



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Molecular

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Replicação e movimento diferencial de *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) e perfil de expressão de microRNAs em genótipos resistente e suscetível de tomateiro

Lígia Moreira de Almeida

Brasília – DF

2013

Lígia Moreira de Almeida

Replicação e movimento diferencial de *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) e perfil de expressão de microRNAs em genótipos resistente e suscetível de tomateiro

Dissertação apresentada à
Universidade de Brasília
como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre
em Biologia Molecular pelo
Programa de Pós Graduação
em Biologia Molecular

Orientador

Prof. Renato de Oliveira Resende

Co-orientador

Dra. Simone da Graça Ribeiro

**BRASÍLIA
DISTRITO FEDERAL - BRASIL**

2013

Lígia Moreira de Almeida

Replicação e movimento diferencial de *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) e perfil de expressão de microRNAs em genótipos resistente e suscetível de tomateiro

Dissertação submetida à comissão examinadora como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Renato de Oliveira Resende

Departamento de Biologia Celular, UnB, Brasília-DF

Presidente – Orientador

Dra. Rita de Cássia Pereira Carvalho

Departamento de Fitopatologia, UnB, Brasília-DF

Membro efetivo

Dra. Anelise Franco Orílio

Departamento de Biologia Celular, UnB, Brasília-DF

Membro efetivo

Ao Sérgio, por me fazer tão bem.

“Dit la fleur au petit prince : Il faut bien que je supporte deux ou trois chenilles si je veux connaître les papillons.”

“Disse a flor para o pequeno príncipe: é preciso que eu suporte duas ou três lagartas se quiser conhecer as borboletas.”

— Antoine de Saint-Exupéry

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais. Ao meu pai Marcus que sempre se esforçou ao máximo para garantir que nada faltasse a mim e à minha família, e por ter sempre colocado os meus estudos como uma prioridade. À minha mãe, Lú, pelo exemplo de amor, carinho e dedicação à minha criação. Por ser a minha “fofinha”. Amo muito vocês!

Ao meu orientador, Renato Oliveira Resende, sempre disposto a ajudar, pela oportunidade e apoio. À minha co-orientadora, Simone da Graça Ribeiro, pela oportunidade e ensinamentos. Agradeço aos dois pela atenção dispensada às correções, que foi de fundamental importância para aprimorar o trabalho.

À Universidade de Brasília, que me apresentou a um mundo novo por meio de professores maravilhosos e de colegas muito especiais. Ao Departamento de Biologia Molecular, pela oportunidade e apoio para realização do mestrado. A CAPES pela concessão de bolsa de estudo.

Aos meus queridos amigos do laboratório LPP3, Ana Luíza, Lílian, Raquel, Karinne, Bruna, Uiara, Lorena, Maurício, Igor, Karolzinha, Isadora, Thaís, Larissa Guimarães e Larissa Muniz. Em especial à Andressa, Paulinha e Amanda, que se tornaram pessoas essenciais em minha vida, me apoiando, me escutando e por estarem presentes até mesmo em experimentos noturnos e nos fins de semana de trabalho. Todas vocês fizeram meus dias mais divertidos e prazerosos e me ensinaram muito com as constantes trocas de experiências e de conhecimento.

Aos pesquisadores e profissionais da Embrapa Cenargen, fundamentais para a realização deste trabalho, Ana Cristina Brasileiro, Patrícia Guimarães, Soraya Bertoli, Leonardo Fonseca e à pesquisadora Joseane Padilha pelas análises estatísticas, que foram de fundamental importância para a discussão dos resultados do experimento de agroinfiltração. Agradeço também ao meu amigo Pedro Henrique, que cuidou com zelo das minhas plantas e da casa de vegetação.

Às minhas amadas amigas que me fazem muita falta Thyty e Rafa. À Lílian pela amizade e por ter me ajudado tantas vezes durante os experimentos. À Rosana Blawid, a quem eu admiro muito e agradeço pela paciência, incentivo e ajuda nos experimentos. À

Marília Pappas, pela amizade, ensinamentos e ajuda que foi essencial para os experimentos com os miRNAs.

Às amigas do LGP Gabi e Robertinha, que se tornaram grandes amigas, de confissões desabafos e alegrias. Agradeço também à Sarinha pela amizade e carinho.

Aos maiores presentes que a Biologia me deu: Marthinha, Nina, Rafa e Clarinha, minhas irmãs de coração.

À minha segunda família: Vivi, Marcelo, Hugo, tia Elza e especialmente à minha amada sogrinha, Nelza,

um exemplo para mim. E por último, por merecer um espaço especial, ao amor da minha vida, Sérgio. Por me fazer querer ser cada dia melhor. Por crescer comigo. Por sempre me incentivar e apoiar diariamente. Por estar ao meu lado em todos os momentos, ruins e bons, me dando forças para suportar os ruins e tornando os bons em momentos especiais e inesquecíveis. Pela paciência e por me fazer companhia nos longos fins de semana de redação. Obrigada pelos sete anos maravilhosos. Sem você, seria impossível chegar até aqui. Te amo!

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	1
GENERAL ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO GERAL	5
JUSTIFICATIVA	8
OBJETIVO GERAL	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
CAPÍTULO 1	11
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
1.1 A cultura do tomate	12
1.1 Família <i>Geminiviridae</i>	12
1.2 Características genômicas dos begomovírus	14
1.3 Replicação dos begomovírus.....	16
1.4 Movimentação dos begomovírus.....	19
1.5 Begomovírus em tomateiros no Brasil	23
1.6 Genes de Resistência à Begomovírus em Tomateiro	26
1.8 MicroRNAs em plantas	30
1.9 MicroRNAs em resposta à patógenos virais em plantas	32
CAPÍTULO 2	34
REPLICAÇÃO E MOVIMENTO DIFERENCIAL DE TOCMOV EM LINHAGENS RESISTENTE E SUSCETÍVEL DE TOMATEIRO	34
RESUMO	35
ABSTRACT	37
2.1 INTRODUÇÃO.....	38
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
2.2.1 Avaliação do acúmulo de ToCMoV-A em plantas LAM 157 e SC agroinfiltradas	40
2.2.1.1 Preparo da cultura bacteriana, agroinfiltração a vácuo e coleta e extração das amostras.....	40
2.2.1.2 Diluição das amostras de DNA, preparo da curva padrão e quantificação absoluta por PCR quantitativo (qPCR).	41

2.2.1.3	Análise estatística da concentração viral.....	43
2.2.2	Ensaio de restrição da movimento viral a longa distância	43
2.2.2.1	Inoculação viral via bombardeamento, extração de DNA e confirmação da infecção por PCR.....	43
2.2.2.2	Enxertia de ‘Santa Clara’ (SC) e LAM 157 sadias sobre SC infectadas e sobre-enxertia de SC não infectadas.....	45
2.2.2.3	Deteção viral via tissue blot e via PCR na primeira e segunda enxertia..	46
2.3	RESULTADOS	47
2.3.1	Avaliação do acúmulo de ToCMoV-A em plantas LAM 157 e SC agroinfiltradas	47
2.3.1.1	Preparo da curva padrão e quantificação absoluta por meio de PCR quantitativo (qPCR).....	47
2.3.1.2	Análise estatística da concentração viral	49
2.3.2	Enxertia de tomateiros ‘Santa Clara’ (SC) e LAM 157 sadias sobre tomateiros SC infectadas e sobre-enxertia de tomateiros SC não infectados.	50
2.3.2.1	Deteção viral via tissue blot dos folíolos coletados, na primeira e segunda enxertia.....	52
2.4	DISCUSSÃO.....	54
	CAPÍTULO 3.....	58
	ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE MICRORNAs EM LINHAGENS RESISTENTE E SUSCETÍVEL DE TOMATEIRO	58
	RESUMO	59
	ABSTRACT	60
3.1	INTRODUÇÃO.....	61
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	63
3.2.1	Análise do perfil de expressão de microRNAs em linhagens resistente e suscetível de tomateiro.	63
3.2.1.1	Inoculação de tomateiros ‘Santa Clara’ (SC) e LAM 157 com ToCMoV via bombardeamento.	63
3.2.1.2	Extração de DNA de tomateiros ‘Santa Clara’ (SC) e LAM 157 inoculados via bombardeamento e confirmação da infecção por PCR.	64
3.2.1.3	Extração e análise qualitativa e quantitativa de Ácidos nucleicos totais dos folíolos coletados 17 dias após o bombardeamento.	65

3.2.1.4	Eletroforese dos Ácidos nucleicos totais em gel desnaturante de acrilamida 15% e transferência para membrana.....	67
3.2.1.5	Marcação de sondas de oligonucleotídeos com $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP e hibridização.....	68
3.2.1.6	Análise da concentração de microRNAs em SC e LAM 157 infectados com ToCMoV.....	68
3.3	RESULTADOS.....	70
3.3.1.	Análise do perfil de expressão de microRNAs em linhagens resistente e suscetível de tomateiro inoculadas com ToCMoV.....	70
3.3.2	Confirmação da infecção viral por PCR.....	71
3.3.3	Análise qualitativa e quantitativa de Ácidos nucleicos.....	72
3.3.4	Análise da concentração de microRNAs de SC e LAM 157 infectados com ToCMoV e controles.....	72
3.4	DISCUSSÃO.....	75
	CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS.....	79

