via inseto vetor. De fato, a caracterização biológica do *Sida golden mosaic virus* da Costa Rica (SiGMV-[Co]) revelou que este vírus é capaz de infectar tomateiros e feijoeiros (Frischmuth et al., 1997). Vários relatos podem ser encontrados na literatura associando infecções de plantas por begomovírus à presença de plantas daninhas nas lavouras (Creamer et al., 1996; Roye et al., 1997; Umaharan et al., 1998; Sanchez-Campos et al., 1999).

A recombinação é o principal mecanismo gerador de variabilidade genética em begomovírus. Por exemplo, a seqüência de nucleotídeos do PHYVV indica que esse vírus é o resultado de recombinação entre begomovírus do “Velho Mundo” (ACMV) e do “Novo Mundo” (ToMoV) (Torres-Pacheco et al., 1993).

Recentemente foi encontrado em *Ageratum conyzoides* um DNA defectivo-inteferente com baixa homologia com o *Ageratum yellow vein virus* (AYVV), um begomovírus que infecta esta espécie de planta daninha. Esse DI-DNA apresenta uma alta homologia com o gene *rep* de um nanovírus e 73% de identidade com um begomovírus encontrado recentemente infectando algodão. Estes resultados sugerem a ocorrência de eventos de recombinação entre vírus pertencentes a famílias distintas de vírus de plantas (Saunders e Stanley, 1999).

A existência de dois componentes genômicos na maioria dos begomovírus possibilita um mecanismo alternativo para obtenção de variabilidade genética, a troca de componentes entre vírus distintos (pseudo-recombinação). Pseudo-recombinantes podem ser obtidos *in vivo* utilizando clones dos componentes A e B, conforme obtido por Gilbertson et al. (1993) para o ToMoV e o *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV), ou podem ocorrer naturalmente no campo,

conforme verificado por Paplomatas et al. (1994) em plantas de tomate infectadas pelo TLCrV. Experimentos com pseudo-recombinantes são também ferramentas importantes no estudo de funções de genes e podem revelar relações filogenéticas, como é o caso da mistura de componentes genômicos do BGYMV e BGMV, que possuem homologia inferior a 75% na seqüência de nucleotídeos e não formam pseudo-recombinantes infecciosos (Gilbertson et al., 1993). Begomovírus com regiões comuns suficientemente similares podem formar pseudo-recombinantes infecciosos, mas freqüentemente os pseudo-recombinantes recíprocos apresentam diferenças na replicação e infecção sistêmica (Faria et al., 1994 citado por Faria e Zerbini, 1999).

Embora diferentes espécies de begomovírus possuam organização genômica similar, a produção de pseudo-recombinantes viáveis exige uma interação altamente específica da proteína Rep com a origem de replicação. Da mesma forma, os produtos dos genes codificados pelo componente B (MP e NS) devem ser capazes de mediar o movimento do DNA-A heterólogo, e esta habilidade parece ser dependente da origem geográfica dos vírus (Novo ou Velho Mundo) (Frischmuth et al., 2000). A viabilidade do pseudo-recombinante indica que fatores envolvidos na replicação e movimentação são intercambiáveis. Neste caso, tanto as seqüências da RC quanto do gene *rep* devem ser altamente conservadas (Schaffer et al., 1995). As diferenças de viabilidade e eficiência de replicação observadas entre pseudo-recombinantes recíprocos indicam que a pseudo-recombinação entre begomovírus é um fenômeno complexo que envolve interações entre fatores do vírus e do hospedeiro.

Embora a pseudo-recombinação seja comum entre estirpes da mesma espécie de begomovírus, até hoje poucos trabalhos relataram a formação de pseudo-recombinantes viáveis entre espécies distintas. Gilbertson et al. (1993) relataram a obtenção de pseudo-recombinantes entre o ToMoV e o BDMV. Höfer et al. (1997) obtiveram um pseudo-recombinante entre o DNA-A de *Abutilon mosaic virus* (AbMV) e o DNA-B do SGMV-[Co], porém não conseguiram o mesmo resultado com o pseudo-recombinante recíproco. Frischmuth et al. (2000) relataram a formação de pseudo-recombinantes entre o DNA-A de SGMV-[Ho<sub>yv</sub>] e o DNA-B de SGMV-[Co]. Já entre os pseudo-recombinantes formados pelo DNA-A de SGMV-[Co] combinado ao DNA-B de três isolados de SGMV-[Ho] que possuíam pequenas diferenças na composição de nucleotídeos, apenas um mostrou-se viável, porém pouco eficiente, e não foi capaz de infectar a planta a partir da qual foi originalmente isolado (Frischmuth et al., 2000).

Resultados interessantes foram obtidos por Hou e Gilbertson (1996) por meio da formação de pseudo-recombinantes com o DNA-A do ToMoV e o DNA-B do BDMV. Estes

pseudo-recombinantes, embora infecciosos, apresentavam acúmulo reduzido do DNA-B e sintomas atenuados em *N. benthamiana*. Entretanto, após três passagens mecânicas nesse hospedeiro, os sintomas tornaram-se idênticos aos produzidos pelo ToMoV e o nível do DNA-B tornou-se igual ao do DNA-A. A análise das regiões comuns dos DNAs -A e -B do pseudo-recombinante provou a ocorrência de recombinação intermolecular na RC do DNA-B do BDMV, tornando-a idêntica à RC do DNA-A do ToMoV e permitindo que o DNA-B fosse reconhecido com 100% de eficiência pela proteína Rep do ToMoV. Este resultado evidencia a importância da pseudo-recombinação e da recombinação na evolução de begomovírus e em sua adaptação a novos hospedeiros.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Obtenção e manutenção do isolado viral

O isolado viral a ser caracterizado neste estudo foi obtido em Igarapé, Minas Gerais, a partir de plantas de tomateiro apresentando sintomas de mosaico amarelo, distorção foliar e nanismo (Zerbini et al., 1996). O isolado foi caracterizado biologicamente por Ambrozevicius (2000). Análise de seqüências parciais do genoma indicou tratar-se de uma nova espécie de begomovírus, denominada *Tomato chlorotic mottle virus* isolado MG-Ig1 (TCMV-[MG-Ig1]) (Ambrozevicius et al., 1999; Ribeiro et al., 2002). O isolado foi mantido em casa de vegetação, em plantas de *Nicotiana benthamiana*, por meio de inoculações sucessivas via extrato foliar tamponado, utilizando folhas de *N. benthamiana* com sintomas de infecção pelo TCMV-[MG-Ig1] maceradas em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 8,0, contendo sulfito de sódio a 0,1% (p/v).

#### 3.2. Caracterização molecular do TCMV-[MG-Ig1]

A caracterização molecular consistiu no sequenciamento completo dos componentes A e B do TCMV-[MG-Ig1]. O DNA-B completo foi clonado por Ambrozevicius (1999), gerando o clone pTCMV-[MG-Ig1]-B. Para a clonagem do DNA-A foi empregado o método de clonagem via amplificação por PCR utilizando oligonucleotídeos sobrepostos (Patel et al., 1993). O molde para amplificação consistiu na forma replicativa (RF) extraída a partir de plantas infectadas de acordo com o procedimento de Gilbertson et al. (1991a).

### 3.2.1. Amplificação do DNA-A completo via PCR utilizando oligonucleotídeos sobrepostos

Para a obtenção de um produto de PCR correspondente ao DNA-A completo do TCMV-[MG-Ig1] foram sintetizados dois oligonucleotídeos sobrepostos (5'-G-A-C-A-C-G-C-T-C-G-A-G-C-A-G-G-A-G-T-T-A-G-G-C-C-A-C-G-G-T-3' e 3'-C-C-C-C-G-C-A-A-T-T-A-T-C-A-A-G-A-G-G-A-G-C-T-C-G-A-C-G-G-A-5', sítios para *Xho* I sublinhados) com base em seqüências parciais previamente obtidas (Ambrozevicius, 1999).

A reação de PCR foi preparada em um volume total de 100 µl, contendo Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 75 mM, mistura de dNTPs a 4 mM, 10 mM de cada oligonucleotídeo, 1 unidade de DNA polimerase e 2 µl de RF diluído 1:50. Foram realizados 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 5 minutos. Para amplificação foram testadas as enzimas *Taq* DNA polimerase e *Pfu* Turbo DNA polimerase (GibcoBRL), já que esta última possui mecanismo de correção de nucleotídeos incorporados erroneamente, permitindo que a cópia obtida seja mais fiel à fita molde do que aquela obtida com a *Taq* DNA polimerase. 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 uma banda com aproximadamente 2.600 nt, correspondente ao DNA-A completo do TCMV.

O DNA-A amplificado via PCR foi submetido à digestão parcial com a enzima *Xho* I, a 37°C por 15 minutos. Os produtos da digestão parcial foram separados por eletroforese em gel de agarose (0,9%) e a banda correspondente ao DNA-A foi cortada do gel e purificada utilizando-se o kit "Sephaglass BandPrep" (Amersham Pharmacia).

### 3.2.2. Transformação de *Escherichia coli*

O plasmídeo vetor pBLUESCRIPT II KS+ (pKS+, Stratagene) foi digerido com a enzima *Xho* I e defosforilado utilizando-se a enzima fosfatase alcalina. Uma alíquota do vetor digerido e defosforilado foi analisada por eletroforese em gel de agarose (0,9%), a fim de verificar a sua concentração e determinar o volume a ser utilizado na reação de ligação. Para a reação de ligação foram utilizadas proporções 1:3, 1:5 e 1:7 (vetor:inserto).

Células competentes de *E. coli* foram transformadas pelo método do choque térmico e plaqueadas em meio 2×YT (Sambrook et al., 1989) com ampicilina (100 mg/ml). As colônias recombinantes foram identificadas e transferidas para meio 2×YT líquido com ampicilina (10 mg/ml) e incubadas a 37°C durante 12 horas a 250 rpm. Os plasmídeos extraídos dessas

culturas (Sambrook et al., 1989) foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose (0,9%) a fim de verificar a presença de bandas com aproximadamente 6.000 nt, correspondentes ao DNA plasmidial contendo o inserto viral. A clonagem foi constatada por meio de digestão enzimática com a mesma enzima utilizada para a clonagem, a fim de verificar se o inserto realmente possuía o tamanho correspondente ao componente genômico viral.

### **3.2.3. Sequenciamento**

Os plasmídeos recombinantes foram sequenciados a fim de comprovar a origem viral dos insertos. Para realizar o sequenciamento do genoma, este foi sub-clonado em fragmentos menores. A reação de sequenciamento foi realizada com o kit “BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (Perkin Elmer), em um volume final de 20 µl, contendo o oligonucleotídeo M13 reverso a 10 mM e 500 ng do DNA viral. A reação foi submetida a 25 ciclos de desnaturação a 96°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos, e analisada em um sequenciador automático ABI 310 (Applied Biosystems). Devido ao tamanho dos componentes genômicos virais, uma série de subclones sobrepostos foram obtidos para permitir o sequenciamento do genoma completo. As seqüências foram analisadas com auxílio dos programas GCG (Devereux et al., 1987) e BLAST *n* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)).

### **3.3. Análise filogenética**

As seqüências de nucleotídeos completas dos componentes A e B e a seqüência de aminoácidos da proteína Rep foram comparadas às seqüências de outros begomovírus (Quadro 1). As seqüências foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal W ([www.ebi.ac.uk/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/clustalw)). Árvores filogenéticas foram preparadas utilizando-se o programa MEGA ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)).

**Quadro 1.** Sequências de begomovírus utilizadas para a análise filogenética.

<b>Espécie</b>	<b>Referência</b>	<b>Nº de acesso no GenBank</b>	
<i>African cassava mosaic virus</i> (ACMV)	Fondong et al. (2000)	AF112352 <sup>a</sup>	AF112353 <sup>b</sup>
<i>Abutilon mosaic virus</i> (AbMV)	Frischmuth et al. (1990)	X15584 <sup>a</sup>	X15584 <sup>b</sup>
<i>Bean golden mosaic virus</i> (BGMV)	Gilbertson et al. 1991a)	M88686 <sup>a</sup>	M88687 <sup>b</sup>
<i>Bean golden yellow mosaic virus</i> (BGYMV)	Gilbertson et al. (1991a)	M91604 <sup>a</sup>	M 91605 <sup>b</sup>
<i>Chino del tomate virus</i> (CdTV)	Brown e Nelson (1988)	AF226665 <sup>a</sup>	AF226666 <sup>b</sup>
<i>Tomato golden mosaic virus</i> (TGMV)	Hamilton et al. (1984)	K01029 <sup>a</sup>	K02030 <sup>b</sup>
<i>Tomato rugose mosaic virus</i> (TRMV)	Fernandes et al. (2001)	NC002555 <sup>a</sup>	NC002556 <sup>b</sup>
<i>Tomato mottle virus</i> (ToMoV)	Abouزيد et al. (1992)	LI4460 <sup>a</sup>	LI4461 <sup>b</sup>
<i>Tomato leaf crumple virus</i> (TLCrV)	Jiang et al. (1998)	AF101476 <sup>a</sup>	AF101478 <sup>b</sup>
<i>Tomato cholotic mottle virus</i> (TCMV-[MG-Be1])	Galvão et al. (1998)	AY090557 <sup>a</sup>	
<i>Tomato yellow mottle virus</i> (TYMoV)	Galvão et al. (1998)	AY090556 <sup>b</sup>	
<i>Potato yellow mosaic virus</i> (PYMV)	Contis et al. (1991)	D00941 <sup>b</sup>	
<i>Sida golden mosaic virus</i> (SiGMV)	Höfer et al. (1997)	X99550 <sup>a</sup>	X99551 <sup>b</sup>
<i>Sida yellow mosaic virus</i> (SYMV)	Galvão et al. (1998)	AY090558 <sup>a</sup>	
<i>Sida mottle virus</i> (SMoV)	Galvão et al. (1998)	AY090555 <sup>a</sup>	

<sup>a</sup>: DNA-A; <sup>b</sup>: DNA-B

### 3.4. Estudos de pseudo-recombinação

Cerca de 10 µg de cada componente genômico foram misturados a 50 µl de uma solução (60 mg/ml) de micropartículas de tungstênio, 50 µl de CaCl<sub>2</sub> 2,5 M e 20 µl de espermidina 0,1 M, e mantidos sob agitação constante por 10 min. Em seguida a solução foi lavada com etanol absoluto, e o DNA precipitado junto às micropartículas de tungstênio foi transferido para quatro membranas carreadoras. As plantas foram inoculadas de acordo com o método de Aragão et al. (1996) e mantidas em casa de vegetação. O diagnóstico da infecção foi realizado por meio de observação visual de sintomas e confirmado via PCR, utilizando-se oligonucleotídeos universais para begomovírus.

Nos estudos de pseudo-recombinação foram misturados componentes virais clonados em uma cópia e meia dos isolados TCMV-[BA-Se1] (Ribeiro et al., 2002), TRMV-[MG-Ub1] (Fernandes, 2001), TGMV (Fontes et al., 1994b), TCMV-[MG-Be1]-A (Machado et al., 2001) e TYMoV-B (Galvão et al., 2000) provenientes de tomateiro, e componentes A de

SYMV e SMOV (Fernandes, 1999), provenientes de *Sida rhombifolia*. Foram inoculadas 12 plantas de *Nicotiana benthamiana* para cada combinação obtida. O diagnóstico da infecção foi confirmado via PCR utilizando-se oligonucleotídeos universais para o gênero *Begomovirus* e específicos para as diferentes espécies virais inoculadas. As combinações utilizadas estão listadas no Quadro 2.