RESUMO GERAL

Os begomovírus pertencem à família *Geminiviridae* e são transmitidos eficientemente pelo vetor *Bemisia tabaci*, conhecido como mosca-branca. *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) é um dos principais begomovírus que afetam a cultura do tomateiro no Brasil. Plantas infectadas com ToCMoV geralmente desenvolvem sintomas de clorose internerval, manchas cloróticas e mosqueado amarelo. ToCMoV e outros begomovírus do Novo Mundo são compostos por dois componentes de DNA circular de fita simples (conhecidos como DNA-A e DNA-B) que se replicam no núcleo das células infectadas. Uma das melhores estratégias para controle da dispersão da doença é o emprego de cultivares resistentes. Recentemente, uma linha quase isogênica de ‘Santa Clara’ (SC) chamada ‘LAM 157’, carregando o gene de resistência *tcm-1*, foi obtida pela Embrapa Hortaliças. O gene *tcm-1* confere resistência a diferentes espécies de begomovírus e é caracterizado pela redução ou ausência de sintomas e restrição do acúmulo viral em plantas infectadas. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a resistência conferida na linhagem LAM 157 em resposta à infecção causada pelo begomovírus ToCMoV. Os mecanismos de replicação e movimento viral a longa distância foram avaliados na linhagem LAM 157 e na linhagem suscetível ‘Santa Clara’. A replicação viral foi analisada por meio de agroinfiltração de folíolos com o DNA-A de ToCMoV seguida de quantificação absoluta do acúmulo viral resultante por qPCR no segundo, sexto e décimo dias após a agroinfiltração. A quantidade de DNA viral aumentou com o tempo em todas as plantas infectadas, evidenciando a replicação viral. No entanto, essa quantidade foi estatisticamente menor em LAM 157. O movimento viral a longa distância foi avaliado por meio de dupla-enxertia sobre porta enxerto ‘Santa Clara’ infectado com ToCMoV e posterior análise por PCR, para determinar se a resistência conferida pela linhagem LAM 157 impediria a movimentação do vírus a longa distância. Foi possível detectar a presença de ToCMoV por PCR nos folíolos apicais do grupo controle, 10 dias após a primeira enxertia. Neste momento, não foi detectado vírus no grupo com enxertos de plantas resistentes, evidenciando um atraso no movimento viral. Trinta dias após a segunda enxertia, todas as plantas do grupo controle encontravam-se infectadas, enquanto no grupo com plantas LAM 157, em apenas duas de seis plantas foi detectada a presença do vírus. Os resultados sugerem que a resistência apresentada pela isolinha LAM 157 se deve a restrição na

replicação viral aliada a uma menor eficiência no movimento viral. Os MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs endógenos que regulam a expressão de diversos genes que estão envolvidos com muitos processos biológicos fundamentais. Para verificar uma possível expressão diferencial de miRNAs em tomateiros inoculados com ToCMoV, foram analisados o acúmulo de miRNAs previamente associados com o desenvolvimento da planta e miRNAs relacionados com as respostas à estresse. Plantas suscetíveis de SC e de plantas resistentes da linhagem 'LAM 157' foram inoculados por bombardeamento de partículas com clone infeccioso de ToCMoV. Ácidos nucleicos totais foram isolados a partir de folhas apicais com infecção sistêmica, 17 dias após a inoculação, e separados em gel desnaturante de poliacrilamida. Foram realizados Northern blots utilizando como sondas oligonucleótidos complementares aos miRNAs, marcados com $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP na extremidade 5'. A quantidade de miRNAs 159, 164, 168 e 172 (previamente associados com o desenvolvimento da planta) acumulada pelas plantas controle, foi comparada nas plantas SC e 'LAM 157' infectadas com ToCMoV. Os resultados mostraram um acúmulo diferencial de miRNAs entre plantas resistentes e suscetíveis, infectados e controles inoculados. Estes resultados sugerem que a expressão dos miRNAs da planta hospedeira pode ser afetada em consequência da infecção por ToCMoV e podem refletir diferenças na intensidade da expressão de sintomas, bem como nos níveis de resistência ao vírus.

Palavras-chave: Begomovirus, ToCMoV, *Solanum lycopersicum*, mecanismos de resistência, miRNAs.

GENERAL ABSTRACT

Begomoviruses belong to the Family *Geminiviridae* and are efficiently transmitted by the vector *Bemisia tabaci*, also known as whitefly. *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) is one of the main begomovirus species affecting tomatoes in Brazil. Plants infected with ToCMoV generally develop symptoms of vein chlorosis, chlorotic spots, and mottling. ToCMoV and other begomoviruses from New World are composed by two circular single stranded DNA components (known as DNA-A and DNA-B) that replicate in the nucleus of infected cells. One of the best strategies to control the disease spread is the use of resistant cultivars. Recently, a ‘Santa Clara’ (SC) near-isogenic line named ‘LAM 157’ carrying the resistance locus *tcm-1* was obtained by Embrapa. The broad *tcm-1* locus resistance to different begomovirus species is characterized by the reduction or absence of symptoms and restriction of virus accumulation in infected plants. This work aimed to describe the resistance conferred by the *tcm-1* locus in ‘LAM 157’ in response to the infection caused by the begomovirus ToCMoV. The mechanisms of viral replication and movement were evaluated in resistant line LAM 157 and in susceptible line ‘Santa Clara’. Viral replication was analyzed in leaves vacuum-agroinfiltrated with the ToCMoV DNA-A, followed by the absolute quantification of viral accumulation by qPCR two, six and ten days after agroinfiltration. The amount of viral DNA increased with time in all the infiltrated plants reflecting viral replication, but it was significantly lower in ‘LAM 157’. For evaluation of viral long distance movement, a double grafting experiment was performed. ToCMoV infected SC plants were used as rootstock in two groups where scions of susceptible SC and resistant LAM 157 were grafted. In both, final scions were SC plants. ToCMoV was detected by PCR in apical leaves from control group 10 days after the first grafting. At this time, no virus was detected in resistant grafts confirming a delay in virus movement. Thirty days after the second grafting, all plants from the control groups were infected, while in the group of LAM 157 intergraft only in two of six plants were detected the presence of virus. The results indicated that the resistant response in “LAM 157” is due the restriction of viral replication, in addition to a lower efficiency of viral movement in these resistant plants. MicroRNAs (miRNAs) are small endogenous RNAs that regulate the expression of several genes that are involved in many important biological processes. To verify a possible

differential expression of miRNAs in tomato inoculated with ToCMoV, the accumulation of miRNAs previously reported to be related to plant development and with stress responses was studied. Susceptible ‘Santa Clara’ (SC) plants and resistant ‘LAM 157’ plants were inoculated by particle bombardment with infectious clone of ToCMoV. Total nucleic acids were isolated from systemically infected leaves 17 days post inoculation and loaded in denaturing polyacrylamide gel. Northern blots were performed using as probes gamma³²P-γATP end-labeled oligonucleotides complementary to miRNAs. The amount of miRNAs 159, 164, 168 and 172 (previously related with plant development) accumulated by control plants of SC and ‘LAM 157’ was compared with those in ToCMoV-infected plants. The results showed differential accumulation of miRNAs between infected susceptible and resistant plants and mock-inoculated controls. These results suggest that the expression of host miRNAs can be affected as a result of ToCMoV infection and may reflect differences in symptom expression intensity as well as in the levels of virus resistance.

Keywords: *Begomovirus*, ToCMoV, *Solanum lycopersicum*, resistance mechanisms, miRNAs.

INTRODUÇÃO GERAL

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é uma das hortaliças mais importantes sendo cultivado em quase todo o mundo devido ao seu crescente consumo, a sua fácil adaptação de cultivo, à versatilidade de seu aproveitamento na alimentação humana (Shankara Naika et al., 2006) e a sua popularização como alimento funcional (Takeoka et al., 2001). No Brasil, a produção de tomate apresenta um crescimento acima da média mundial, sendo considerado o nono maior produtor do mundo (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2012). Em 2010 o país produziu 1,8 milhão de toneladas de frutos e a área cultivada para processamento foi de 20 mil hectares (Marouelli et al., 2012).

A cultura do tomate é muito suscetível e está sujeita ao desenvolvimento de diversas pragas e patógenos. Entre estes, as begomoviroses são consideradas como os que mais causam prejuízo econômico à cultura do tomate no Brasil e no mundo (Ribeiro et al., 2003; Seal et al., 2006).

Agentes causais das begomoviroses, os begomovírus pertencem à família *Geminiviridae* e apresentam o genoma, formado por uma ou duas moléculas de DNA circular de fita simples, encapsidado em partículas icosaédricas incompletas geminadas (Brown et al., 2011). São transmitidos por diferentes biótipos da mosca-branca *Bemisia tabaci*, porém, sua rápida disseminação a partir da década de 90 deve-se à introdução do biótipo B, que com taxas maiores de reprodução e adaptação, é capaz de colonizar uma maior gama de hospedeiros, colonizando eficientemente o tomateiro (Lourenção and Nagai, 1994).

O primeiro relato de infecção causada por begomovírus em tomateiro no Brasil ocorreu na década de 60, no estado de São Paulo (Flores et al., 1960), que mais tarde foi identificado como a espécie *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) (Matyis et al., 1975). Atualmente, já se encontram descritas mais cinco espécies aceitas pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) (Brown et al., 2011): *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) (Ribeiro et al., 2003), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) (Fernandes et al., 2006), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) (Barbosa et al., 2009), *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) (Calegario et al., 2007), e *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) (Faria et al., 1997), além de nove novos isolados parcialmente caracterizados e que

potencialmente representam novas espécies (Castillo-Urquiza et al., 2008; Ribeiro et al., 2003).

O controle das begomoviroses se baseia geralmente na diminuição da população de *B. tabaci*, que demanda o uso de grandes volumes de inseticida, afetando diretamente o ecossistema e contribuindo para o desenvolvimento de resistência a pesticida nas populações de mosca-branca (Horowitz et al., 2005). A maneira mais eficiente e com o menor custo para o controle de begomoviroses é o uso de plantas resistentes. Quando usadas com outros métodos de controle de pragas, podem garantir o sucesso da produção (Ji et al., 2007b).

Todas as cultivares de tomateiros cultivados geralmente são suscetíveis às begomoviroses. No entanto, acessos de plantas selvagens do gênero *Solanum* se mostraram resistentes a diferentes espécies de begomovírus. Genes de resistência para doenças específicas são ineficazes em várias regiões do mundo, em razão da existência de grande diversidade de espécies de begomovírus que infectam o tomate. Com o desenvolvimento de marcadores moleculares ligados aos genes de resistência, os melhoristas de plantas podem incorporar eficientemente estes genes em genótipos de elite, acelerando assim a criação de cultivares resistentes (Foolad and Sharma, 2005).

No Brasil, a mais promissora fonte com ampla resistência foi identificada na linhagem de tomate ‘TX-468-RG’ (Santana et al., 2001), resultando na ausência de sintomas e no baixo acúmulo viral quando infectada com diferentes isolados de begomovírus (Garcia-Cano et al., 2008). Essa linhagem é derivada do híbrido *Tyking*, usado em programas de melhoramento, que apresenta um alto nível de resistência a isolados de begomovírus do Velho Mundo (Laterrot, 1995). Testes com o begomovírus bipartido ToCMoV revelaram que a resistência apresentada pela linhagem ‘TX-468-RG’ é condicionada pelo locus recessivo monogênico nomeado de *tcm-1* (Giordano et al., 2005). Uma linhagem de introgressão de tomate de mesa, nomeada de LAM 157, foi obtida na Embrapa Hortaliças pelo cruzamento da linhagem ‘TX-468-RG’ com a variedade cultivada ‘Santa Clara’.

Como os mecanismos de replicação e movimento são de fundamental importância para a infecção viral (Rojas et al., 2005), ambos foram avaliados na linhagem LAM 157, resistente ao vírus ToCMoV, e na linhagem suscetível ‘Santa Clara’. A replicação viral foi

analisada por meio de agroinfiltração de folíolos com o DNA-A de ToCMoV seguida de quantificação absoluta do acúmulo viral resultante por qPCR no segundo, sexto e décimo dias após a agroinfiltração nas plantas resistente e suscetível. O movimento viral foi avaliado por meio de dupla-enxertia sobre porta enxerto ‘Santa Clara’ infectado com ToCMoV e posterior análise por PCR, para determinar se a resistência conferida pela linhagem LAM 157 impediria a movimentação do vírus a longa distância.

Os microRNAs formam uma classe de pequenos RNAs não codantes e endógenos, com 20 a 24 nucleotídeos, que desempenham papel fundamental na regulação da expressão gênica em eucariotos (Naqvi et al., 2012; Voinnet, 2009). Estudos recentes demonstram que a expressão e atividade de miRNAs variam em resposta a estresses bióticos e abióticos em plantas (Khraiwesh et al., 2012). Entre os estresses bióticos, as infecções virais podem resultar no desenvolvimento de diversos sintomas devido à interferência da infecção viral nos processos de desenvolvimento da planta (Feng et al., 2009). Nos últimos anos, vem sendo demonstrado que os miRNAs desempenham um importante papel no desenvolvimento das plantas e em resposta a interações planta-patógeno (Finnegan and Matzke, 2003; Voinnet, 2005). Porém, os mecanismos que controlam tais atividades permanecem desconhecidos.

O estudo do acúmulo de microRNAs mediante a infecção viral possibilita a associação de miRNAs específicos com os mecanismos envolvidos na patogenicidade dos vírus, além da caracterização da resposta das diferentes linhagens à infecção viral. O perfil de expressão de miRNAs de plantas resistentes LAM 157 e suscetíveis ‘Santa Clara’ foi analisado na presença e ausência de infecção por ToCMoV.

JUSTIFICATIVA

Devido às grandes perdas e ao aumento no custo da produção causado pelas begomoviroses que afetam a cultura de tomate, várias estratégias vêm sendo implementadas em todo o mundo para controlar as populações do inseto vetor *B. tabaci*, como por exemplo, o uso de grandes volumes de inseticidas, que afeta diretamente o ecossistema e contribui para o desenvolvimento de resistência a pesticida nas populações de mosca-branca (Horowitz et al., 2005). A maneira mais eficiente e com o menor custo para o controle de begomoviroses é o uso de plantas resistentes. Quando usadas integradas com outros métodos de controle de pragas, pode garantir o sucesso da produção de tomate (Ji et al., 2007b).

Todas as cultivares de tomateiros usadas geralmente são suscetíveis às begomoviroses. No entanto, acessos de plantas selvagens do gênero *Solanum* se mostraram resistentes a diferentes espécies de begomovírus. Os programas de melhoramento de tomate baseiam-se na introgressão de genes de resistência, presentes em espécies selvagens, para a espécie cultivada *S. lycopersicum*. Com a diversidade de geminivírus em todo o mundo e com o número escasso de genes de resistência caracterizados, o melhoramento de cultivares com resistência ampla e estável é um grande desafio aos melhoristas.

Uma linhagem de introgressão de tomate de mesa contendo o *locus* de resistência *tcm-1*, nomeada de LAM 157, foi obtida pelo cruzamento da linhagem ‘TX-468-RG’ com a variedade cultivada ‘Santa Clara’. Uma importante linha de pesquisa na busca de resistência a vírus em tomateiros é o estudo das vias de defesa envolvidas na atuação dos diversos genes de resistência. Vários mecanismos parecem estar envolvidos, como as interações genes-a-gene, as vias de silenciamento gênico e a atuação de microRNAs. Entretanto, as bases moleculares ou mecanismos de resistência governados pelo *locus tcm-1* não são conhecidos.

Os mecanismos de replicação e movimento são de fundamental importância para a infecção viral (Rojas et al., 2005) e o envolvimento e relevância da regulação gênica mediada por microRNAs e outros sRNAs na patogenicidade e resistência de plantas a vírus e outros patógenos tem sido cada vez mais enfatizada. Recentemente, foram descobertas diversas família de miRNAs responsáveis pela regulação de genes, com sítios de ligação ricos em repetições de leucinas, relacionados com a resposta imune inata em *Solanum*

lycopersicum e outras Solanaceae, que atuam por meio de cascatas que afetam a resistência a doenças e patógenos (Eckardt, 2012; Shivaprasad et al., 2012).

Neste cenário, o presente estudo visa contribuir na elucidação dos mecanismos que atuam na resposta de resistência conferida pelo *locus tcm-1* na linhagem LAM 157 em relação à replicação e movimento viral e a longa distância, assim como, na expressão diferencial de miRNAs em resposta a infecção com ToCMoV.

OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a resistência conferida pelo gene *tcm-1* na linhagem LAM 157 em resposta à infecção causada pelo begomovírus ToCMoV.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar possíveis diferenças nos mecanismos de replicação viral e movimento de ToCMoV entre as linhagens resistente e suscetível.
- Determinar se a resistência conferida pelo gene *tcm-1* a ToCMoV impede a movimentação do vírus a longa distância.
- Analisar o perfil de expressão de microRNAs em tomateiros resistentes e suscetíveis infectados com ToCMoV.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 A cultura do tomate

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) pertence à família Solanaceae e tem o seu centro de origem localizado em regiões que se estendem ao longo dos Andes e das ilhas Galápagos. O México é considerado o seu centro primário de domesticação, onde se originou o nome “tomate” – usado com ligeiras variações em outros idiomas –, derivado da palavra “tomatl” da língua náuatle, de astecas do Sul do México (Maranca, 1982).

O tomate é cultivado em quase todo o mundo devido ao seu crescente consumo, a sua fácil adaptação de cultivo e à versatilidade de seu aproveitamento na alimentação humana (Shankara Naika et al., 2006). Em termos comparativos, o Brasil apresenta um crescimento na produção de tomate acima da média mundial e é o nono maior produtor do mundo (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2012). Em 2010, a área cultivada para processamento no Brasil foi de 20 mil hectares, produzindo 1,8 milhão de toneladas de frutos (Marouelli et al., 2012). O principal produtor nacional, tanto em área quanto em volume de produção, é o estado de Goiás, seguido respectivamente dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Bahia (IBGE, 2010).

Ressalta-se, ainda, que a crescente demanda foi também reforçada pelo fato de o tomate ser considerado um alimento funcional. O tomate e seus derivados aparecem como as maiores fontes de licopeno, pigmento associado à prevenção de câncer por ter ação antioxidante, e possui altas taxas de vitaminas A e C (Takeoka et al., 2001).

Em maio de 2012, o ‘*Tomato Genome Consortium*’ publicou o sequenciamento do genoma do tomate, estabelecendo assim, uma base molecular para o estudo da espécie e para a identificação de genes de interesse, o que poderá auxiliar no desenvolvimento de estratégias de melhoramento genético para promover, por exemplo, a resistência a pragas (The Tomato Genome Consortium, 2012).

1.1 Família *Geminiviridae*

Os geminivírus formam uma família extensa e diversa de vírus de plantas que infectam uma ampla variedade de plantas hospedeiras, o que inclui os tomateiros. Os

membros da família *Geminiviridae* possuem DNA circular de fita simples e o genoma encapsidado em partículas icosaédricas incompletas geminadas. Podem apresentar genoma monosegmentado (monopartido) ou bissegmentado (bipartido) com o tamanho de 2,6 a 2,8 kb, respectivamente. A família *Geminiviridae* é composta por quatro gêneros divididos de acordo com a organização genômica, insetos vetores, gama de plantas hospedeiras e identidade de sequência do genoma (Brown et al., 2011; Fauquet et al., 2003). Os quatro gêneros, nomeados conforme a abreviação da espécie-tipo, são: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus*.

Os *Mastrevirus* são transmitidos por cigarrinhas e apresentam genoma monopartido que codifica quatro proteínas. Todos os seus membros infectam plantas monocotiledôneas, com três exceções: *Tobacco yellow dwarf virus* (TbYDV), *Bean yellow dwarf virus* (BeYDV) e *Chickpea chlorotic dwarf virus* (CpCDV). A espécie-tipo desse gênero é a *Maize streak virus* (Brown et al., 2011; Fauquet et al., 2003).