**Quadro 2.** Combinações genômicas utilizadas no experimento de pseudo-recombinação.

	TRMV-A	TRMV-B	TCMV-[BA-Se1]-A	TCMV-[BA-Se1]-B	TCMV-[MG-Be1]-A	TYMoV-B	TGMV-A	TGMV-B	SMoV-A	SYMV-A
TRMV-A	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
TRMV-B	X	--	--	--	--	--	--	--	--	--
TCMV-[BA-Se1]-A		X	--	--	--	--	--	--	--	--
TCMV-[BA-Se1]-B	X		X	--	--	--	--	--	--	--
TCMV-[MG-Be1]-A		X		X	--	--	--	--	--	--
TYMoV-B	X		X			--	--	--	--	--
TGMV-A		X		X			--	--	--	--
TGMV-B	X		X				X	--	--	--
SMoV-A		X		X					--	--
SYMV-A		X		X						--

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

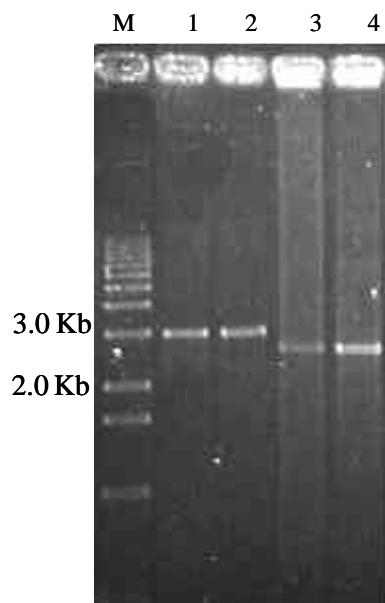
### 4.1. Caracterização molecular do TCMV-[MG-Ig1]

#### 4.1.1. Clonagem molecular dos componentes genômicos

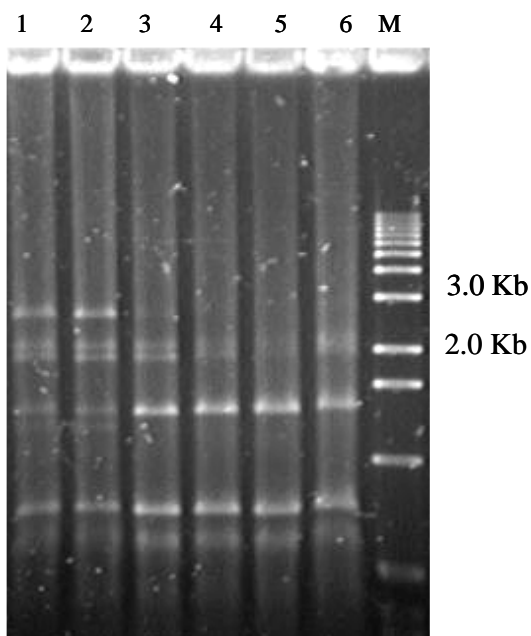
Com base na seqüência parcial do DNA-A foram sintetizados dois oligonucleotídeos sobrepostos para amplificação via PCR do componente completo. A amplificação foi comprovada pela observação de uma banda com aproximadamente 2.600 nt no gel de agarose (Figura 2). Os sítios de enzimas de restrição presentes nos oligonucleotídeos foram utilizados para a clonagem no vetor previamente digerido com a mesma enzima. Após a amplificação do DNA-A, este foi digerido com a enzima *Xho* I. O DNA-A possui mais de um sítio de clivagem para a enzima, gerando inúmeros fragmentos após a digestão enzimática. Foi realizada então uma digestão parcial, testando-se diferentes tempos de digestão: 10, 15, 20, 25, 30 e 35 minutos (Figura 3). A digestão por 15 minutos apresentou melhor resultado, pois a banda de 2.600 nt correspondente ao componente A linearizado estava presente (Figura 3, linha 2). O aumento do tempo de digestão acima de 15 minutos levou ao desaparecimento da banda de 2.600 nt (Figura 3, linhas 3-6).

Após a digestão parcial do DNA-A com *Xho* I, o fragmento correspondente ao componente completo foi purificado diretamente do gel de agarose e utilizado para ligação ao vetor pKS+ digerido com a mesma enzima.

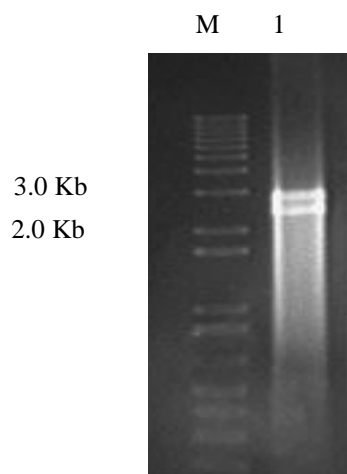
Para confirmação da clonagem, os plasmídeos recombinantes foram digeridos com as enzimas *Sma* I e *Kpn* I, que não hidrolisam o genoma viral, mas cujos sítios flanqueiam o sítio de *Xho* I no vetor, liberando assim o DNA-A clonado no sítio de *Xho* I (Figura 4). O clone correspondente ao DNA-A completo do TCMV foi denominado pTCMV-[MG-Ig1]-A.



**Figura 2.** Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) do vetor pKS+ utilizado para clonagem, e dos componentes A e B do TCMV-[MG-Ig1] amplificados por PCR utilizando-se oligonucleotídeos sobrepostos. **M**, marcador de peso molecular (“1kb DNA ladder”); **1**, pKS+ digerido com *Xho* I; **2**, pKS+ digerido com *EcoR* I; **3**, DNA-A do TCMV-[MG-Ig1] amplificado via PCR; **4**, DNA-B do TCMV-[MG-Ig1] amplificado via PCR.



**Figura 3.** Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) de fragmentos do DNA-A do TCMV-[MG-Ig1], amplificados via PCR e digeridos parcialmente com a enzima *Xho* I, em diferentes tempos de digestão. **M**, marcador de peso molecular (“1kb DNA ladder”); **1-6**, digestão por 10, 15, 20, 25, 30 e 35 minutos, respectivamente.



**Figura 4.** Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) do plasmídeo recombinante contendo o DNA-A completo do TCMV-[MG-Ig1], purificado e digerido com *Sma* I e *Kpn* I. **M**, marcador de peso molecular (“1kb DNA ladder”); **1**, plasmídeo digerido com *Sma* I e *Kpn* I.

#### 4.1.2. Sequenciamento do TCMV-[MG-Ig1] e análise comparativa de seqüências

Para o sequenciamento total do genoma viral foi adotada a estratégia de produção de sub-clones a partir dos clones pTCMV-[MG-Ig1]-A e pTCMV-[MG-Ig1]-B.

Os sub-clones de pTCMV-[MG-Ig1]-A foram obtidos por meio da digestão desse plasmídeo com a enzima *Xho* I, já que esta apresenta sítios de reconhecimento no DNA-A. Desta digestão foram liberados fragmentos de 2.000, 1.400 e 800 nt (Figura 3, linhas 4-6). A Figura 5A ilustra a disposição dos sub-clones em relação ao genoma completo. Com esta estratégia foi possível obter a seqüência completa do DNA A, que possui 2.623 nt e é apresentada na Figura 6.

Para a obtenção dos sub-clones de pTCMV-[MG-Ig1]-B foram utilizadas as enzimas *Sal* I, *EcoR* V e *Bam*H I. A digestão com *Sal* I liberou um fragmento de aproximadamente 1.100 nt, permanecendo um fragmento de 1.500 nt ligado ao vetor, que foi recircularizado. A digestão com *EcoR* V liberou dois fragmentos de aproximadamente 850 e 650 nt, permanecendo um fragmento de 1.100 nt ligado ao vetor, que foi recircularizado. Por fim, a

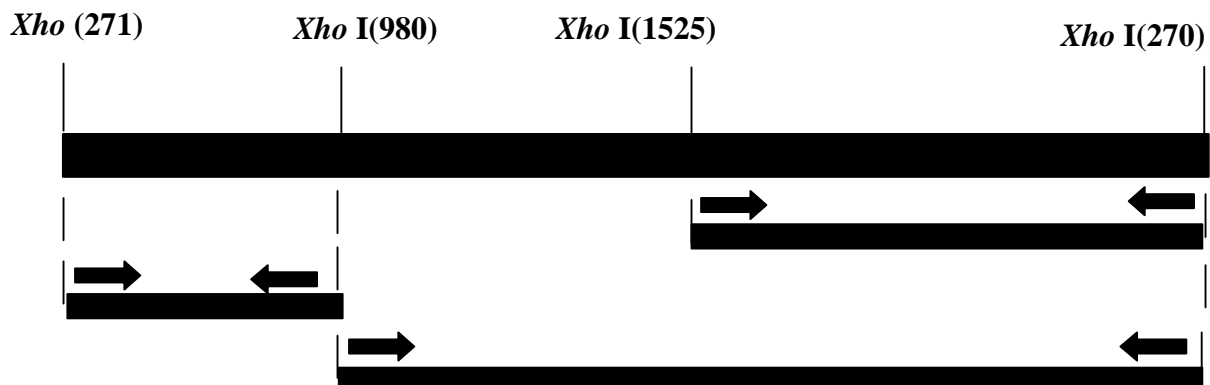
digestão com *Bam*H I liberou um fragmento de aproximadamente 1.500 nt, permanecendo um fragmento de 1.100 nt ligado ao vetor, que foi recircularizado. A Figura 5B ilustra a disposição dos sub-clones em relação ao DNA-B. Com esta estratégia foi possível obter a sequência completa do DNA-B, que possui 2.575 nt e é apresentada na Figura 7.

A análise comparativa das seqüências de nucleotídeos dos DNAs -A e -B, além da seqüência de aminoácidos das proteínas Rep e CP (Quadro 3), revelaram que o DNA-A possui alta homologia (95%) com o isolado TCMV-[MG-Be1], caracterizado por Machado et al. (2001), e também (92%) com o isolado TCMV-[BA-Se1], proveniente da Bahia, caracterizado por Ribeiro et al. (2002). A homologia é inferior a 85% com o restante das espécies comparadas. Já o DNA B possui maior homologia (86%) com o isolado TCMV-[BA-Se1]. A homologia com as outras espécies comparadas foi inferior a 73%. Ressalte-se que não há seqüência disponível para o DNA-B do isolado TCMV-[MG-Be1].

De modo geral, a homologia entre a seqüência de aminoácidos da CP também foi elevada para outras espécies, como o TGMV (94%) e TRMV (94%), não sendo menor que 80% para as espécies de geminivírus presentes no continente americano. Isto é até certo ponto esperado, considerando-se que o gene *cp* é o mais conservado entre os begomovírus. Já a homologia da seqüência de aminoácidos da proteína Rep foi inferior a 81% para qualquer outra espécie de begomovírus comparada. Os resultados indicam que o TCMV-[MG-Ig1] possui maior homologia (acima de 90%) com os isolados TCMV-[MG-Be1] e TCMV-[BA-Se1], consistindo assim em um isolado dessa espécie (*Tomato chlorotic mottle virus*), visto que de acordo com as regras de taxonomia adotadas pelo ICTV (Van Regenmortel et al., 2000), isolados de begomovírus com homologia acima de 90% para a seqüência completa do DNA-A podem ser considerados como pertencentes à mesma espécie.

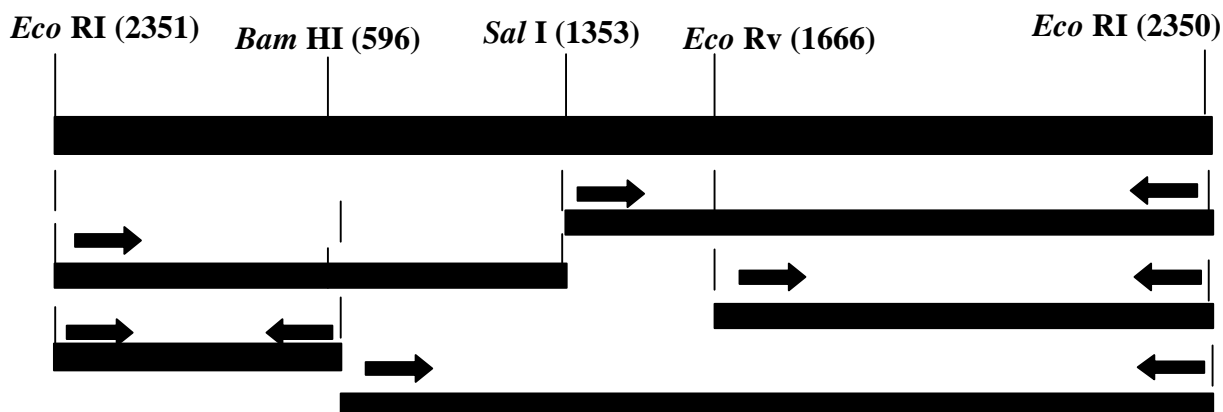
A

### DNA A



B

### DNA B



**Figura 5.** Representação esquemática dos sub-clones obtidos para o sequenciamento do genoma completo do TCMV-[MG-Ig1]. **A.** Posição dos sub-clones obtidos a partir do clone pTCMV-[MG-Ig1]-A. **B.** Posição dos sub-clones obtidos a partir do clone pTCMV-[MG-Ig1]-B. As setas indicam o sentido da extensão nas reações de sequenciamento realizadas a partir dos sub-clones.

**AC**CGGATGGCCGCGCGATTNTTTTTAAGGCCCATTCAGTTTGGGCCGCTCTTTTGGGCCTTCACCTTTAATTTTAT  
 TGATAGTAAATTTGGCCCAATCATGATGCATTTGACAAGCTAAGATATTTACAACACTTAACGCCCAAGTTGCA  
 TAACGGCTATAAATTAACGTGGTAGTGTCTGTTAACTTTAATTCAAAATGCCTAAGCGCGATGCCCATGGCGCC  
 ACATGTCAAGTACAGTTAAGATTAGCCGGGGCTTTAATAGTTCTC**CTCGAG**CAGGAGTTGGGCCCCCGTCTAATA  
 AGGCCTCTGACTGGGTAAACAGGCCCATGTACAGAAAGCCCTGGATATACCGGATTTACAGAACCCCGATGTTT  
 CAAGGGGCTGTGAAGGCCCATGTAAAGTCCAATCGTTTTGAACAGCGTCACGATATCTCCCATACTGGTAAAGTGA  
 TGTGTGTCTCGGATGTCACTCGTGGTAACGGTATTACACACCGTGTGGGTAAGCGTTTTCTGTGTTAAGTCTGTGT  
 ATATTCTTGGTAAGATATGGATGGATGAGAACATCAAGTTGAAGAACCACACAAAACAGTGCCATGTTTTGGTTGG  
 TGAGGGACCGTAGACCGTATGGTACCCCAATGGATTTTGGCCAGGTGTTAAACATGTTGACAACGAGCCTAGCA  
 CTGCCACTGTGAAAAACGATCTTCGTGATCGTTTTCAAGTTATGCACAAGTTCTATGCTAAGGTTACTGGTGGAC  
 AATACGCAAGCAACGAGCAGGCGCTGGTCAAGCGGTTCTGGAAAGTCAACAATCATGTCGTCTTAAACCATCAAG  
 AAGCCGGAAGTACGATAAACATACGGACAACGCCCTGTTATTGTATATGGCATGTACTCATGCCTCAAACGCCG  
 TGTATGCAACTTTAAAAATTCGGATCTATTTTTATGATTTCGATAACAAATTAATTAATTTGAATTTTATTGAAT  
 GATTCTCGAGTACAGCATTTACATATTGTTTGTCTGTTGCGAATCGAACAGCTCTAATTACATTATTAATTGAAA  
 TAACGCCTAGCTGATCAATATACAACATTAGTAAATATTTAAATCTATTTAAATATGTCATCCCAGAAGCTCTCA  
 GGGATGTGCTCCAGATTTGGAAGTTGAGATAAGCCTTGTGAAGACCCAATACTCTCCTCATGTTGTGGTTGAACC  
 GGATATGGACGTGGTAGACTCTGGTCCTCGTGTATAGTATGTCCTCGACTTTGTACATCTTGAAATAAAGGGGAT  
 TTGATATTTCCCAAATATACACGCCATTCTCTGCCTGATGTGCAGTGTAGAGTTCCCTGTGCGTGAATCCATGT  
 CCTGCGCAATCAATGTGTACGAAATTGGAGCACCCGCACTGCAAATCAATTCGTCTTCTTCGTATAGCTCTCTTC  
 TTTACAGCCCCGATGTTGAACTTTGATAGAGGGGGGAGTTGAGAAAGATGAATGTGCATTGTGCTTTGTCCAAGT  
 ATCTAATGCTGAGTTTTGATCCTTCTCGAGGAAACATTAATAGCTGGCCCCCTTCGCCAGGATTCGAAAGCACGA  
 TGCATGGGATAACCACCTTTAATTTGAACCGGCTTTCCGTATTTACAGTTTGATTGCCAATCCTTTTGGGCCCCAA  
 TCAAGTCTTTCTGTGCTTTAACTTTAGATAGTGCGGTGCGACATCATCAATGACGTTATACTGCACATCGTTTTG  
 AGTAGACCTTTGAATTGAAATCGAGGTGACCACTCAAGTAATTATGGGACCTAATGCACGTGCCACATTGTTTT  
 TGCCACTTCGAGAATCACCTCGATTATTATACTGATAGGTCTCTCCGGCCGCGCAGCGGCATCTCTCCCGAAAT  
 AGTCATCTACCCAATCTTGCATCTCGACAGGCACGTTAGTGAACGACGAGAGGGGAAACGGAGGAACCCAAGGTT  
 CTGGAGCCTTTGCGAAAATACGCTCTAAATTTGACCTAATGTTATGATGTTGAAGCACGAAATCTTTGGGTTGTT  
 CCTCCCTTAATATATTGAGTGCTTCCATGACAGATCCTGCGTTGAGAACCTTGGCGTACGTGTGCTTGGCAGATT  
 GCTGACCTCCTCTAGCTGATCTGCCATCGATCTGGAAAACCTCATGATCACTGAAGTCTCCGTCTTCTCCACGT  
 ATGCCTTGACATCTGACGAGCTCTTAGCTCCCTGAATGTTGCGGATGGAAATGTGCTGACCTTGTGGGGATACAA  
 GGTGCAATAATCTGTTGTTTGTGACAGCAATTTCCCTTCGAACTGTATGAGGACGTGCAAAATGAGGTTGCCCAT  
 CTTTCATGTAATTTCTCTGGCAACACGAATGAACAACCTTATTAACAGGTATTTGTATGGCTAATAATTTGGGAAAGT  
 CTTCTTCTTTGGAAAGAGAACAGTGTGGATATGTCAGAAAATAATTTTTGGAAATTTACTCGGAAATGTTTAGGCG  
 GTGGCATATTTGAAATAATAGTTGGGCACCGATTGGGGACTCTTAAACTTGCTCTAGCAATTTGGGGACTGGGGT  
 CCTATATATACTAGAACCCTCTATAGGACTTTCAATCTCGTTCACACACGTGGCGGCCATCCGATA**TAATATT**

**Figura 6.** Sequência completa do DNA-A do TCMV-[MG-Ig1]. O nonanucleotídeo destacado em vermelho corresponde ao sítio de clivagem da proteína Rep (origem de replicação), conservado em todos os geminivírus. O nucleotídeo 1 corresponde ao primeiro nucleotídeo após o sítio de clivagem. Em negrito está representado o sítio de restrição da enzima *Xho* I utilizado na clonagem.

ACCGGATGGCCGCGCGATCTTTCTCTCTCTTTAATCCTGTCCGTCACGTTTAATGAATTTAGTTGAGCGCG  
 AATTTGAAGTCCGTGAATTGTGTTGAGCGCTTTATTTTAGTTCCGCTATCGGATGGCCGCCACGTGTATTAATAT  
 AAGACCGTTGAATTAATATGATAAGCGGAACCTTTCTCGAATTTTCGATTGTGTTTTTTGTGCTGATTAATTATG  
 AAATTCGACCGTTAGATTGCACATGATAGTGACGTATTGGTCATCGTGATTGAATAATGTGTCATTAGTACAAGT  
 ATTTGTTTTGGGGTGAATCATGAAACATATGTAACGTGGACCAGTTAAATATTGACTGTATAAAACAAGATAACC  
 CATTGATGCAATTACTACTATCTATATAATGCGATTGATATTGATAATTTTAAAAACATCCAATAAGAAATTTTGAA  
 CATGATTTTAATAATAATAAGCGTCGTTGGTTGTCCACCAACCGTCGTAATTTTCGTGCGATATTCTACGTTTAA  
 AAGATCACATTCTGTGATACGCAATGATGGGAAACGTCCATTAGGTATTTCAACAAAACCAGCTCTCATAGGATC  
 CACGAAAACCAATATGGGCCTGACTTCGTATTGGGCCATAACTCAGCGCTGTCCACTTTTATAACTTACCCGACT  
 CTTGGTAAAACCTGAGCCCAACCGTACTAAATCATAACATTAAGTTGAAACGTCTACGTTTAAAGGTACTGTTAAG  
 ATAGAACGTGTTCTGTGCTGATTTGAACATGAACGGAATGCCTGCTAAGATAGAGGGCGTATTTTCTCTGGTTATT  
 GTTGTGATCGTAAACCTCATTTGAGCCCTTCCGGCAGTCTGTACACATTCGATGAGTTATTTGGTGTCTAGGATC  
 CATAGCCATGGAAATTTACCGATAATCCCTTCTCTGAAGGATCGGTTTTACATACGTCATGTTGCTAAACGTGTC  
 TTGTCAGTGGAGAAGGATAGTAATATGATTGACGTTGAGGGGATTACAACACTGTCTAATAGGCGTTATAATTGC  
 TGGGCAAATTTTAGAGATTTTCGATCATGAATCATGTAATGGTGTATATGCTAACATAAGCAAGAATGCCCTATTA  
 GTTTATTATTGTTGGATGTGCGAAACAGTTTCCAAAGCATCTACATTTGTATCATTTGATCTCGATTATATTGGA  
 TAATTATACATATCAATTTGCAAATTATATATTTGATAAGTTAAAATATGTTAATAAAATGTCCTATTCTATTAA  
 ACATCAGGACAGCTTAATTTATTTTAAAGACTTTGGTTTCAGATGGAGTACAATTGGTATTGATACATTTCTTGA  
 CTGTCGACTTAACAATCTCATTTAATTGGGCCAACGATAAGGTAATGTTGGACTGCGTCTCTGTGCTGCAACGA  
 TTGACGCTGATTTCTCTGGGCTCTAGAATTAACGTGTCCAATCTGTTTCAGATCCTTATATGGATGTAGATCGTTGC  
 CCCGTTTCGGAGTCCACACATGAATTGCTGAGACCAATTGTAATTTCTGGATGCCACGACTCTCCAGGTTTAAATTT  
 CTATTGGGCAGTTAAGCCCAAATCTGGATGTGGAAGCGCATCTGACTAATTTCTCTCCCATGTGCCGTAACCCA  
 CATGAACAAAATCGATATCCTTATCTGAAAATTGCTTTCGACAATATTTTAACTGGTGGTGCCCCGAAAGGNATAT  
 CTACTGAGTGTTTTGTGTTGATAGTTTTAACTTGCCTTGAATTTGGCGAAATGGGTCTTTGGTGCACATTCG  
 TATCGCTAACCCGGTAGTATAATTTCCATGGAATTGGGTCTTTCAGTGAAAAGAATGACGACGAGAAAATAATGTA  
 AATCTATGTTACATCTAATTGGGAAGGTCCATGACGCTTGCAATGACTCGTTGTCCGTCATTTCTTTTGTGATGTA  
 TTTCTACTATGACAGATCCTGTGGCGTTTATTGGGACTTGTCTGTATTTCGATGACGCAATGATCTATTTTCA  
 TGCAGCTCCGACTAAGTTTAGCACTAATTTGAGATGCCGTAGATGGAAATGTAGAACAATTTTCAGTTAGATCAT  
 GAGACAATTGATATTCTCTCTTTGGGACTCAACATAATTTAAAAGCCGATACCTCCCTATTGGTTTACTCTTGA  
 GTAATATTATTTTTTTTCGCGCGTGCAGTTAGCTATTGACCTAATTTTCGATGTAAACGATATGAAACCACTAAG  
 AGAGATTTACTCTACTTGGGTGATTTCGTCTTACAGTCTTTTGTATTTTAAAACAAAATACTACTATCAGTCATAAT  
 TGACCAAACATAAATATCTGCCTAAGAACTTCTGAGTTTATAGAGGAAATACTTCTTAGCGACGTCGTTTTTTAAC  
 TGACTGCATCCTTGAAATTTAAGCAATGGCATATTTGTAATAATAGTTGGGCACCGATTGGGGTCTTCTCAAAC  
 TTAATAAGCAATTGGGGACTGGGGTCTTATATATACTAGAACCCTCTATAGAACTTTCAATCTCGTTCACAACA  
 CGTGGCGGCCATCCGATA**TAATATT**

**Figura 7.** Seqüência completa do DNA-B do TCMV-[MG-Ig1]. O nonanucleotídeo destacado em vermelho corresponde ao sítio de clivagem da proteína Rep (origem de replicação), conservado em todos os geminivírus. O nucleotídeo 1 corresponde ao primeiro nucleotídeo após o sítio de clivagem. Em negrito está representado o sítio de restrição da enzima *EcoR* I utilizado na clonagem.

**Quadro 3.** Porcentagens de homologia entre as seqüências de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) do TCMV-[MG-Ig1] e outros begomovírus.

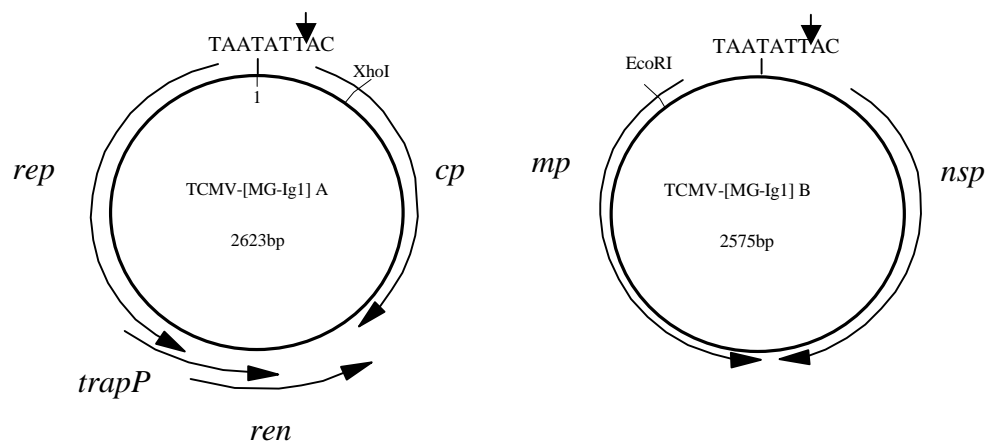
	DNA-A (nt)	DNA-B (nt)	Rep (aa)	CP (aa)
TCMV-[BA-Se1]	92%	81%	91%	94%
TCMV-[MG-Be1]-A	95%	-----	83%	96%
TYMoV-B	-----	73%	-----	-----
SYMV-A	74%	-----	70%	81%
SMoV-A	73%	-----	66%	88%
TRMV-[MG-Ub1]	85%	60%	72%	94%
TGMV	73%	60%	72%	94%
BGMV	75%	60%	72%	88%
SiGMV	76%	59%	80%	86%
CdTV	76%	61%	80%	87%
TLCrV	75%	60%	80%	91%
ToMoV	76%	61%	79%	86%
PYMV	76%	60%	74%	87%
AbMV	74%	58%	78%	84%
ACMV	57%	43%	67%	76%

Um outro critério adotado pelo ICTV para a delimitação de espécies de begomovírus é a capacidade de formação de pseudo-recombinantes. Considerando-se a homologia de apenas 72% entre as proteínas Rep do TCMV-[MG-Ig1] e TRMV, é pouco provável que esses vírus formem pseudo-recombinantes viáveis, consistindo dessa forma duas espécies distintas de begomovírus. Além disso, a homologia de seqüência entre o DNA-B do TCMV-[MG-Ig1] e outros begomovírus foi sempre inferior a 80%.