Os *Curtovirus*, assim como os *Mastrevirus*, também são transmitidos pelas cigarrinhas e apresentam genoma monopartido que codifica sete proteínas. Infectam plantas dicotiledôneas e sua espécie tipo é *Beet curly top virus* (Brown et al., 2011; Fauquet et al., 2003).

O gênero *Topocuvirus*, o último a ser reconhecido pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), possui genoma monopartido que codifica seis proteínas. É transmitido pelo vetor membracídeo às plantas dicotiledôneas. O único membro desse gênero é a espécie-tipo *Tomato pseudo-curly top virus* (Brown et al., 2011; Fauquet et al., 2003).

Os *Begomovirus* representam os únicos geminivírus que podem apresentar um ou dois componentes genômicos, denominados respectivamente de monopartidos e de bipartidos. Os vírus monopartidos possuem seis proteínas codificadas em seu genoma e os bipartidos, divididos em DNA-A e DNA-B, possuem cinco ou seis proteínas no DNA-A e duas proteínas no DNA-B. Sua espécie-tipo é o *Bean golden yellow mosaic virus* e seu inseto-vetor é a mosca-branca *Bemisia tabaci* (Brown et al., 2011; Fauquet et al., 2003).

Os geminivírus são responsáveis por grandes prejuízos na produtividade agrícola em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo. Recentemente, espalharam-se para regiões temperadas devido às mudanças nas práticas agrícolas e nas condições ecológicas

(Mansoor et al., 2003). Outro fator determinante para a rápida disseminação geográfica dos geminivírus é a expansão do comércio global, com o aumento das importações e das exportações de produtos agrícolas. Um exemplo desse processo de rápida disseminação é o que vem ocorrendo com a espécie *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), que foi relatado inicialmente em Israel na década de 40, e se espalhou rapidamente pelo Velho Mundo, sendo identificado em países como Japão, Espanha, Austrália e China (Lefevre et al., 2010; Pan et al., 2012; Picó et al., 1996). Com o comércio global, o vírus já alcançou o Novo Mundo, sendo encontrado em diversos países na América do Norte, e em 2004 foi encontrado pela primeira vez na América do Sul, no noroeste da Venezuela (Zambrano et al., 2007).

Devido ao pequeno tamanho do genoma, os geminivírus tornaram-se um importante instrumento na pesquisa básica, como por exemplo, na análise da regulação de genes em plantas e da comunicação célula-a-célula. Estudos sobre a replicação do DNA, controle do ciclo celular, transcrição, expressão de proteínas e silenciamento gênico podem ser feitos *in vivo* com os geminivírus com maior facilidade, quando comparados ao estudo dos próprios genes do hospedeiro (Hanley-Bowdoin et al., 2000; Jeske, 2009; Mansoor et al., 2003).

1.2 Características genômicas dos begomovírus

A maior parte dos begomovírus descritos apresenta genoma bipartido, contendo DNA-A e DNA-B. Possuem uma região intergênica de aproximadamente 200 pb, altamente conservada entre os dois componentes do mesmo vírus, que é essencial para o reconhecimento dos processos de replicação e de transcrição dos dois genomas, mantendo assim a fidelidade do genoma bipartido (Brown et al., 2011; Jeske, 2009). Na região comum, encontra-se uma estrutura em grampo com uma sequência de nove nucleotídeos, TAATATTAC, conservada entre os geminivírus.

Os genes virais são transcritos bidirecionalmente e são nomeados de acordo com o sentido da região codante, V para o sentido viral e C para o sentido complementar, procedidos por A ou B de acordo com o a respectiva partícula viral DNA-A ou DNA-B. O DNA-A codifica cinco ORFs (*Open reading frames*): AV1 (*Coat Protein* ou CP), AV2 (*Precoat Protein* ou PCP), AC1 (*Replication-associated protein* ou Rep), AC2 (*Transcriptional activator protein* ou TrAp), AC3 (*Replication enhancer protein* ou REn) e

AC4. O DNA-B codifica duas ORFs: BV1 (*Nuclear shuttle protein* ou NSP) e BC1 (*Movement protein* ou MP).

A CP, correspondente à capa proteica dos vírus, é uma proteína multifuncional que promove a interação específica com o inseto-vetor e protege o DNA viral durante a transmissão. Além disso, está envolvida com o transporte nuclear e com o transporte célula-a-célula em begomovírus monopartidos, sendo encontrado no núcleo e no citoplasma em *Cotton leaf curl Kokhran virus* (CLCuKV) (Briddon et al., 1990; Kunik et al., 1998; Poornima Priyadarshini et al., 2011).

A Rep também é uma proteína multifuncional e é indispensável para que ocorra a replicação do DNA viral. Ela se liga às proteínas do hospedeiro, reprogramando o ciclo celular, para assim promover a replicação do DNA viral e desempenha funções de corte e ligação do DNA, essenciais para o início e término da replicação viral (Gutierrez, 1999; Gutierrez et al., 2004).

A proteína AC2 promove a transcrição da CP e NSP. Estudos mostraram que AC2 de TGMV interage e desativa proteínas do tipo quinases como a Adenosina Kinase (ADK) e SNF1, e é determinante para a patogenicidade viral, aumentando a suscetibilidade ao vírus quando expressa em plantas transgênicas (Buchmann et al., 2009; Sunter and Bisaro, 1997; Sunter et al., 1993; Wang et al., 2003). Foi observado também que em diversos begomovírus como *African cassava mosaic virus* (ACMV), TYLCV, *Mungbean yellow mosaic India virus* (MYMIV) e TGMV, a TrAP pode atuar como supressor de silenciamento gênico (Buchmann et al., 2009; Rahman et al., 2012; van Wezel et al., 2001; Wang et al., 2003), porém os mecanismos exatos dessa atividade ainda não foram elucidados (Rahman et al., 2012).

Outra proteína que atua na replicação viral, interagindo com a proteína Rep, é a proteína potencializadora de replicação REn, que aumenta o acúmulo viral por mecanismos ainda desconhecidos, intensificando a severidade da infecção viral e dos sintomas. Também foi demonstrado que a AC3 de *Tomato leaf curl Kerala virus*, além de potencializar a replicação do DNA viral, produz fenótipo próximo ao obtido com o silenciamento do gene PCNA do hospedeiro (Pasumathy et al., 2011; Sung and Coutts, 1995).

A ORF AC4 nos begomovírus ACMV e *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) pode levar ao desenvolvimento anormal de plantas expressando AC4 como

transgene. Esse fenômeno é atribuído à capacidade das proteínas do AC4 se ligarem a miRNAs e siRNAs, para suprimir o silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) (Chellappan et al., 2005; Vanitharani et al., 2004). Também foi mostrado que a AC4, ou C4 em monopartidos, pode estar envolvida nos mecanismos de regulação da transcrição, silenciamento e patogenicidade (Chellappan et al., 2004; Piroux et al., 2007). Análises com mutantes sugeriram que a ORF C4 pode também estar envolvida diretamente com o movimento viral célula-a-célula em TYLCV (Rojas et al., 2001).

O DNA-B possui duas ORFs, uma no sentido viral, BV1, e outra no sentido complementar, BC1; que juntas são responsáveis pela movimentação viral sistêmica na planta. A BV1 corresponde ao gene NSP, responsável pelo transporte nuclear. Ela se liga ao DNA de fita simples ou de fita dupla, sem a necessidade de uma sequência específica, e o transporta do núcleo da célula para o citoplasma (Lazarowitz and Beachy, 1999). A BC1 corresponde à proteína MP que é responsável pela movimentação viral célula-a-célula pelos plasmodesmas. Foi demonstrado que a MP é capaz de aumentar o tamanho dos poros de seleção dos plasmodesmas (Rojas et al., 2001). Para que ocorra a infecção sistêmica, é necessário que essas duas proteínas, NSP e MP, interajam entre si. Após a passagem do DNA viral do núcleo para o citoplasma pela proteína NSP, o DNA é transferido para o complexo MP que conduzirá o DNA viral por meio dos plasmodesmas (Sanderfoot and Lazarowitz, 1996).

Apesar do componente A ser capaz de se autorreplicar e de produzir partículas completas, normalmente os begomovírus bipartidos necessitam dos dois componentes genômicos para a infecção sistêmica e sintomática do vírus (Hamilton et al., 1983). Porém, foi observado que o DNA-A de *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV-[MG-Bt1]), inoculado por biobalística, foi capaz de infectar sistemicamente *Nicotiana benthamiana* (Galvao et al., 2003) e *S. lycopersicum* (Fontenelle et al., 2007) sem a presença do DNA-B.

1.3 Replicação dos begomovírus

Após a introdução do vírion pelo inseto vetor na planta hospedeira, no início do processo de infecção, o material genético do vírus é transportado para o núcleo, sendo o DNA viral circular de fita simples convertido em DNA circular de fita dupla e empacotado nos nucleossomos do hospedeiro em forma de minicromossomos extracromossomais. Todo

o processo de síntese da fita complementar depende das enzimas presentes no hospedeiro (Pilartz and Jeske, 1992).

Os geminivírus se multiplicam em células já diferenciadas, porém, não possuem uma polimerase própria. Desse modo, para a replicação do DNA viral, desenvolveram mecanismos que reativam a maquinaria de replicação nas células do hospedeiro. O processo de replicação na planta hospedeira deve ser modificado para promover o mecanismo chamado de “replicação por círculo rolante” (RCR), que gera DNA viral circular de fita simples (Gutierrez, 1999; Gutierrez et al., 2004; Hanley-Bowdoin et al., 2000).