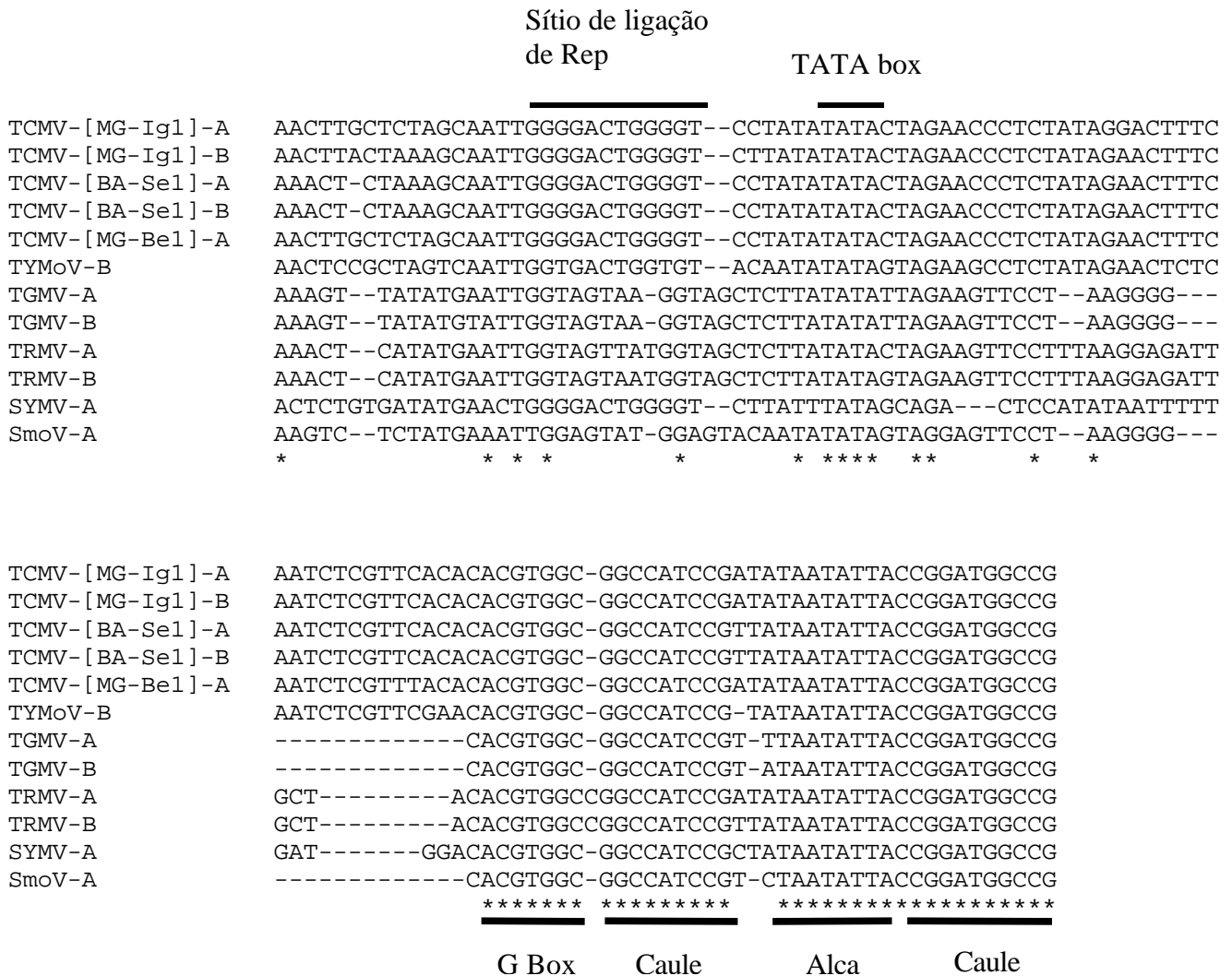
A análise das seqüências indica que o TCMV-[MG-Ig1] possui organização genômica semelhante à de outros begomovírus bissegmentados (Figura 8). No DNA-A foram identificadas as ORFs CP, com seqüência deduzida de 251 aminoácidos, na fita viral, e Rep, com 351 aminoácidos, Ren, com 132 aminoácidos, TrAP, com 129 aminoácidos e AC4, com 99 aminoácidos, todas na fita complementar. No DNA-B foram identificadas as ORFs NS, com 275 aminoácidos, na fita viral, e MP, com 293 aminoácidos, na fita complementar.

A seqüência de nucleotídeos da região comum, onde estão localizados os principais cis-elementos relacionados à replicação (Hanley-Bowdoin et al., 1999), foi alinhada com a de outras espécies de begomovírus (Figura 9). Pode-se constatar a presença dos cis-elementos

conservados entre as espécies, do sítio de ligação da proteína Rep, e da estrutura em forma de grampo que flanqueia o nonanucleotídeo TAATATT/AC clivado pela proteína Rep (origem de replicação). Além dos cis-elementos relacionados à replicação, foram identificados também o “G box” e a “TATA box”, também conservados em todos os begomovírus. A região comum de componentes virais cognatos possui seqüência praticamente idênticas, principalmente em relação à seqüência e posição dos cis-elementos. Entre as espécies do gênero begomovírus, a seqüência que dá origem a estrutura de grampo é idêntica, porém a seqüência do sítio de ligação da proteína Rep é variável, gerando especificidade, já que a Rep produzida pelo componente A de um vírus reconhecerá apenas os seus componentes A e B cognatos (Hanley-Bowdoin et al., 1999).



**Figura 8.** Organização genômica do TCMV-[MG-Ig1]. A região comum está representada pelos retângulos pretos, de onde se iniciam as ORFs nos sentidos viral (CP no DNA-A, NS no DNA-B) e complementar (Rep, Trap e Ren no DNA-A, MP no DNA-B). Os sítios de clonagem (*Xho* I para o DNA-A e *Eco*RI para o DNA-B) estão indicados.



**Figura 9.** Alinhamento das seqüências da origem de replicação dos DNAs -A e -B do TCMV-[MG-Ig1] e de outros begomovírus. Os cis-elementos associados à replicação estão destacados.

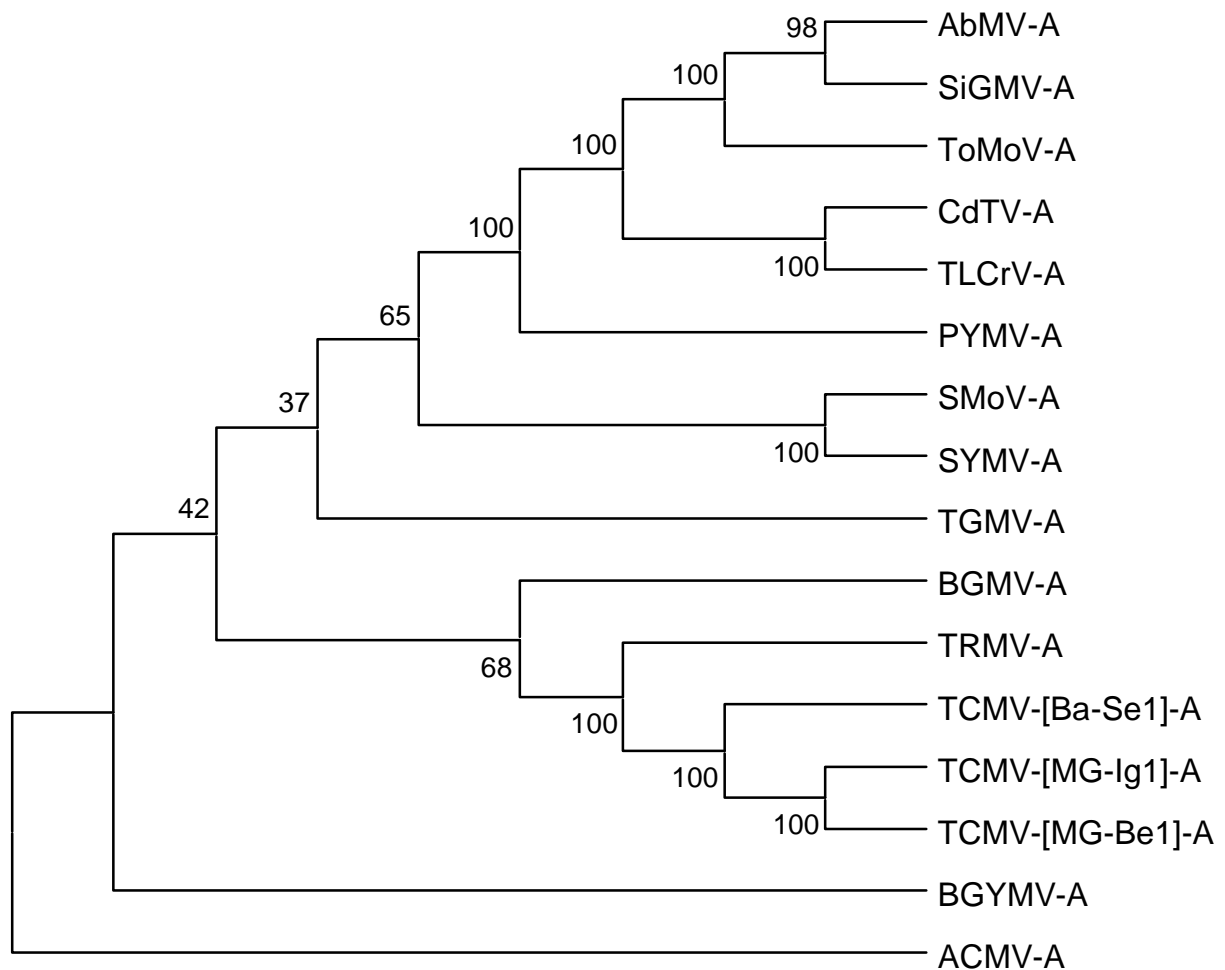
### 4.1.3. Análise filogenética

As seqüências dos genomas de diversas espécies de begomovírus foram utilizadas para a construção de árvores filogenéticas. A árvore filogenética baseada na seqüência de nucleotídeos do DNA-A (Figura 10) apresenta ramos distintos separando as espécies relatadas no Brasil, América Central e América do Norte. As espécies brasileiras foram subdivididas entre as que infectam plantas cultivadas (TCMV-[MG-Ig1], TCMV-[BA-Se1], TCMV-[MG-Be1], TRMV e BGMV) e plantas daninhas (SMoV e SYMV), com exceção do TGMV, que se agrupou com as espécies que infectam *Sida*. Verifica-se também que o TCMV-[MG-Ig1] agrupou-se com o TCMV-[MG-Be1] e TCMV-[BA-Se1], resultado que corresponde àquele apresentado no Quadro 3, no qual o TCMV-[MG-Ig1] apresentou maior homologia de seqüência com esses dois isolados.

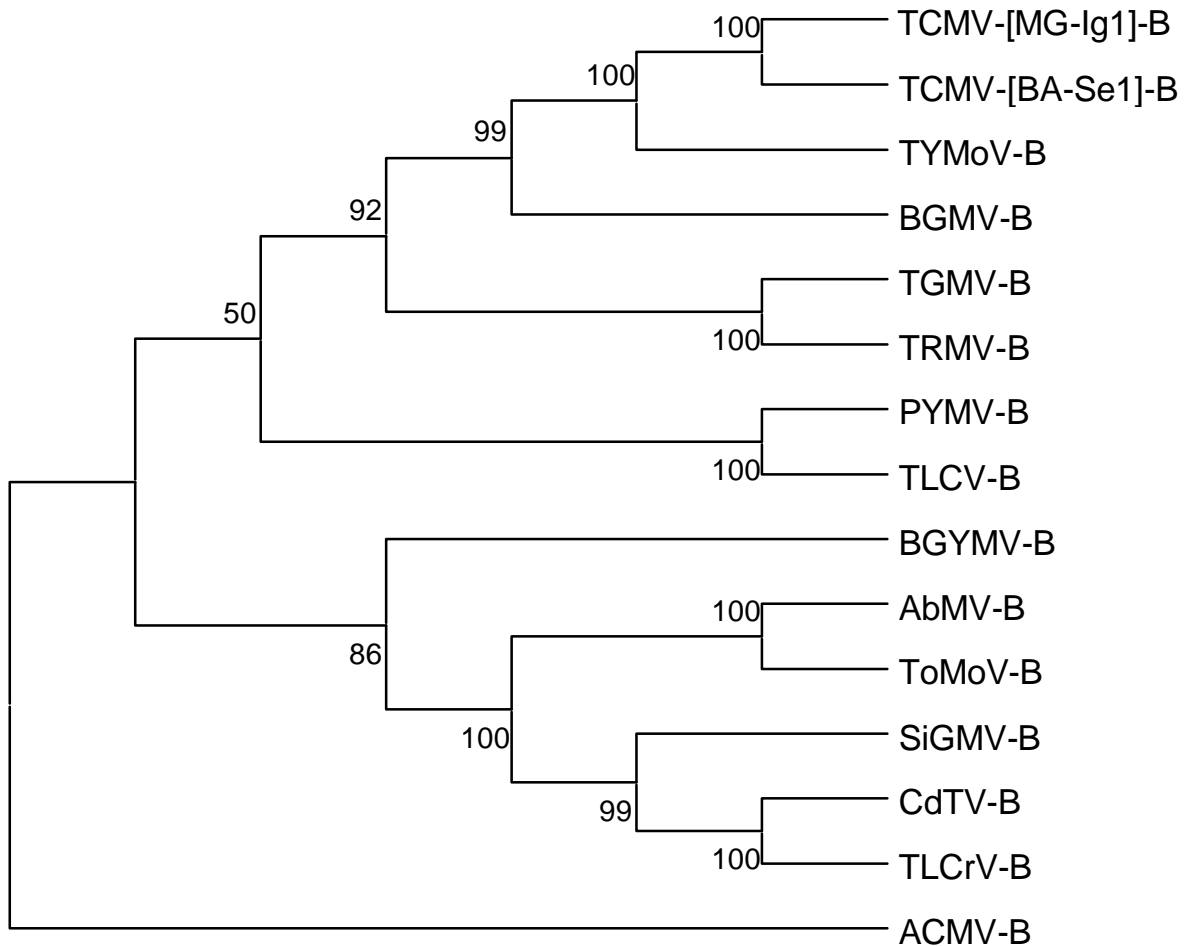
Resultado semelhante foi verificado na árvore baseada na seqüência de nucleotídeos do DNA-B (Figura 11). As espécies de ocorrência no Brasil foram agrupados em um ramo distinto das espécies relatadas nas Américas Central e do Norte.

A árvore baseada na seqüência de aminoácidos da proteína Rep (Figura 12) mostrou resultados consistentes com aqueles apresentados no Quadro 3, permanecendo o TCMV-[MG-Ig1] agrupado junto ao TCMV-[BA-Se1] e ao TCMV-[MG-Be1]. Entretanto, na filogenia da proteína Rep, o TCMV-[MG-Ig1] foi agrupado em um ramo mais próximo do TCMV-[BA-Se1] em relação ao TCMV-[MG-Be1], enquanto que na filogenia do DNA-A completo ocorreu o inverso. Não houve agrupamento das espécies em relação a sua região de ocorrência, refletindo provavelmente a menor conservação desta proteína entre as diferentes espécies, ao contrário da proteína capsidial, altamente conservada entre as espécies.

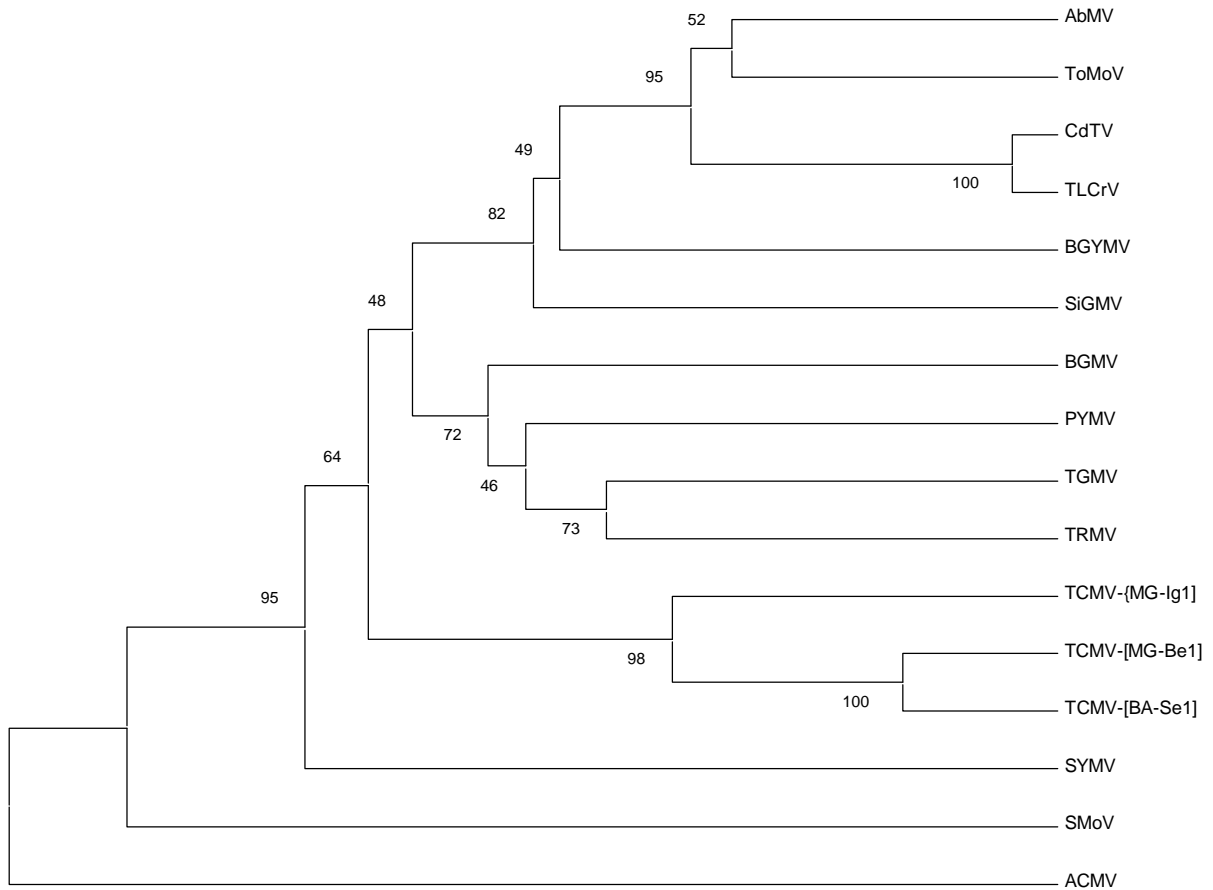
Os resultados da análise filogenética confirmam a classificação do TCMV-[MG-Ig1] como um isolado da espécie *Tomato chlorotic mottle virus*, do gênero *Begomovirus*. Apesar de possuir elevada homologia de seqüência e elevado relacionamento filogenético com o isolado TCMV-[MG-Be1], o TCMV-[MG-Ig1] é um begomovirus com genoma bissegmentado, necessitando de dois componentes genômicos (A e B) para causar infecção sistêmica, ao passo que o TCMV-[MG-Be1] é capaz de causar infecção sistêmica apenas com seu DNA-A (Machado, 2001).



**Figura 10.** Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento das seqüências de nucleotídeos do DNA-A de espécies de begomovírus relacionadas nas Américas. O alinhamento foi preparado com o programa Clustal W, e a árvore foi obtida pelo programa MEGA, utilizando-se o método de “bootstrap” com 2000 repetições. A escala horizontal indica a distância genética aproximada.



**Figura 11.** Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento das seqüências de nucleotídeos do DNA-B de espécies de begomovírus relacionadas nas Américas. O alinhamento foi preparado com o programa Clustal W, e a árvore foi obtida pelo programa MEGA, utilizando-se o método de “bootstrap” com 2000 repetições. A escala horizontal indica a distância genética aproximada.



**Figura 12.** Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína Rep de espécies de begomovírus relatadas nas Américas. O alinhamento e a árvore foram preparados com o programa DNAMAN. A árvore foi obtida utilizando-se o método de “bootstrap” com 2000 repetições. A escala horizontal indica a distância genética aproximada.

## 4.2. Estudos de pseudo-recombinação

A formação de pseudo-recombinantes viáveis é um indicativo de relacionamento taxonômico entre dois isolados de begomovírus. Considerando-se as diversas espécies de begomovírus relatadas recentemente infectando tomateiro e *Sida* em Minas Gerais (Ambrozevicius, 1999; Fernandes, 2001; Fernandes, 1999; Galvão, 2000; Machado, 2001), foram realizados experimentos com o objetivo de verificar a formação de pseudo-recombinantes entre os componentes genômicos desses vírus. Os resultados desses experimentos podem fornecer indícios acerca da origem evolutiva dos vírus detectados em tomateiro.

Todas as inoculações que produziram infecção sistêmica acarretaram em redução de crescimento associado a outras perturbações no tecido foliar, listadas no Quadro 4.

O pseudo-recombinante TRMV-A e TGMV-B induziu sintomas de infecção sistêmica, incluindo mosqueado e encarquilhamento foliar, em 100% das plantas de *N. benthamiana* inoculadas (Quadro 4, Figura 13A). O diagnóstico da infecção viral foi realizado via PCR a partir de folhas apicais (não inoculadas). O teste acusou a presença dos DNAs -A e -B (Figura 16). Resultado semelhante foi obtido na inoculação do pseudo-recombinante recíproco (TGMV-A e TRMV-B), que induziu sintomas semelhantes de infecção sistêmica em 100% das plantas inoculadas (Quadro 4, Figura 13B). O diagnóstico da infecção viral foi realizado da mesma forma (Figura 16). O pseudo-recombinante TRMV-A e TYMoV-B induziu sintomas sistêmicos, incluindo mosaico e encarquilhamento, em 92% das plantas inoculadas (Figura 13C), confirmado pela amplificação de fragmentos específicos dos DNAs -A e -B via PCR (Figura 16).

Apesar do DNA-A do TCMV-[MG-Be1] ser capaz de causar infecção sistêmica quando inoculado independentemente (Machado, 2001), esse componente formou um pseudo-recombinante viável com o DNA-B do TRMV, induzindo sintomas sistêmicos em 17% das plantas inoculadas (Quadro 4, Figura 13D). Ambos os componentes foram detectados nas folhas apicais (não inoculadas) (Figura 16, TCMV-[MG-Be1]-A + TRMV-B, linhas A e B), comprovando que a proteína Rep do TCMV-[MG-Be1] foi capaz de replicar o TRMV-B. A combinação SMoV-A e TRMV-B induziu sintomas sistêmicos em 33% das plantas inoculadas (Quadro 4, Figura 13E), porém o diagnóstico molecular detectou apenas a presença do DNA-A de SMoV nas folhas não inoculadas (Figura 16). Entretanto, houve a formação de pseudo-recombinante viável entre SYMV-A e TRMV-B, com sintomas sistêmicos em 42% das plantas inoculadas (Quadro 4, Figura 13F) e confirmação via PCR

(Figura 16). Esse resultado demonstra o relacionamento entre vírus isolados de plantas daninhas (SYMV) e cultivadas (TRMV), reforçando a hipótese de surgimento de novas espécies de begomovírus a partir da transferência de vírus existentes em plantas daninhas para o tomateiro pelo inseto vetor.

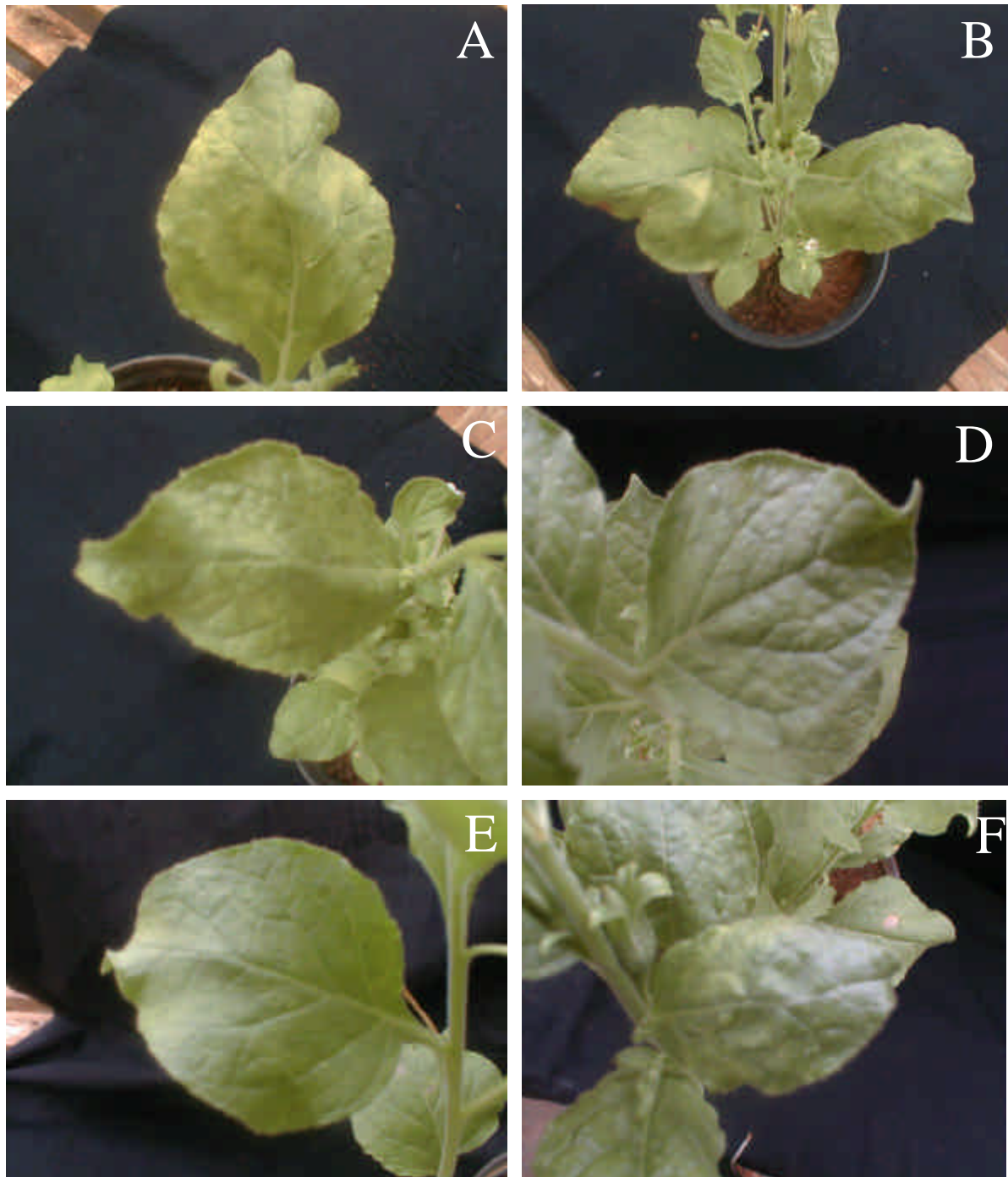
A inoculação em *N. benthamiana* com o pseudo-recombinante TCMV-[BA-Se1]-A e TGMV-B resultou em sintomas sistêmicos (mosaico e epinastia) em 67% das plantas inoculadas (Quadro 4, Figura 14A). A infecção viral dessas plantas foi confirmada via PCR (Figura 16). Interessantemente, o pseudo-recombinante TGMV-A e TCMV-[BA-Se1]-B induziu sintomas extremamente agressivos, incluindo mosaico e encarquilhamento severos, em 50% das plantas inoculadas (Quadro 4, Figura 14B), confirmando-se a infecção via PCR (Figura 16). Pseudo-recombinante viável foi formado entre TCMV-[BA-Se1]-A e TYMoV-B, que induziu sintomas de mosaico, encarquilhamento e epinastia em 75% das plantas inoculadas (Quadro 4, Figura 14C), confirmados via PCR (Figura 16). O SMOV-A formou um pseudo-recombinante viável com o TCMV-[BA-Se1]-B, induzindo amarelecimento das nervuras, mosaico e encarquilhamento em 50% das plantas inoculadas (Quadro 4, Figura 14D), confirmados via PCR (Figura 16). Sintomas de amarelecimento de nervuras, mosaico e encarquilhamento foram observados em 58% das plantas inoculadas com SYMV-A e TCMV-[BA-Se1]-B (Quadro 4, Figura 14E), e confirmados via PCR (Figura 16). Verifica-se assim que, da mesma forma que o TRMV, o TCMV-[BA-Se1] também é capaz de formar pseudo-recombinantes viáveis com componentes genômicos de vírus isolados a partir de plantas daninhas.

Os pseudo-recombinantes entre TRMV e TCMV-[BA-Se1] não foram viáveis, (Quadro 4), não induzindo sintomas sistêmicos nas plantas inoculadas (Figura 15A). O diagnóstico molecular confirmou o resultado (Figura 16). Da mesma forma, TCMV-[MG-Be1]-A e TCMV-[BA-Se1]-B não induziram sintomas sistêmicos (Quadro 4, Figura 14D), nem foram detectados via PCR (Figura 15), apesar do TCMV-[MG-Be1]-A induzir sintomas sistêmicos quando inoculado sozinho.

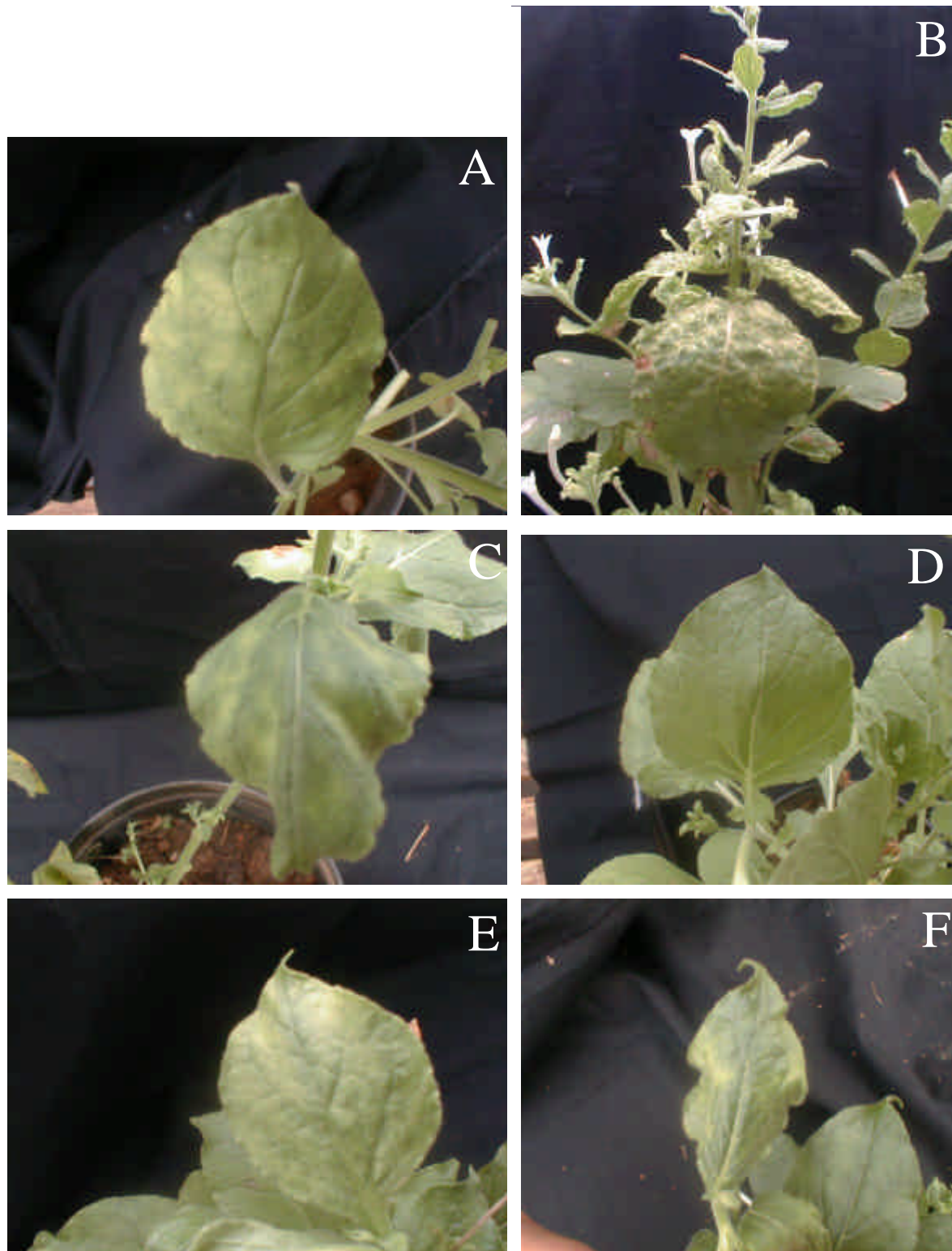
**Quadro 4.** Resultados da inoculação de pseudo-recombinantes entre begomovírus que infectam tomateiro e plantas daninhas.