A maior parte dos geminivírus possui uma origem de replicação conservada (TAATATT|AC) que corresponde ao sítio de clivagem, onde a Rep corta a fita no sentido viral e inicia a replicação por círculo rolante. A Rep se liga covalentemente a nova terminação 5' gerada (AC), e a energia conservada dessa ligação é usada para religar a nova terminação 3'OH ao fosfato da terminação 5' após um ou mais ciclos de replicação. O DNA circular de fita simples resultante pode seguir dois caminhos: ser convertido em DNA de fita dupla com a replicação da fita complementar, podendo então sofrer nova replicação ou transcrição, ou ainda, ser imediatamente empacotado em vírions (Jeske, 2009; Vadivukarasi et al., 2007).

O mecanismo de replicação por círculo rolante não explica, porém, todas as formas intermediárias de DNA observadas em análises de gel bidimensional (2D) e de microscopia eletrônica. Com isso, um modelo adicional de replicação foi identificado como “replicação dependente de recombinação” (RDR) para, pelo menos, alguns begomovírus, seus satélites e curtovírus (Alberter et al., 2005; Jeske et al., 2001; Jovel et al., 2007; Morilla et al., 2006; Preiss and Jeske, 2003). A RDR, diferentemente da RCR, não depende de uma origem de replicação. A síntese pode ser iniciada em qualquer terminação 3' de um DNA de fita simples ou de uma extremidade de DNA de fita dupla que contém DNA de fita simples. Nesse processo, fragmentos de DNA viral resultantes de síntese incompleta ou ataques de nucleases podem ser reparados com alta fidelidade pela RDR. Um fator importante com relação à RDR é que essa pode levar à recombinação, se dois vírus relacionados entrarem no mesmo núcleo, o que poderia explicar o alto potencial de recombinação gênica observada nos geminivírus (Jeske et al., 2001).

O único fator viral absolutamente necessário para o início da replicação dos geminivírus é a proteína multifuncional Rep. Ela apresenta funções de corte e ligação do DNA, auto repressão de sua transcrição, além de ser a responsável pela reprogramação do ciclo celular para induzir a expressão de DNA polimerase dependente de DNA em células já diferenciadas (Hanley-Bowdoin et al., 2000). Análises de sequência e ensaios bioquímicos provaram que a Rep possui também atividade de helicase (Choudhury et al., 2006; Clerot and Bernardi, 2006; Jeske, 2009; Koonin and Ilyina, 1992).

A Rep é composta por duas grandes porções: a N-terminal, que corresponde as atividades de ligação específica ao DNA, de corte e de ligação, e a porção C-terminal que é responsável pela atividade ATPase e de helicase (Campos-Olivas et al., 2002). A porção N-terminal contém três sequências conservadas, denominadas motivo I, II e III; importantes na iniciação da RCR (Ilyina and Koonin, 1992). Recentemente, foi identificada também uma quarta região altamente conservada nos geminivírus, chamada de GRS (*Geminivirus Rep Sequence*). Experimentos mostraram que mutantes na região GRS não são infecciosos e foram incapazes de clivar especificamente DNA de fita simples, fator necessário para o início do RCR (Nash et al., 2011).

A Rep interage com diferentes proteínas com funções diversas, muitas delas ainda não elucidadas, como por exemplo, o homólogo da proteína retinoblastoma (pRBR), a proteína auxiliar à DNA polimerase PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular), e as enzimas relacionadas à família de proteínas SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*) (Bruce et al., 2011; Castillo et al., 2003; Sanchez-Duran et al., 2011). Outros exemplos são as proteínas quinase serina/treonina e cinesina, e histona H3 que interagem com a Rep de *Cabbage leaf curl virus* (CbLCV) e de TGMV (Kong and Hanley-Bowdoin, 2002) e o fator de replicação C de trigo, que interage com a Rep de *Wheat dwarf virus* (WDV) (Luque et al., 2002). Também foi demonstrado que a Rep de MYMIV interage com a subunidade de 32 kDa da proteína de ligação à DNA de fita simples RPA, em sua região carboxi-terminal, com o fator MCM2, de *Arabidopsis thaliana* e com a proteína de reparo e recombinação RAD54 (Kaliappan et al., 2012; Singh et al., 2007; Suyal et al., 2012)

A proteína pRBR foi detectada inicialmente como supressora de tumor em células animais e relacionada com a regulação do ciclo celular (Gutierrez et al., 2004). A função da pRBR baseia-se na sua ligação ao fator de transcrição EF2, que controla a fase de transição

entre G1 e a fase S do ciclo celular, bloqueando a transcrição, e consequentemente, inibindo o início da síntese de DNA. Quando a Rep se liga ao pRBR, o EF2 é liberado, ativando assim os genes específicos da fase S, reiniciando o ciclo celular (Gutierrez, 1999; Hanley-Bowdoin et al., 2004).

A proteína PCNA apresenta papel fundamental na iniciação da replicação de DNA. Em plantas saudáveis, o PCNA é encontrado em altos níveis em folhas novas enquanto em células maduras são indetectáveis. Porém, em plantas infectadas com TGMV, foi observado um acúmulo de PCNA em folhas maduras (Egelkrout et al., 2001; Hanley-Bowdoin et al., 2004). Experimentos envolvendo silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS) das proteínas pRBR e PCNA em *N. benthamiana* evidenciaram a importância dessas proteínas para a replicação viral e para a infectividade (Bruce et al., 2011). Ensaios *in vitro* demonstraram que a proteína PCNA interage com as proteínas Rep e REn de *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) (Castillo et al., 2003). Estudos recentes mostraram também interações entre a proteína Rep e enzimas relacionadas à família de proteínas SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*). A Sumolização é um processo pós-traducional que envolve a ligação covalente de um polipeptídeo *ubiquitin-like* (Ubl) de 10-kDa, chamado de SUMO, a uma proteína alvo. Diferente da ubiquitinação, a sumolização não destina proteínas ao proteossoma e é associado às diversas funções como alterações na função, na localização e até mesmo na estabilização das proteínas modificadas (Castillo et al., 2004). Sanchez-Duran et al. (2011) demonstraram por meio de mutações, evidências de que a interação SUMO-Rep é necessária para a infecção viral e para a replicação. Em leveduras, a transição entre replicação, recombinação e reparo é acompanhada pela Sumolização diferencial do PCNA (Hoeghe et al., 2002). O papel biológico preciso que este processo desempenha na infecção viral ainda precisa ser determinado. Futuros experimentos que identifiquem as proteínas da planta hospedeira em que a sumolização é mediada pela interação com a Rep devem elucidar o papel dessa interação durante a infecção (Castillo et al., 2004).

1.4 Movimentação dos begomovírus

Após a entrada do vírus na célula hospedeira, a única proteína viral presente é a CP. A movimentação até o núcleo deve, portanto, ser dependente exclusivamente da CP e dos

mecanismos de transporte do hospedeiro. No entanto, ainda não está claro se o vírus inoculado é transportado até o núcleo como um vírion encapsidado ou se ocorre previamente a desencapsidação para, então, o DNA e a CP se moverem como um complexo nucleoproteico (Gafni and Epel, 2002). Em mastrevirus, estudos com microinjeção de MSV mostraram que, na ausência da CP, o DNA injetado não é capaz de entrar no núcleo, e após a injeção do DNA viral com a CP, o DNA foi transportado rapidamente para o núcleo (Liu et al., 1999). Resultados similares foram obtidos em experimentos com TYLCV (Rojas et al., 2001). Esses resultados evidenciam o envolvimento da CP com o transporte eficiente do DNA viral para o núcleo no estágio inicial da infecção.

Em geral, os begomovírus são restritos ao floema. As células vegetais são conectadas por pontes citoplasmáticas especializadas chamadas de plasmodesmas que funcionam como poros seletivos, permitindo ou impedindo a passagem de pequenas e de macro moléculas, dependendo do estágio de desenvolvimento da folha. Quando as células do floema se desenvolvem, elas passam por uma transição de dreno para fonte de moléculas de carboidratos. Os vírus de plantas geralmente infectam as folhas dreno com maior facilidade, em razão dos estreitos plasmodesmas das folhas fonte (Jeske, 2009; Noueiry et al., 1994).

Posteriormente aos processos de replicação e transcrição, para se mover de célula-a-célula, o DNA viral precisa sair do núcleo, através do poro nuclear, para ser transportado para o citoplasma e para o plasmodesma. A proteína viral envolvida no tráfego intracelular do DNA viral do núcleo para o citoplasma é a NSP. Experimentos com microinjeção mostraram evidências de que a proteína NSP apresenta a capacidade de se transportar através do poro nuclear e auxilia na exportação de DNA de fita simples e dupla (Noueiry et al., 1994). Estudos revelaram que a NSP se liga às moléculas de DNA sem uma sequência específica, mas tendo como referência o tamanho e a forma do DNA (Rojas et al., 1998). As NSP dos vírus *Squash leaf curl virus* (SqLCV), *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV) e *Abutilon mosaic virus* (AbMV) foram localizadas no núcleo em células infectadas (Pascal et al., 1994; Rojas et al., 2001; Zhang et al., 2001). Também foi demonstrado que, durante a infecção, a NSP se liga ao genoma viral no núcleo da célula hospedeira e o exporta para o citoplasma (Hanley-Bowdoin et al., 2000; Lazarowitz and Beachy, 1999). Experimentos com mutantes em BV1 resultaram em movimentação intercelular e exportação nuclear

defectiva (Noueiry et al., 1994). Entretanto, para que haja essa atividade de exportação do núcleo pela NSP, é necessária a sua interação com a proteína viral MP, para em seguida ocorrer o transporte intercelular (Lazarowitz and Beachy, 1999).

Como o diâmetro do plasmodesma é muito menor que as partículas virais, os geminivírus desenvolveram estratégias para atravessá-lo (Waigmann et al., 2004). Em begomovírus bipartidos, a proteína MP, codificada pela ORF BC1, é especializada na transferência do DNA viral entre células adjacentes via plasmodesma. Experimentos com plantas usando MP do begomovírus BDMV expressa em *Escherichia coli* revelaram que a MP é capaz de aumentar o tamanho limite de exclusão do plasmodesma e potencializar a movimentação do DNA viral de célula-a-célula (Noueiry et al., 1994). A MP de AbMV, expressa fusionada à proteína GFP em células epidérmicas de *N. benthamiana*, foi localizada como manchas na periferia das células e ao redor do núcleo (Kleinow et al., 2009b; Zhang et al., 2002). Ainda não se sabe ao certo se a MP interage com o DNA viral de fita simples ou dupla. Experimentos com BDMV mostraram que a forma predominante que se move na planta é o DNA de fita dupla (Rojas et al., 1998). Em contraste, a MP de SqLCV se ligou apenas a pequenas quantidades de DNA de fita simples (Pascal et al., 1994). Tais resultados podem refletir as diferenças nas propriedades biológicas ou nos aspectos relacionados aos experimentos *in vitro*, os quais ainda precisam ser determinados. Quanto à MP ser determinante para a patogenicidade, foi observado que a MP pode estar relacionada à expressão de sintomas no hospedeiro. Plantas transgênicas que expressam MP desenvolveram sintomas muito semelhantes aos observados durante a infecção viral (Duan et al., 1997; Hou et al., 2000), e mutações em regiões localizadas na porção C-terminal do gene MP de AbMV resultaram em alterações significativas nos sintomas e no acúmulo de DNA viral (Kleinow et al., 2009a). Esse fenótipo pode estar relacionado com a interferência da MP com o tráfego intercelular de macromoléculas nos tecidos infectados (Gafni and Epel, 2002).

O DNA viral pode se mover livremente pelos elementos de tubo crivado, mas em razão da ausência de núcleo nessas células, o vírus é incapaz de se replicar. Para que ocorra a replicação viral, é necessário que os vírions entrem nas células do floema que possuem núcleo, como as células companheiras e as células do parênquima (Jeske, 2009).

Essa restrição ao tecido floemático, que é apresentada pela maior parte dos begomovírus, pode ser consequência de fatores como, a incapacidade das proteínas virais de movimento exercerem suas funções em células fora do sistema vascular do hospedeiro, promotores específicos de floema ou uma ativação insuficiente da maquinaria de replicação em células do mesófilo (Morra and Petty, 2000). Outra possível explicação, leva em consideração a resposta de resistência da planta hospedeira como, por exemplo, o mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) nas células do mesófilo, confinando o vírus ao floema. Em infecções mistas do begomovírus AbMV com o vírus de RNA *Cucumber mosaic virus* (CMV), que possui um potente supressor de silenciamento, foi observado que o AbMV foi capaz de escapar do floema e de invadir e se replicar nas células do mesófilo (Wege and Siegmund, 2007). No entanto, como o inseto vetor se alimenta estritamente do floema, não existe uma razão específica para que o vírus saia desse tecido e se espalhe por outros tecidos na planta hospedeira (Jeske, 2009).

Nos begomovírus bipartidos, o DNA-B permitiu a evolução dos mecanismos de movimentação de maneira independente ao DNA-A. Os genes codificados no DNA-B não são necessários para os mecanismos de replicação e encapsidação, mas são essenciais para promover a movimentação viral de maneira eficiente (Hanley-Bowdoin et al., 2000; Rojas et al., 2005). Os aspectos básicos para a introdução do vírus no floema e para a infecção inicial são, provavelmente, muito similares para os membros bipartidos e monopartidos dos begomovírus. Contudo, existem algumas diferenças ligadas às proteínas envolvidas no movimento célula-a-célula e no tropismo de tecidos. Nos begomovírus monopartidos, no lugar da NSP, é a CP que carrega a função de exportação nuclear do DNA viral de fita simples e de fita dupla (Gafni and Epel, 2002). No begomovírus monopartido TYLCV, as proteínas V1 e C4 são potenciais homólogos da proteína MP dos begomovírus bipartidos. Em células epidérmicas de *N. benthamiana*, proteínas V1 fusionadas com GFP foram localizadas em volta do núcleo, no citoplasma e na periferia da célula. Já a proteína C4 foi localizada na periferia celular, sugerindo uma interação com a membrana plasmática (Rojas et al., 2001).

1.5 Begomovírus em tomateiros no Brasil

Os begomovírus são considerados o gênero de maior importância dentro da família *Geminiviridae*, com o maior número de espécies e gama de plantas hospedeiras (Morales and Anderson, 2001; Polston and Anderson, 1997). Além disso, são também considerados os patógenos que mais causam prejuízo econômico à cultura do tomate no Brasil e no mundo (Ribeiro et al., 2003; Seal et al., 2006). No contexto global, a América Latina é a região mais afetada com o maior número de culturas comprometidas e de perdas na produção (Morales and Anderson, 2001).

Desde o final da década de 80, a produção de tomate na Flórida, no Caribe, no México, na América Central, na Venezuela e no Brasil vem sendo afetada pela alta incidência de begomovirose, transmitidas por moscas-brancas, causando grandes perdas econômicas. No mesmo período, um novo biótipo de mosca branca foi introduzido e se espalhou rapidamente no hemisfério ocidental (Polston and Anderson, 1997).

Os sintomas associados às infecções por begomovírus variam de acordo com o genótipo e idade do hospedeiro, com as condições climáticas e com a ocorrência de infecções mistas (Polston and Anderson, 1997; Ribeiro et al., 2003). Os sintomas mais frequentes observados em tomateiros são de mosaico dourado, clorose internerval, enrugamento e enrolamento foliar, nanismo e deformação foliar. Também apresentam redução da floração e paralisação do crescimento, responsáveis pelas grandes perdas na produção (Polston and Anderson, 1997; Ribeiro et al., 2003).

O primeiro relato de infecção de begomovírus em tomateiro no Brasil ocorreu no estado de São Paulo na década de 60, com a presença de sintomas de “mosaico dourado” e “clorose infecciosa” (Flores et al., 1960). Alguns anos depois, o vírus relatado foi purificado e então caracterizado como sendo a espécie TGMV (Matyis et al., 1975).

Em 1994, a presença de begomovírus foi detectada pela primeira vez no Distrito Federal (Ribeiro et al., 1994). A partir de então várias outras ocorrências foram relatadas inicialmente nos estados de Pernambuco, de Minas Gerais, da Bahia e de São Paulo, com perdas de produção variando de 40 a 100% (Faria et al., 1997; Ribeiro et al., 1998). Esse aumento no número de ocorrências de begomovírus a partir da década de 90 deve-se à introdução do biótipo B de *Bemisia tabaci*, que em contraste ao biótipo A, predominante no

Brasil até então, apresenta taxas maiores de reprodução e adaptação e uma maior gama de hospedeiras, colonizando eficientemente culturas de tomate (Lourenção and Nagai, 1994). Antes da introdução do biótipo B, poucos casos de begomovírus no Brasil foram relatados, desde então, o biótipo B vem se espalhando pelo Brasil aumentando significativamente as infecções causadas por begomovírus e causando severas perdas em diversas culturas de importância econômica.

Nas últimas duas décadas, um complexo de begomovírus tem emergido como fator limitante na produção de tomate no Brasil. Esse aumento explosivo no número de doenças associadas aos begomovírus levou, durante os anos de 1997 e 1998, ao abandono da produção de tomate na região do Submédio Vale do São Francisco no estado de São Paulo, que era considerada até então como principal região produtora de tomate para processamento industrial no Brasil (Cotrim et al., 2007).

Até a introdução do biótipo B de *B. tabaci*, apenas o begomovírus TGMV havia sido identificado infectando tomateiro no Brasil (Matyis et al., 1975). Desde então, já se encontram descritos mais cinco espécies aceitas pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) (Brown et al., 2011): ToCMoV (Ribeiro et al., 2003), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) (Fernandes et al., 2006), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) (Barbosa et al., 2009), *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) (Calegario et al., 2007), e *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) (Faria et al., 1997), além de nove novos isolados parcialmente caracterizados e que potencialmente representam novas espécies (Castillo-Urquiza et al., 2008; Ribeiro et al., 2003).

Entre os anos 1994 e 1999, amostras coletadas em culturas de tomates para processamento industrial e consumo *in natura*, em diversos estados das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil, revelaram a presença de possíveis sete novas espécies, evidenciando uma grande diversidade genética do gênero. O vírus ToCMoV foi o primeiro begomovírus a ser detectado na região Nordeste, sendo encontrado nas regiões de Belmonte (PE), Juazeiro (BA), Pesqueira (PE), Petrolina (PE), São Fidélis (RJ) e Seabra (BA) e também em Igarapé Minas Gerais, mostrando que a disseminação do vírus no país ocorreu rapidamente (Ribeiro et al., 2003). Em 2004, ToCMoV foi detectado infectando tomateiros nas regiões no Distrito Federal e em Paty dos Alferes no estado do Rio de Janeiro e Galvao et al. (2003) identificaram o isolado (ToCMV-[MG-Bt1]) em Minas Gerais, confirmando

que o vírus continua a se expandir geograficamente pelo país (Carijo et al., 2005; Ferreira et al., 2005; Ribeiro et al., 2007b).