<b>Pseudo-recombinante</b>	<b>Plantas infectadas</b>	<b>Sintomas*</b>
TRMV-A + TCMV-[BA-Se1]-B	0% (0/12)	(-)
TRMV-B + TCMV-[BA-Se1]-A	0% (0/12)	(-)
TRMV -A + TGMV -B	100% (12/12)	mos, enc, rc
TRMV-B + TGMV-A	100% (12/12)	mos, enc, rc
TRMV-A + TYMoV-B	92% (11/12)	mos, enc
TCMV-[MG-Be1]-A + TRMV-B	17% (2/12)	mq
SMoV-A + TRMV-B	33% (4/12)	mq
SYMV-A + TRMV-B	42% (5/12)	mos, enc
TCMV-[BA-Se1]-A + TGMV-B	67% (8/12)	mos, ep
TCMV-[BA-Se1]-B + TGMV-A	50% (6/12)	am-n, mos, enc, rc
TCMV-[BA-Se1]-A + TYMoV-B	75% (9/12)	mos, enc, ep
TCMV-[MG-Be1]-A + TCMV-[BA-Se1]-B	0% (0/12)	(-)
SMoV-A + TCMV-[BA-Se1]-B	50% (6/12)	am-n, mos, enc
SYMV-A + TCMV-[BA-Se1]-B	58% (7/12)	am-n, mos, enc
TCMV-[BA-Se1]-A + TCMV-[BA-Se1]-B	100% (12/12)	am-n, enc, rc
TRMV-A + TRMV-B	100% (12/12)	am-n, enc, rc
TGMV-A + TGMV-B	100% (12/12)	am-n, mos, enc, rc

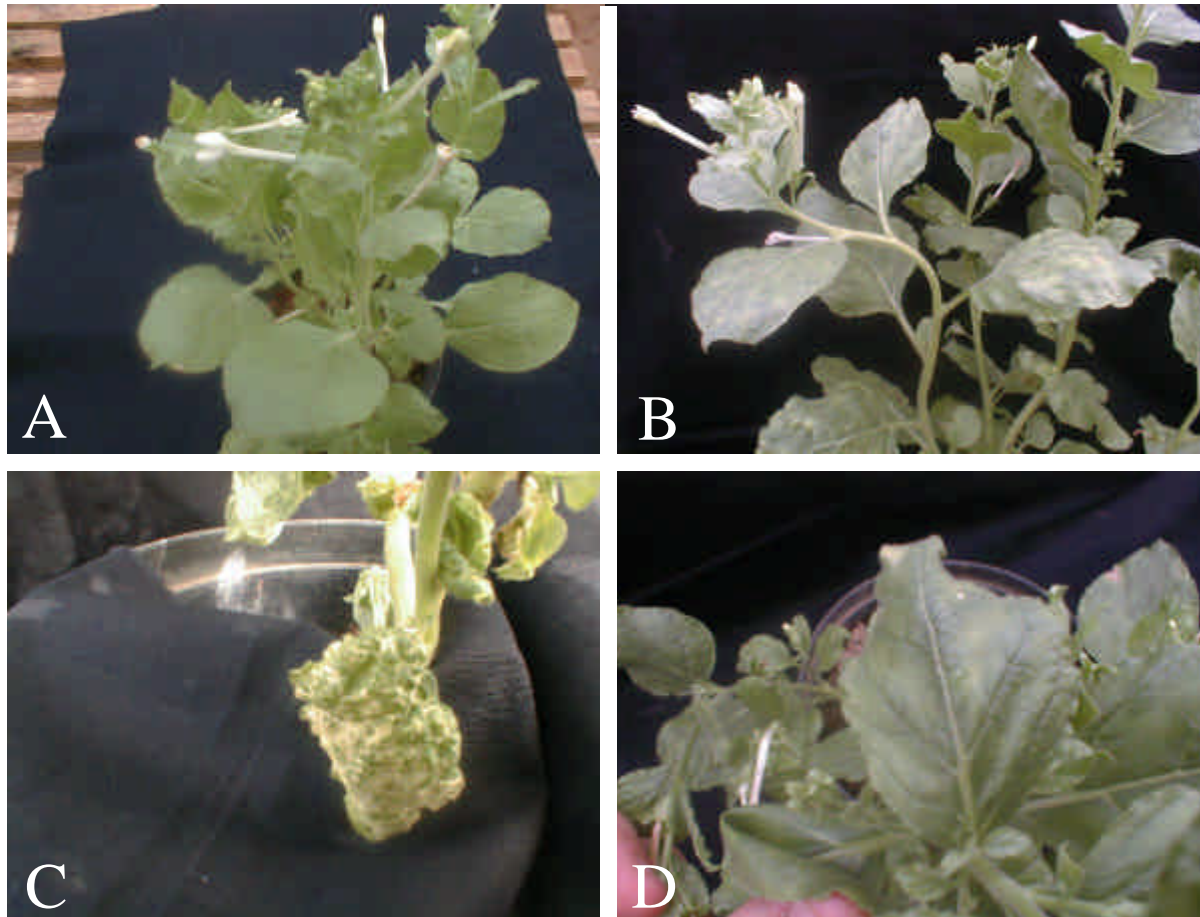
\* am-n, amarelecimento de nervuras; enc, encarquilhamento; ep, epinastia; mos, mosaico; mq, mosqueado; rc, redução do crescimento; (-), assintomática



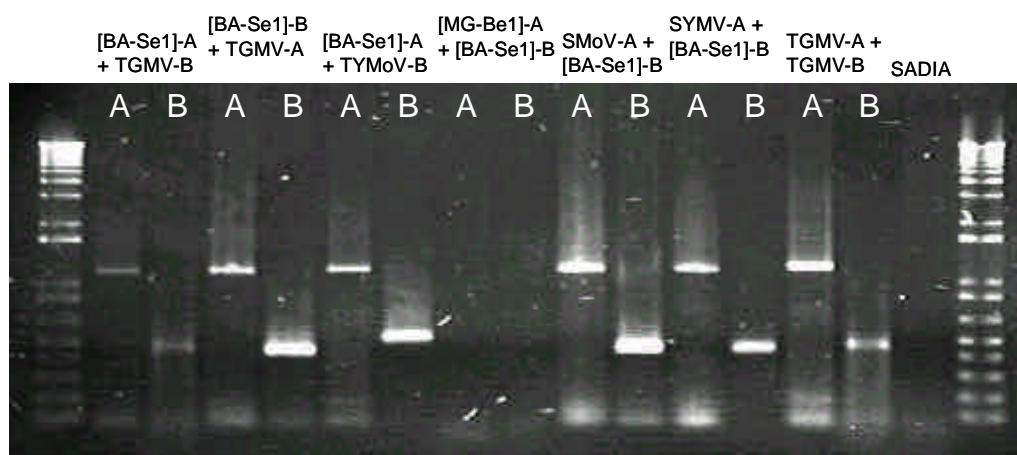
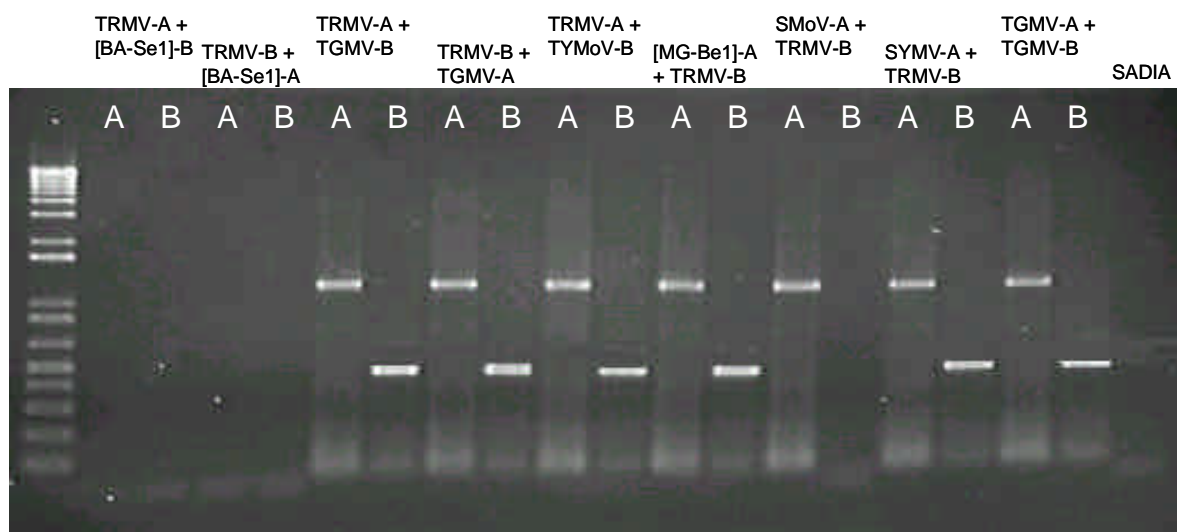
**Figura 13.** Sintomas observados em plantas de *N. benthamiana* inoculadas com os pseudo-recombinantes TRMV-A + TGMV-B (A), TRMV-B + TGMV-A (B), TRMV-A + TYMoV-B (C), TCMV-[MG-Be1]-A + TRMV-B (D), SMOV-A + TRMV-B (E) e SYMV-A + TRMV-B (F). As plantas foram avaliadas 24 dias após a inoculação.



**Figura 14.** Sintomas observados em plantas de *N. benthamiana* inoculadas com os pseudo-recombinantes TCMV-[BA-Se1]-A + TGMV-B (A), TCMV-[BA-Se1]-B + TGMV-A (B), TCMV-[BA-Se1]-A + TYMoV-B (C), TCMV-[MG-Be1]-A + TCMV-[BA-Se1]-B (D), SMoV-A + TCMV-[BA-Se1]-B (E) e SYMV-A + TCMV-[BA-Se1]-B (F). As plantas foram avaliadas 24 dias após a inoculação.



**Figura 15.** Ausência de sintomas observados em plantas de *N. benthamiana* inoculadas com os pseudo-recombinantes entre TRMV e TCMV-[BA-Se1] (A). Plantas sintomáticas foram observadas nas inoculações com TCMV-[BA-Se1]-A e -B (B), TGMV-A e -B (C) e TRMV-A e -B (D). As plantas foram avaliadas 24 dias após a inoculação.



**Figura 16.** Diagnóstico molecular da infecção pelos pseudo-recombinantes. DNA total extraído a partir das plantas inoculadas foi utilizado em reações de PCR utilizando oligonucleotídeos universais para begomovírus. M, marcador de peso molecular (“1 kb DNA ladder”).

A não formação de pseudo-recombinantes viáveis pode ser devido a pelo menos dois fatores. O primeiro é a natureza altamente específica da interação da proteína Rep com a origem de replicação (Fontes et al., 1994a e 1994b). O segundo seria a inabilidade dos produtos dos genes codificados pelo DNA-B (MP e NS) de mediar o movimento de um DNA-A heterólogo (Gilbertson et al., 1993). Além disso, a hipótese de fatores do hospedeiro estarem implicados neste fenômeno não pode ser descartada. A princípio a formação de pseudo-recombinantes viáveis está restrita a estirpes de uma mesma espécie (Stanley et al., 1985; Lazarowitz et al., 1991), contudo existem alguns relatos da ocorrência deste fenômeno entre espécies distintas, como ToMoV e BDMV (Gilbertson et al., 1993) e SiGMV-[Ho<sub>sv</sub>] e AbMV (Frischmuth et al., 2000b).

Embora a homologia de seqüência entre o TRMV e o TGMV seja baixa (78% para ambos o componente A) (Fernandes, 2001), as seqüências do sítio de ligação da proteína Rep desses dois vírus diferem em apenas um nucleotídeo (TRMV: GG TAGTTATGG; TGMV: GG TAGTAATGG) (Figura 8). Isto pode explicar a formação de pseudo-recombinantes viáveis entre esses vírus, pois estaria havendo a trans-replicação do DNA B heterólogo. A habilidade das proteínas MP e NS em mediar o movimento do DNA-A heterólogo é muito menos específica do que a habilidade da proteína Rep em trans-replicar o DNA-B (Frischmuth et al., 2000b). Da mesma forma, a pequena diferença na seqüência do sítio de ligação da proteína Rep entre TRMV (GGTAGTTATGG) e TYMoV (GGT GACTGGTG), contribui para que os fatores de replicação codificados pelo DNA-A de TRMV possam replicar o DNA-B de TYMoV. Já a seqüência do sítio de ligação do TRMV-B (GGTAGTTATGG) difere significativamente daquelas de TCMV-[MG-Be1]-A e SYMV-A (GGGGACTGGGG). O fato desses componentes serem capazes de formar pseudo-recombinantes viáveis evidencia que outros fatores influenciam este fenômeno. O mesmo foi observado em relação ao TCMV-[BA-Se1] e TGMV, cujas seqüências diferem significativamente (TCMV-[BA-Se1]: GGGGACTGGGG; TGMV: GG TAGTAATGG), e mesmo assim foram formados pseudo-recombinantes viáveis entre seus componentes.

No caso do TCMV-[BA-Se1]-A e TYMoV-B, a pequena diferença entre as seqüência no sítio de ligação da proteína Rep não foi suficiente para evitar o reconhecimento do sítio pela proteína, e assim o pseudo-recombinante foi capaz de causar infecção sistêmica. O sucesso do pseudo-recombinante formado por SYMV-A e TCMV-[BA-Se1]-B é devido ao fato de suas seqüências no sítio de ligação da proteína Rep serem idênticas.

O fato do pseudo-recombinante entre SMoV-A (GGAGTATGGAG) e TRMV-B não ter sido viável pode ser devido às muitas diferenças na seqüência no sítio de ligação da

proteína Rep, pois apenas em quatro posições eles possuem nucleotídeos idênticos. O mesmo não foi observado no pseudo-recombinante entre SMOV-A e TCMV-[BA-Se1]-B, pois diferem na seqüência em poucos nucleotídeos. Neste caso os sintomas desenvolvidos nas plantas inoculadas com SMOV-A e TRMV-B foram menos intensos que os desenvolvidos nas plantas inoculadas com SMOV-A e TCMV-[BA-Se1]-B, podendo ser atribuído a melhor movimentação do SMOV na planta sendo movimentado pelo DNA-B heterólogo.