Esse alto grau de diversidade genética encontrada nos begomovírus que afetam o tomate pode ser explicado pela transferência recente de vírus presente em plantas daninhas para o tomateiro. Esses vírus provavelmente já se encontravam associados às hospedeiras naturais e só alcançaram a cultura de tomate graças à introdução do novo biótipo B que coloniza com sucesso o tomateiro. Estudos com plantas daninhas na região Sudeste do Brasil detectaram a presença de begomovírus em *Sidastrum micranthum*, *Blainvillea rhomboideae* em um tipo selvagem de feijão (Ambrozevicius et al., 2002). Em tomateiro, foram relatadas as espécies de *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV) (Calegário, 2004) e *Sida mottle virus* (SiMoV) (Cotrim et al., 2007) que foram originalmente identificadas em plantas daninhas. A espécie ToSRV, comumente encontrada em tomateiros, foi isolada em plantas de *Nicandra physaloides* naturalmente infectadas no estado de São Paulo (Barbosa et al., 2009). Tais exemplos demonstram a presença de begomovírus originalmente descritos em plantas daninhas infectando plantas cultivadas e a presença de begomovírus geralmente relatados em plantas cultivadas em plantas daninhas. Assim, esses hospedeiros naturais servem como importantes reservatórios de espécies de begomovírus, e novos vírus de tomate podem evoluir adaptando-se ao novo hospedeiro por meio de recombinações e de pseudorecombinações de espécies já existentes (Ribeiro et al., 2003).

Entre os anos de 2002 e 2004, análises de amostras de tomateiro para consumo *in natura* revelaram que os begomovírus predominantes na cultura do tomate no Brasil são as espécies ToSRV, *Tomato golden vein virus* (TGVV) e *Tomato mottle leaf curl virus* (TMoLCV), o que indica a ocorrência de uma seleção das espécies virais mais adaptadas (Fernandes et al., 2008).

Coletas em regiões produtoras de tomate no sudeste do Brasil entre 2005 e 2007 por Castillo-Urquiza et al. (2008) identificaram três novas espécies de begomovírus em amostras de tomate, sendo elas: *Tomato mild mosaic virus* (ToMIMV), *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV) e *Tomato leaf distortion virus* (ToLDV), além das três espécies identificadas em amostras de plantas daninhas: *Sida yellow leaf curl virus* (SiYLCV), *Blainvillea yellow spot virus* (BIYSV) e *Sida common mosaic virus* (SiCmMV).

1.6 Genes de Resistência à Begomovírus em Tomateiro

Devido às grandes perdas e ao aumento no custo da produção causado pelas begomoviroses que afetam a cultura de tomate, várias estratégias vêm sendo implementadas em todo o mundo para controlar as populações de *B. tabaci*, como por exemplo, o uso de grandes volumes de inseticidas, que afeta diretamente o ecossistema e contribui para o desenvolvimento de resistência a pesticida nas populações de mosca-branca (Horowitz et al., 2005). A maneira mais eficiente e com o menor custo para o controle de begomoviroses é o uso de plantas resistentes. Quando usadas integradas com outros métodos de controle de pragas, pode garantir o sucesso da produção (Ji et al., 2007b).

Diversos genes de resistência que proporcionam um amplo espectro de proteção para várias espécies de begomovírus já foram identificados. Genes de resistência para doenças específicas são ineficazes em várias regiões do mundo, em razão da existência de grande diversidade de espécies de begomovírus que infectam o tomate. Com o desenvolvimento de marcadores moleculares ligados aos genes de resistência, os melhoristas de plantas podem incorporar eficientemente estes genes em genótipos de elite, acelerando assim a criação de cultivares resistentes (Foolad and Sharma, 2005).

Os programas de melhoramento de tomate baseiam-se na introgressão de genes de resistência, presentes em espécies selvagens, para a espécie cultivada *S. lycopersicum*. O gene *Ty-1*, o primeiro associado à resistência em geminivírus, foi identificado como gene de resistência ao TYLCV na espécie selvagem *Solanum chilense*. Por meio da técnica de análise de polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP), esse gene foi mapeado no cromossomo 6 (Zamir et al., 1994). O gene *Ty-1*, presente em uma linhagem obtida pelo cruzamento de *S. chilense* com a espécie cultivada, foi associado à inibição de sintomas, ao menor acúmulo viral e à movimentação viral a longa distância limitada (Michelson et al., 1994). Acessos de *S. chilense* mostraram-se resistentes ao begomovírus bipartido *Tomato mottle virus* (ToMoV) na Flórida (Scott et al., 1996). Testes feitos no Brasil indicaram que o locus *Ty-1* confere uma reação do tipo "tolerância" contra distintas espécies de begomovírus bipartidos (Boiteux et al., 2007). Outros genes de resistência localizados no cromossomo 6 são o *Ty-3*, que apresenta resistência à TYLCV e resistência parcial à ToMoV (Ji et al., 2007a), e o gene *Ty-4*, que também apresenta resistência à TYLCV (Ji et

al., 2009). Recentemente foi identificado o *locus* de resistência recessiva Ty-5, derivado do híbrido Tyking e mapeado no cromossomo 4 (Hutton et al., 2012).

O gene Ty-2, localizado no cromossomo 11, foi introgridido a partir da espécie *S. habrachoites* e apresentou altos níveis de resistência contra isolados asiáticos de begomovírus (Hanson et al., 2006; Lapidot and Friedmann, 2002). Esse gene foi usado como fonte de resistência no programa de melhoramento de tomateiros no AVRDC (Asian Vegetable Research and Development Center) e tem sido extensivamente explorado por companhias de sementes na Ásia, além de outras regiões (Ji et al., 2007b). No entanto, segundo Hurtado et al. (2012), o espectro de resistência dos genes Ty-2 e Ty-1 não foi efetivo para os begomovírus bipartidos ToYSV e ToSRV no Brasil.

Dois loci independentes, sendo um dominante e um recessivo, foram associados à resistência apresentada pelo acesso de *Solanum habrochaites* EELM-889, sendo esses não relacionados ao gene Ty-1. Tais fontes de resistência podem ser combinadas para se alcançar uma maior resistência às doenças relacionadas ao TYLCV (Tomas et al., 2011). Cinco novos acessos de *S. lycopersicum*, sem a presença dos loci Ty-1 e Ty-3, ‘LAM 100’, ‘LAM 156’, ‘LA132’, ‘Ty-2’ e ‘Ty-198’ foram identificados como promissoras fontes de resistência em ensaios de campo e foram avaliadas para resposta à infecção por quatro begomovírus bipartidos do Brasil: ToSRV, ToRMV, ToYVSV e ToCMoV. Os acessos ‘LAM 100’, ‘LAM 156’ e ‘Ty-198’ foram resistentes para todas as espécies virais. ‘Ty-2’ foi susceptível ao ToSRV e ToRMV e ‘LAI 132’ mostrou resistência apenas contra ToCMoV (Machado et al., 2012).

O gene recessivo tgr-1 foi identificado na linhagem FLA653, resultado do cruzamento entre *S. chilense* e o híbrido Tyking, conferindo um alto nível de resistência ao begomovírus monopartido *Tomato leaf curl virus* (TLCV), com menor índice de acúmulo viral e movimentação viral limitada (Bian et al., 2007).

Buscas por resistência no banco de germoplasma da Universidade de Viçosa identificaram dois acessos com ausência de sintomas e baixo acúmulo viral ao ToYSV, sendo uma boa fonte de resistência para novas cultivares (Aguilera et al., 2011).

No Brasil, a mais promissora fonte com ampla resistência foi identificada na linhagem de tomate TX-468-RG (Santana et al., 2001), resultando na ausência de sintomas e no baixo acúmulo viral quando infectada com diferentes isolados de begomovírus

(Garcia-Cano et al., 2008). Essa linhagem é derivada do híbrido *Tyking*, usado em programas de melhoramento, que apresenta um alto nível de resistência a isolados de begomovírus do Velho Mundo (Laterrot, 1995). Testes com o begomovírus bipartido ToCMoV revelaram que a resistência apresentada pela linhagem TX-468-RG é condicionada pelo locus recessivo monogênico nomeado de *tcm-1* (Giordano et al., 2005). É possível que os alelos recessivos *tgr-1* e *tcm-1* correspondam ao alelo de *ty-5*, também derivados do híbrido *Tyking*, e ainda não mapeados (Hutton et al., 2012). Foi comprovada também a resistência de TX-468-RG à ToRMV por Pereira-Carvalho et al. (2010). Em análises com o TX-468-RG, além dos outros acessos LA 1967, CNPH 784, PI-127827, Ty 197, Ty 198, resultaram em ausência de sintomas e baixas concentrações de DNA viral quando testados para begomovírus bipartido (Santana et al., 2001). Outras três linhagens de tomate com resistência a begomovírus bipartidos do Brasil, também derivadas da linhagem TX-468-RG de Santana et al. (2001): ‘468-1-1-12’, ‘483-1-22’, e ‘483-1-30’, foram testadas para cinco espécies de begomovírus monopartidos relacionadas à Tomato yellow leaf curl disease (TYLCD). A linhagem ‘468-1-1-12’ se mostrou igualmente resistente quando testadas para outras três espécies relacionadas à TYLCD, além de TYLCV, resultando em ausência completa de sintomas além de um restrito acúmulo viral. As diferenças encontradas no acúmulo viral nas diferentes plantas inoculadas com espécies associadas à TYLCD, possibilitou a identificação de uma região do genoma viral que contém, provavelmente, um fator determinante para a quebra da resistência à infecção nas linhagens resistentes (Garcia-Cano et al., 2008).

Vinte acessos de espécies selvagens de *Solanum* (seção *Lycopersicon*) previamente identificados como resistentes a begomovírus bipartidos e monopartidos foram testados para ToCMoV via bombardeamento. Cinco acessos apresentaram ausência de sintomas e baixo acúmulo viral, porém, ainda estão sendo realizados testes para a identificação dos genes envolvidos na resistência (Vieira et al., 2011). Outro trabalho com o objetivo de selecionar linhagens de introgressão para resistência ao ToCMoV, resultou na seleção das linhagens LAM 157 e LAM 159, contendo o locus *tcm-1*, e LAM 144 e LAM 144-18, contendo o locus *Ty-1*, que apresentaram os melhores resultados com sintomas mais suaves, semelhantes aos dos parentais resistentes (Fontenele et al., 2010). Blawid et al. (2010) testaram as linhagens LAM 157 e LAM 144 através de bombardeamento com alguns dos

principais begomovírus que infectam tomate no Brasil: ToCMoV, ToSRV, TYVSV e ToRMV. As duas linhagens apresentaram sintomas quase imperceptíveis para os quatro vírus testados, além de um menor acúmulo viral em análises por Southern blot em relação ao parental suscetível.