Em geral os sintomas induzidos pelos pseudo-recombinantes nas plantas de *N. benthamiana* foram menos intensos que os induzidos pela inoculação dos componentes homólogos, com exceção do pseudo-recombinante TGMV-A e TCMV-[BA-Se1] (Figura 13B), cujos sintomas foram praticamente idênticos aos observados nas plantas inoculadas com TGMV (Figura 14C). Esse resultado sugere que os fatores virais envolvidos na replicação e movimento (e conseqüentemente na indução de sintomas) foram intercambiados de forma estável entre os componentes genômicos. O mesmo não ocorreu com o pseudo-recombinante recíproco, que induziu sintomas mais amenos, indicando diferenças na estabilidade desses fatores quando o papel é invertido, ou seja, a interação da Rep codificada pelo TGMV-A com a origem de replicação do TCMV-[BA-Se1]-B é diferente da interação da Rep codificada pelo TCMV-[BA-Se1]-A com a origem de replicação do TGMV-B. O mesmo pode ocorrer com a interação entre os fatores codificados pelo DNA-B.

É possível que os sintomas sistêmicos desenvolvidos pelos pseudo-recombinantes ao serem inoculados pela primeira vez em um novo hospedeiro (*N. benthamiana*) sejam mais amenos, caracterizando uma menor adaptação ente o vírus e o hospedeiro. Essa adaptação pode ocorrer após algumas passagens sucessivas no mesmo hospedeiro via recombinações intermolecular, conforme demonstrado por Hou e Gilbertson (1996).

Em condições naturais é freqüente a ocorrência de infecções mistas entre diferentes espécies de begomovírus. A mistura de componentes genômicos em uma mesma célula favorece a recombinação e/ou pseudo-recombinação, podendo resultar no surgimento de novas espécies de vírus.

O fato de pseudo-recombinantes viáveis terem sido produzidos entre os componentes genômicos de diversos vírus isolados recentemente no Brasil a partir de tomateiro e *Sida* sugere que esses vírus podem ter evoluído a partir de ancestrais comuns, provavelmente infectando plantas daninhas. Ao serem transferidos para o tomateiro pelo biótipo B de *B. tabaci*, esses vírus teriam se adaptado ao novo hospedeiro por meio de recombinação ou pseudo-recombinação. Esse processo provavelmente continua ocorrendo no campo, mas eventualmente algumas poucas espécies altamente adaptadas ao tomateiro devem predominar.

O monitoramento constante das espécies de begomovírus infectando o tomateiro nas principais regiões brasileiras será essencial para detectar esse processo de evolução de novas espécies de vírus, e para permitir que o melhoramento visando resistência seja direcionado para aquelas espécies que passem a predominar.

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

A primeira parte do trabalho visou a caracterização molecular de um vírus que foi isolado de plantas de tomateiro apresentando sintomas de mosaico, distorção foliar e nanismo no município de Igarapé, Minas Gerais (Zerbini et al., 1996). O isolado foi caracterizado biologicamente por Ambrozevicius (2000). A análise de sequências completas dos componentes A e B indicou tratar-se de uma nova espécie de begomovírus, denominada *Tomato chlorotic mottle virus* isolado MG-Ig1 (TCMV-[MG-Ig1]) (Ambrozevicius et al., 1999; Ribeiro et al., 2002).

Para a clonagem do genoma foram sintetizados pares de oligonucleotídeos sobrepostos para os componentes A e B e que continham sítios para as enzimas de restrição *Xho* I e *EcoR* I, respectivamente, resultando em um produto de PCR correspondente aos componentes A e B completos do TCMV-[MG-Ig1]. Os componentes genômicos amplificados via PCR foram submetidos à digestão enzimática com as enzimas *Xho* I e *EcoR* I para os componentes A e B, respectivamente. No caso do DNA-A, foi feita uma digestão parcial com *Xho* I, a 37°C por 15 minutos. Os produtos da digestão parcial foram separados por eletroforese em gel de agarose (0,9%) e a banda correspondente ao DNA-A foi cortada do gel, purificada para ser usada na clonagem. O produto de PCR amplificado para o DNA-B foi submetido à digestão com *EcoR* I e o DNA purificado diretamente a partir da solução, e usado para clonagem. Os componentes virais foram clonados e sequenciados completamente. A análise comparativa das sequências com as de outros begomovírus já caracterizados comprova que a identidade do isolado como TCMV. Além disso foram construídas árvores filogenéticas para classificar taxonomicamente essa nova espécie, que se agrupou com begomovírus presentes no Brasil e que infectam o tomateiro, como o TRMV, TCMV-[MG-Be1] e TYMoV, ou *Sida* sp., como SYMV e SMoV. Apesar do TCMV-[MG-Ig1] possuir elevada homologia no seu DNA-A com o TCMV-[MG-Be1] (95%), este é capaz induz sintomas sistêmicos quando inoculado em *N.*

*benthamiana*, o que não ocorre com o DNA-A do TCMV-[MG-Ig1], que necessita de seu DNA-B cognato.

A segunda parte do trabalho pretendeu estudar o fenômeno da pseudo-recombinação que ocorre entre os begomovírus bissegmentados, especificamente entre begomovírus isolados de tomateiro e de *Sida* sp. Para isso plantas de *N. benthamiana* foram inoculadas via biobalística com pseudo-recombinantes formados por combinações entre os genomas virais clonados de TCMV-[BA-Se1], TCMV-[MG-Be1], TRMV, TGMV, TYMoV, SMoV e SYMV. Os pseudo-recombinantes entre TRMV-A + TGMV-B, TRMV-B + TGMV-A, TRMV-A + TYMoV-B, TRMV-B + TCMV-[MG-Be1]-A, TRMV-B + SYMV-A, TCMV-[BA-Se1]-A + TGMV-B, TCMV-[BA-Se1]-B + TGMV-A, TCMV-[BA-Se1]-A + TYMoV-B, TCMV-[BA-Se1]-B + SMoV-A e TCMC-[BA-Se1]-B + SYMV-A causaram infecção sistêmica, enquanto que os pseudo-recombinantes formados por TRMV-A + TCMV-[BA-Se1]-B, TRMV-B + TCMV-[BA-Se1]-A, TCMV-[BA-Se1]-B + TCMV-[MG-Be1]-A e TRMV-B + SMoV-A não causaram infecção sistêmica. As plantas inoculadas com o pseudo-recombinante TRMV-B + SMoV-A apresentaram sintomas de infecção sistêmica, porém o TRMV-B não foi detectado por PCR. Em conjunto, estes resultados indicam que o fenômeno da pseudo-recombinação é complexo e envolve interações entre fatores codificados pelos componentes virais, bem como outros codificados pelo hospedeiro.

Na natureza, infecções mistas de begomovírus ocorrem com frequência, podendo levar ao surgimento de novas espécies por meio de recombinação e/ou pseudo-recombinação, constituindo dessa forma uma ferramenta importante na evolução dos begomovírus.

#### 4. LITERATURA CITADA

- ABOUZID, A.M., POLSTON, J.E., HIEBERT, E. The nucleotide sequence of tomato mottle virus, a new geminivirus isolated from tomatoes in Florida. **Journal of General Virology**, v.73, p.3225-3229. 1992.
- ACH, R.A., DURFEE, T., MILLER, A.B., TARANTO, P., HANLEY-BOWDOIN, L., ZAMBRISKI, P.C. e GRUISSEM, W. An alternatively spliced, multigene family in maize encode retinoblastoma-related proteins which can interact with a plant D-type cyclin and a geminivirus replication protein. **Molecular and Cellular Biology**, v.17, p.5077-5086. 1997.
- 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, Brasil. **Virus Reviews and Research**, vol. 4 (Supl.), p.196. 1999. (Abstract)
- AMBROZEVICIUS, L.P. Caracterização de uma nova espécie de *Begomovirus* e análise da variabilidade genética de geminivírus associados ao Tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) na região Sudeste do Brasil. (Tese Mestrado). Viçosa . Universidade Federal de Viçosa. 2000.
- AMBROZEVICIUS, L.P., ANDRADE, E.C., CALEGARIO, R.F., FONTES, E.P.B., ZERBINI, F.M. Molecular cloning and characterization of TGV-Ig, a tomato-infecting *Begomovirus* from Minas Gerais state. **Virus Reviews and Research**, vol. 5 (Supl.), p.196. 2000. (Abstract)
- ANÔNIMO. Mosca-branca e as geminivíroses do tomateiro. **Boletim Técnico EMBRAPA**, Brasília, 4 p. 1996.
- ARAGÃO, F.J.L., BARROS, L.M.G., BRASILEIRO, A.C.M., RIBEIRO, S.G., SMITH, F.D., SANFORD, J.C., FARIA, J.C. e RECH, E.L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. **Theoretical and Applied Genetics**, v.93, p.142-150. 1996.
- ARGUELLO-ASTORGA, G.R., GUEVARA-GONZALEZ, R.G., HERRERA-ESTRELLA, L. e RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: A model for replication. **Virology**, v.203, p.90-100. 1994a.
- ARGUELLO-ASTORGA, G.R., HERRERA-ESTRELLA, L., RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. Experimental and theoretical definition of a geminivirus origin of replication. **Plant Molecular Biology**, v.26, p.553-556. 1994b.

- BEZERRA, I.C., LIMA, M.F., RIBEIRO, S.G., GIORDANO, L.B. e ÁVILA, A.C. Occurrence of geminivirus in tomato producing areas in Submédio São Francisco. **Fitopatologia Brasileira**, v.22 (Supl.), p.331. 1997. (Abstract)
- 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 geographic regions. **Annals of Applied Biology**, v.125, p.311-325. 1994.
- 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.
- BRIDDON, R.W., BEDFORD, I.D., TSAI J.H. e MARKHAM, P.G. Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, tomato pseudo-curly top viurs , suggests a recombinant origin. **Virology**, v.219, p.387-394. 1996.
- BROWN, J.K. e BIRD J. Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. **Plant Disease**, v.76, p.220-225. 1992.
- CARRINGTON, J.C., KASSCHAU, K.D., MAHAJAN, S.K. e SCHAAD, M. Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. **Plant Cell**, v.8, p.1669-1681. 1996.
- COSTA, A.S. Studies on *Abutilon* mosaic in Brazil. **Phytopathologische Zeitschrift**, v.24, p.97-112. 1955.
- COSTA, A.S. e BENNETT, C.W. Whitefly-transmitted mosaic of *Euphorbia prunifolia*. **Phytopathology**, v.40, p.266-283. 1950.
- COSTA, A.S. Three whitefly-transmitted virus diseases of beans in São Paulo, Brazil. **FAO Plant Protection Bulletin**, v. 13, p.121-130. 1965.
- COSTA, A.S. Whitefly-transmitted plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v.14, p.429-440. 1976.
- COSTA, A.S. Increase in the populational density of *Bemisia tabaci*, a threat of widespread virus infection of legume crops in Brazil. **In: Tropical Diseases of Legumes** (Eds: Bird, J.L. e Maramorosch, K.). Ademic Press, New York, 171 p. 1975.
- DAVIES, J.W., STANLEY, J., DONSON, J., MULLINEAUX, P.M. e BOULTON, M.I. Structure and replication of geminivirus genomes. **Journal of Cell Science**, v.7 (Supl.), p.95-107. 1987.
- DESBIEZ, C., DAVID, C., METTOUCHI, A., LAUFS, J. e GRONENBORN, B. Rep protein of tomato yellow leaf curl geminivirus has an ATPase activity required for viral DNA replication. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.92, p.5640-5644. 1995.
- DEVEREUX, J., HAEBERLI, P. e SMITHIES, O. A comprehensive set of sequence analyses programs for the VAX .**Nucleic Acids Research**, v.12, p.387-395. 1987.
- DHAR, A.K. e SINGH R.P. Geminivirus. p. 289-309. **In: Pathogenesis and host specificity in plant diseases**. (Eds: SINGH, U.S., SINGH, R.P. e KOHMOTO, K.) Virus & Viroids. 1995.
- DONSON, J., MORRIS-KRSINICH, B.A.M., MULLINEAUX, P.M., BOULTON, M.I. e DAVIES, J.W. A putative primer for second-strand DNA synthesis of maize streak virus is viron associated. **EMBO Journal**, v.3, p.3069-3073. 1984.
- EAGLE, P.A., OROZCO, B.M. e HANLEY-BOWDOIN, L. A DNA sequence required for geminivirus replication also mediates transcriptional regulation. **Plant Cell**, v.6, p.1157-1170. 1994.
- EAGLE, P.A. e HANLEY-BOWDOIN, L. *cis*-Elements that contribute to geminivirus transcriptional regulation and the efficiency of DNA replication. **Journal of Virology**, v.71, p.6947-6955. 1997.
- FARIA, J.C. e ZERBINI, F.M. Família Geminiviridae – Taxonomia, replicação e movimento. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.8, p.25-65. 2000 .

- FAUQUET, C.M. e FARQUETTE, D. (Eds). **Proceeding of the International Seminar: African cassava mosaic disease and its control**. Ede, Netherlands: CTA/OPRSTOM, 1988.
- FERNANDES, J.J., FONTES, E.P.B., BROMMONSCHENKEL, S.H., CARVALHO, M.G., ZAMBOLIM, E.M. e ZERBINI, F.M. Molecular cloning and sequencing of *Tomato rugose mosaic virus* (TRMV), a geminivirus isolated from tomatoes at “Triângulo Mineiro”, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, vol. 25 (Supl.), p. 440. 2000. (Abstract)
- FERNANDES, A.V. Clonagem e caracterização molecular de dois begomovírus que infectam *Sida rhombifolia*. (Tese de Mestrado) Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 1999.
- FLORES, E., SILBERSCHMIDT, K. e KRAMER, M. Observações de “clorose infecciosa” das malváceas em tomateiros do campo. **O Biológico**, v.26, p.65-69. 1960.
- FONDONG, V.N., PITA, J.S., REY, M.E.C., KOCHKO, A., BEACHY, R.N. e FAUQUET, C.M. Evidence of synergism between ACMV and a new double-recombinant geminivirus infecting cassava in Cameroon. **Journal of General Virology**, v.81, p.287-297. 2000.
- 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., 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. 1994a.
- FONTES, E.P.B., GLADFELTER, H.J., SCHAFFER R.L., PETTY I.T.D. e HANLEY-BOWDOIN, L. Geminivirus replication origins have a modular organization. **Plant Cell**, v.6, p.405-416. 1994b.
- FRANÇA, F.H, VILLAS-BOAS, G.L. e BRANCO, M.C. Ocorrência de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring ( Homoptera: Aleyrodidae) no Distrito Federal. **Annals of the Society of Entomology of Brasil**, v.25, p.369-372. 1996.
- FRISCHMUTH, T., ENGEL, M., LAUSTER, S. e JESKE, H. Nucleotide sequence evidence for the occurrence of three distinct whitefly-transmitted, *Sida*-infecting bipartite geminiviruses in Central America. **Journal of General Virology**, v. 78, p.2675-2682. 1997.
- FRISCHMUTH, T., UNSELD, S., RINGEL, M., KONRAD, A. e LAUSTER, A. Virus-specific adaptations for production of a pseudorecombinant virus formed by two distinct bipartite geminiviruses from Central America. **Virology**, v.274, p.179-188. 2000.
- GALVÃO, R.M., FERNANDES, A.V., ALMEIDA, J.D., ALFENAS, P.F., ANDRADE, E.C. e FONTES, E.P.B. Molecular characterization of two new tomato-infecting geminiviruses and the *Sida*-infecting geminiviruses complex from Brazil. **Abstracts of the 2<sup>nd</sup> International Workshop on Bemisia and Geminiviral Diseases**. Abstract L-93, San Juan-Puerto Rico, 7-12 de junho de 1998.
- GALVÃO, R.M. Caracterização parcial de dois novos begomovírus que infectam o tomateiro. (Tese Mestrado). Viçosa . Universidade Federal de Viçosa .2000
- GILBERTSON, R.L., FARIA, J.C., HANSON, S.F., MORALES, F.J., AHLQUIST, P.G., MAXWELL, D.P. e RUSSEL, D.R. Cloning of the complete DNA genomes of four bean-infecting geminivirus and determining their infectivity by electric discharge particle acceleration. **Phytopathology**, v.81, p.980-985. 1991a.
- GILBERTSON, R.L., HIDAYAT, S.H., MARTINEZ, R.T., LEONG, S. A., FARIA, J.C., MORALES, F. e MAXWELL, D.P. Differentiation of bean-infecting geminiviruses by nuclei acid hybridization probes and aspects of bean golden mosaic in Brazil. **Plant Disease**, v. 75, p. 709-715.1991b.
- GILBERTSON, R.L., HIDAYAT, S.H., PAPLOMATAS, E.J., ROJAS, M.R., HOU, Y.-M. e MAXWELL, D.P. Pseudorecombination between infectious cloned DNA components of

- tomato mottle and bean dwarf mosaic geminivirus. **Journal of General Virology**, v. 74, p.23-31. 1993.
- GILBERTSON, R.L. e LUCAS, W.J. How do viruses traffic on the “vascular highway” ? **Trends in Plant Sciences**, v.1, p.260-268. 1996.
- GOODMAN, R.M. Single-stranded DNA genome in a whitefly-transmitted plant virus. **Virology**, v.83, p.171-179. 1977.
- GRÖNING, B.R., HAYES, R.J. e BUCK, K.W. Simultaneous regulation of tomato golden mosaic virus coat protein and AL1 gene expression: Expression of the AL4 gene may contribute to suppression of the AL1 gene. **Journal of General Virology**, v.75, p.721-726. 1994.
- GUANIM, M. e CZOSNEK, H. Transmission of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV-IS) from whitefly to whitefly by copulation. **Abstracts of the 2<sup>nd</sup> International Workshop on Bemisia and Geminiviral Diseases**. Abstract P-11, San Juan-Puerto Rico, 7-12 de junho de 1998.
- GUTIERREZ, C. Geminivirus DNA replication. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.56, p.313-329. 1999.
- HANLEY-BOWDOIN, L., ELMER, J.S. e ROGERS, S.G. Expression of functional replication protein from tomato golden mosaic virus in transgenic tobacco plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.87, p.1446-1450. 1990.
- 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.
- HARRISON, B.D. Advances in geminivirus research. **Annual Review of Phytopathology**, v.23, p.5-82. 1985.
- HAYES, R.J. e BUCK, K.W. Replication of tomato golden mosaic virus DNA-B in transgenic plants expressing open reading frames (ORFs) of DNA-A: Requirement of ORF AL2 for production of single-stranded DNA. **Nucleic Acids Research**, v.17, p.10213-10222. 1989.
- HÖFER, P., ENGEL, M., JESKE, H. e FRISCHMUTH, T. Host range limitation of a pseudorecombinant virus produced by two distinct bipartite begomoviruses. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.10, p.1019-1022. 1997.
- LAZAROWITZ, S.G. Geminiviruses: Genome structure and gene function. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.11, p.327-349. 1992.
- HÖFER, P., BEDFORD, I.D., MARKHAM, P.G., JESKE, H. e FRISCHMUTH, T. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of insect nontransmissible geminivirus isolates. **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.
- HOWARTH, A.J., CATON, J., BOSSERT, M. e GOODMAN, R.M. Nucleotide sequence of bean golden mosaic virus and a model for gene regulation in geminiviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.82, p.3572-3576. 1985.
- IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**, v.10, fev. 1998.
- KIM, K.S., SHOCK, T.L. e GOODMAN, R.M. Infection of *Phaseolus vulgaris* by bean golden mosaic virus: Ultrastructural aspects. **Virology**, v.89, p.22-33. 1978.
- KOONIN, E.V. e ILYINA, T.V. Geminivirus replication proteins are related to prokaryotic plasmid rolling circle DNA replication initiator proteins. **Journal of General Virology**, v.73, p.2763-2766. 1992.
- KRAUSE, R., FERNANDES, J.J., ÁVILA, A.C., BEZERRA, I.C., RIBEIRO, S.G., RESENDE, R.O., LIMA, M.F., FONTES, E.P.B. e ZERBINI, F.M. Widespread

- occurrence of tomato geminiviruses in Brazil, associated with a new biotype of the whitefly vector. **Abstracts of the 2<sup>nd</sup> International Workshop on Bemisia and Geminiviral Diseases**, Abstract P-46, San Juan-Puerto Rico, 7-12 de junho de 1998.
- LAUFS, J., TRAUT, W., HEYRAUD, F., MATZEIT, V., ROGERS, S.G., SCHELL, J. e GRONENBORN, B. *In vitro* cleavage and joining at the viral origin of replication by the replicator initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.92, p.3879-3883. 1995.
- LIU, L., VAN TONDER, T., PIETERSEN, G., DAVIES, J.W. e STANLEY, J. Molecular characterisation of a subgroup I geminivirus from a legume in South Africa. **Journal of General Virology**, v.78, p.2113-2117. 1997.
- LOURENÇÃO, A. L. e NAGAI, H. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. **Bragantia**, v.53, p.53-59. 1994.
- LUCAS, W.L. e GILBERTSON, R. L. Plasmodesmata in relation to viral movement within leaf tissues. **Annual Review of Phytopathology**, v.32, p.387-411. 1994.
- MATYIS, J.C., SILVA, D.M., OLIVEIRA, A.A.R. e COSTA, A.S. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v.1, p.267-274. 1975.
- MELO, P.C.T. Mosca-branca ameaça produção de hortaliças. **Asgrow Informe Técnico Sementes**. 1992.
- MORRIS, B., RICHARDSON, K., EDDY, P., ZHAN, X., HALEY, A. e GARDNER, R. Mutagenesis of the AC3 open reading frame of African cassava mosaic virus DNA-A reduces DNA-B replication and ameliorates disease symptoms. **Journal of General Virology**, v.72, p.1205-1213. 1991.
- MULLINEAUX, P.M., DONSON, J., MORRIS-KRSINICH, B.A.M., BOUTON, M.I. e DAVIES, J.W. The nucleotide sequence of maize streak virus DNA. **EMBO Journal**, v.3, p.3063-3068. 1984.
- NAGAR, S., PEDERSEN T.J., CARRICK, K.M. e HANLEY-BOWDOIN, L. A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. **Plant Cell**, v.7, p.705-719. 1995.
- NAVOT, N., PICHERSKI, E., ZEIDAN, M., ZAMIR, D. e CZOSNEK, H. Tomato yellow leaf curl virus: a whitefly-transmitted geminivirus with a single DNA component. **Virology**, v.185, p.151-161. 1991.
- NORIS, E., VAIRA, A.M., CACIAGLI, P., MASENGA, V., GRONENBORN, B. e ACCOTTO, G.P. Amino acids in the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus that are crucial for systemic infection, particle formation, and insect transmission. **Journal of Virology**, v.72, p.10050-10057. 1998.
- 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. Conserved sequence and structural motifs contribute to the DNA binding and cleavage activities of a geminivirus replication protein. **Journal of Biological Chemistry**, v.273, p.24448-24456. 1998.
- PADIDAM, M., BEACHY, R.N. e FAUQUET, C.M. Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. **Journal of General Virology**, v.76, p.249-263. 1995.
- PADIDAM, M., BEACHY, R.N. e FAUQUET, C.M. The role of AV2 ("precoat") and coat protein in viral replication and movement in tomato leaf curl geminivirus. **Virology**, v.224, p.390-404. 1996.
- PADIDAM, M., MAXWELL, D.P. e FAUQUET, C.M. A proposal for naming geminiviruses. **Archives of Virology**, v.142, p.2553-2562. 1997.

- PALMER, K.E. 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.
- PASCAL, E., SANDERFOOT, A.A., WARD, B.M., MEDVILLE, R., TURGEON, R. e LAZAROWITZ, S.G. The geminivirus BR1 movement protein binds to single-stranded DNA and localizes to the cell nucleus. **Plant Cell**, v.6, p.995-1006. 1994.
- PERRING, T.M., COOPER, A.D., RODRIGUEZ, R.J., FARRAR, C.A. e BELLOWS, T.S. Identification of a whitefly species by genomic and behavioral studies. **Science**, v.259, p.74-77. 1993.
- PETTY, I.T.D., COURTS, R.H.A. e BUCK, K.W. Geminivirus coat protein promoter sequences can function in *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Research**, v.14, p.5113-5125. 1986.
- 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.
- POOMA, W. e PETTY, I.T. Tomato golden mosaic virus open reading frame AL4 is genetically distinct from its C4 analogue in monopartite geminiviruses. **Journal of General Virology**, v.77, p.1947-1951. 1996.
- POUR, A.K., BENDAHMANE, M., MATZEIT, V., ACCOTTO, G.P., CREPSI, S. e GRONENBORN, B. Tomato yellow leaf curl virus from Sardinia is a whitefly-transmitted monopartite geminivirus. **Nucleic Acids Research**, v.19, p.6763-6769. 1991.
- QIN, S., WARD, B.M. e LAZAROWITZ, S.G. The bipartite geminivirus coat protein aids BR1 function in viral movement by affecting the accumulation of viral single-stranded DNA. **Journal of Virology**, v.72, p.9247-9256. 1998.
- RESENDE, E.A., FILGUEIRA, R.A.R., ZERBINI, F.M., ZAMBOLIM, E.M. e FERNANDES, J.J. Tomato infected with geminivirus under greenhouse conditions at Uberlândia-MG, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.21 (Supl.), p.424. 1996. (Abstract)
- REVINGTON, G.N., SUNTER, G. e BISARO, D.M. DNA sequences essential for replication of the B genome component of tomato golden mosaic virus. **Plant Cell**, v.1, p.985-992. 1989.
- 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**, São Lourenço, MG, p.290. 1996.
- 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.
- RIDGEN, J.E., DRY, I.B., KRAKE, L.R. e REZAIAN, M.A. Plant virus DNA replication processes in *Agrobacterium*: Insight into the origins of geminiviruses? **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.93, p.10280-10284. 1996.
- ROJAS, M.R., NOUEIRY, 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.
- RYBICKI, E.P. A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of Geminiviridae. **Archives of Virology**, v.134, p.49-77. 1994.
- RUBINSTEIN, G. e CZONESK, H. Long-term association of tomato yellow leaf curl virus with its whitefly vector *Bemisia tabaci*: Effects on insect transmission, capacity, longevity and fecundity. **Journal of General Virology**, v.78, p.2683-2689. 1997.

- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. e MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**, 3<sup>a</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANDERFOOT, A.A. e LAZAROWITZ, S.G. Cooperation in viral movement: The geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery. **Plant Cell**, v.7, p.1185-1194. 1995.
- SANDERFOOT, A.A., 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.
- SAUNDERS, K., LUCY, A. e STANLEY, J. DNA forms of the geminivirus African cassava mosaic virus are consistent with a rolling circle mechanism of replication. **Nucleic Acids Research**, v.19, p.2325-2330. 1991.
- SAUNDERS, K. e STANLEY, J. Disease of *Ageratum conyzoides*: Evidence for interfamilial recombination between plant DNA viruses. **Virology**, v.264, p.142-152. 1999.
- SCHAFFER, R. L., MILLER, C.G. e PETTY, I.T.D. Virus and host-specific adaptations in the BL1 and BR1 genes of bipartite geminiviruses. **Virology**, v.214, p.330-338. 1995.
- SCHUSTER, D.J., MUELLER, T.F., KRING, J.B. e PRICE, J.F. Relationship of the sweetpotato whitefly to a new tomato fruit disorder. **HortScience**, v.25, p.1618-1620. 1990.
- SETTLAGE, S.B., MILLER, A.B. e HANLEY-BOWDOIN, L. Interactions between geminivirus replication proteins. **Journal of Virology**, v.70, p.6790-6795. 1996.
- STANLEY, J. Infectivity of the cloned geminivirus genome requires sequences from both DNAs. **Nature**, v.305, p.643-645. 1983.
- STANLEY, J. e GAY, M.R. Nucleotide sequence of cassava latent virus DNA. **Nature**, v.301, p.260-262. 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.
- SUNTER, G. e BISARO, D.M. Transactivation in a geminivirus: AL2 gene product is needed for coat protein expression. **Virology**, v.180, p.416-419. 1991.
- SUNTER, G. e BISARO, D.M. Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 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. e BISARO D.M. Tomato golden mosaic virus leftward gene expression: Autoregulation of geminivirus replications proteins. **Virology**, v.195, p.275-280. 1993.
- SUNTER, G., HARTITZ, M.D., HORMUDZI, S.G., BROUGH, C.L. e BISARO, D.M. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required for coat protein accumulation while ORF AL3 is necessary for efficient DNA replication. **Virology**, v.179, p.69-77. 1990.
- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G. e GIBSON, T.J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680. 1994.
- TIMMERMANS, M.C.P., DAS, O.P. e MESSING, J. Geminiviruses and their use as extrachromosomal replicons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 45, p. 79-112. 1994.
- TORRES-PACHECO, I., GARZON-TIZNADO, J.A., HERRERA-ESTRELLA, 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.

- VAN REGENMORTEL, M.H.V., FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., CASTENS, E., ESTES, M.K., LEMON, S., MANILOFF, J., MAYO, J.A., MCGEOCH, D.J., PRINGLE, C.R. e WICKNER, R. (Eds.) **Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses**. Academic Press: New York. 1121p. 2000.
- VOINNET, O., PINTO, Y.M. e BAULCOMBE, D.C. Supression 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.
- VON ARNIM, A e STANLEY, J. Determinants of tomato golden mosaic virus symptom development are located on DNA-B. **Virology**, v. 186, p. 286-93. 1992.
- WANG, H.L., GILBERTSON, R.L. e LUCAS, W.J. Spatial and temporal distribution of bean dwarf mosaic geminivirus in *Phaseolus vulgaris* and *Nicotiana benthamiana*. **Phytopathology**, v.86, p.1204-1214. 1996.
- ZERBINI, F.M., ZAMBOLIM, E.M., FERNANDES, J.J., GILBERTSON, R.L. e CARRIJO, I.V. Geminivírus isolado de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* L.) em Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v.21 (Supl.), p. 430. 1996. (Resumo)