A linhagem de introgressão de tomate de mesa, LAM 157, foi obtida na Embrapa Hortaliças pelo cruzamento da linhagem TX-468-RG com a variedade cultivada ‘Santa Clara’. Resultados obtidos por meio de PCR quantitativo (qPCR) demonstraram que a cultivar suscetível ‘Santa Clara’ apresentou um acúmulo de DNA-A 12 a 43 vezes maior e de DNA-B 8 a 47 vezes maior quando comparado com a isolinha resistente LAM 157, refletindo uma carga viral significativamente menor nas plantas resistentes. Análises da razão entre o DNA-A e o DNA-B encontrados nas duas linhagens mostraram uma maior concentração de DNA-B nas plantas resistentes, o que pode estar relacionado ao mecanismo de resistência inerente ao locus *tcm-1* (Blawid et al., 2011). Tais resultados, em conjunto com os demais obtidos com a isolinha LAM 157, confirmam o potencial de uso dessa linhagem como fonte de resistência contra as principais espécies virais pertencentes ao complexo de begomovírus descritas no Brasil que afetam o tomateiro.

A busca por genes de resistência e o desenvolvimento de marcadores moleculares são de extrema importância para a obtenção de cultivares com amplo espectro de resistência aos begomovírus. Devido à grande diversidade de espécies de begomovírus encontradas nas áreas de produção de tomate, é necessária a obtenção de cultivares com um conjunto de genes efetivos a várias begomovirose comumente encontradas nas áreas de produção, para assim garantir uma resistência estável e duradoura. A piramidização de genes de resistência de diferentes linhagens promoverá um maior nível de proteção contra uma ampla gama de begomovirose, podendo ser associada a genes de resistência a vários outros patógenos e pragas que afetam severamente a produção de tomate (Vidavski, 2007). Uma importante linha de pesquisa na busca de resistência a vírus em tomate é o estudo das vias de defesa envolvidas na atuação dos diversos genes de resistência descritos acima. Vários mecanismos parecem estar envolvidos, como as interações genes-a-gene, as vias de silenciamento gênico e a atuação de microRNAs.

1.8 MicroRNAs em plantas

Os microRNAs formam uma classe de pequenos RNAs não codantes e endógenos, com 20 a 24 nucleotídeos, que desempenham papel fundamental na regulação da expressão gênica em eucariotos (Naqvi et al., 2012; Voinnet, 2009). Em plantas, estão relacionados com diversas funções biológicas, como a morfogênese das folhas, transição de fase de desenvolvimento, regulação hormonal, desenvolvimento de flores e raízes e respostas a estímulos bióticos e abióticos (Aukerman and Sakai, 2003; Chen, 2004; Kidner and Martienssen, 2004; Kidner and Martienssen, 2005).

O primeiro miRNA foi descrito em *Caenorhabditis elegans* por Lee et al. (1993) e foi denominado de lin-4, sendo essencial no controle temporal de diversos eventos do desenvolvimento pós-embrionário. Foi observado que uma pequena sequência de RNA de 22 nucleotídeos, gerado a partir do gene lin-4, era capaz de regular os níveis de expressão da proteína LIN-14. Mais tarde verificaram que o transcrito de lin-4 apresentava diversas regiões complementares à região não traduzida 3'UTR da sequência de lin-4. Após sete anos foi identificado também o miRNA let-7 em *C. elegans*, conservado entre diversos animais. O let-7 é necessário na transição da fase larval para a fase adulta e atua na regulação de diversas proteínas devido à sua complementariedade a região 3'UTR de seus genes alvo (Pasquinelli et al., 2000; Reinhart et al., 2000).

Em 2002, 16 miRNAs foram descritos em *Arabidopsis thaliana*, muitos deles apresentando expressão diferencial durante o desenvolvimento da planta (Reinhart et al., 2002). Desde então, diversos miRNAs foram identificados em diferentes espécies de plantas.

Diferentes mecanismos foram propostos para explicar a origem evolutiva dos genes de miRNA. O primeiro se baseia na duplicação de genes que codificam proteínas, e supõe-se que a maior parte dos miRNAs se originaram dessa forma (Fahlgren et al., 2010; Nozawa et al., 2012). O segundo, em elementos transponíveis que possuem sequências invertidas com uma pequena sequência interna, que formam estruturas de *hairpin*, que podem se converter em genes de miRNA (Piriyapongsa and Jordan, 2008). O terceiro sugere que novos miRNAs podem ser gerados pela duplicação de miRNAs pré-existentes, que passaram por subsequentes mutações, e o último mecanismo proposto sugere que

novos genes de miRNA podem surgir naturalmente por mutações espontâneas em regiões com estrutura de *hairpin* no genoma (Nozawa et al., 2012).

A biogênese dos microRNAs em plantas se inicia com a transcrição dos genes *MIR*, que se localizam geralmente entre dois genes que codificam proteínas, pela RNA Polimerase II (Pol II). O transcrito primário gerado, chamado de pri-miRNA, é um RNA longo e de fita simples, que forma uma estrutura secundária em forma de grampo ou *hairpin*, com alças parcialmente pareadas. O pri-miRNA é então processado em pré-miRNA, pela ação de diferentes enzimas, entre elas a enzima RNase III Dicer-Like 1 (DCL 1), que realiza ambos os cortes distal e proximal das alças do *hairpin*, gerando um duplex imperfeito de RNA. Esse duplex de RNA miRNA/miRNA* (miRNA corresponde à fita guia e miRNA* à fita que é posteriormente degradada) é reconhecido pela enzima HEN1 e então metilado, o que protege o duplex de degradações por exonucleases da classe SDN (*Small RNA degrading nuclease*). A fita guia miRNA é em seguida incorporada ao complexo proteico RISC (RNA-induced silencing Complex), já no citoplasma da célula, e a fita miRNA* é degradada. A proteína Argonata 1, um dos componentes do complexo RISC, é responsável por incorporar a fita guia e clivar os mRNA específicos ou promover a repressão da tradução dos genes alvo (Naqvi et al., 2012; Voinnet, 2009).

Os miRNAs são responsáveis por guiar o complexo RISC aos seus alvos, que reconhecem regiões com alta complementariedade, para então atuar reprimindo a expressão do gene (Meng et al., 2011). Após a clivagem de um alvo específico, o complexo RISC e o miRNA podem continuar existindo, ou o miRNA pode ser liberado e se acoplar à outro complexo RISC. A taxa de degradação desses miRNAs vem sendo relatada como altamente dependente da abundância do alvo e complementariedade (Arvey et al., 2010). Apesar de evidências mostrarem que os miRNAs em plantas podem adotar a repressão da tradução como mecanismo de silenciamento, a maior parte dos miRNAs conservados atuam em nível pós-transcricional por meio da clivagem dos mRNAs alvos (Brodersen et al., 2008; Todesco et al., 2010; Voinnet, 2009). E ao contrário do que ocorre com os miRNAs em animais, onde ocorre uma baixa complementariedade entre os miRNAs e seus alvos, a clivagem em plantas dependem da quase perfeita complementariedade dos miRNAs com os transcritos alvos correspondentes (Carthew and Sontheimer, 2009; Nozawa et al., 2012)

1.9 MicroRNAs em resposta à patógenos virais em plantas

As plantas desenvolveram mecanismos sofisticados para enfrentar os diversos estresses ambientais a que estão sujeitas, como por exemplo, diversos genes que são regulados por estresses, como seca, salinidade, calor, luminosidade e estresse oxidativo, conferem muitas vezes resistência das plantas a esse determinado estresse (Seki et al., 2002; Zhu, 2002). Estudos recentes demonstram que a expressão e atividade de miRNAs variam em resposta a estresses bióticos e abióticos em plantas (Khraiwesh et al., 2012). A primeira evidência foi obtida por meio de análises *in silico* e de bioinformática com os miRNAs e seus genes alvo, e por clonagem de miRNAs em plantas de *Arabidopsis thaliana* submetidas a estresses, que revelaram novos miRNAs não detectados em experimentos anteriores com plantas condicionadas a ambientes controlados (Jones-Rhoades and Bartel, 2004; Khraiwesh et al., 2012; Sunkar and Zhu, 2004)

Entre os estresses bióticos, as infecções virais podem resultar no desenvolvimento de sintomas como, por exemplo, clorose, necrose, despigmentação, curvamento e enrugamento das folhas e alterações no tamanho e morfologia das plantas, devido à interferência da infecção viral nos processos de desenvolvimento da planta (Feng et al., 2009). Nos últimos anos, vem sendo demonstrado que os miRNAs desempenham um importante papel no desenvolvimento das plantas e em resposta a interações planta-patógeno (Finnegan and Matzke, 2003; Voinnet, 2005). Porém, os mecanismos que controlam tais atividades permanecem desconhecidos.

Algumas proteínas virais, conhecidas como fatores de supressão de silenciamento, interferem no mecanismo de silenciamento da planta hospedeira, alterando atividades celulares, para assim reprimir o silenciamento dos seus genes e favorecer sua própria replicação e propagação. Em begomovírus bipartidos, essas proteínas podem corresponder aos genes AC2, AC4 e AV2 (Chapman et al., 2004a; Chellappan et al., 2005; Vanitharani et al., 2004). Tais supressores de silenciamento podem interferir em importantes processos da planta hospedeira, levando ao desenvolvimento anormal e ao aparecimento de sintomas (Schott et al., 2012).

Sete microRNAs de *Solanum lycopersicum* relacionados com a regulação do desenvolvimento em plantas, com a resposta hormonal e com a própria biogênese dos miRNAs se mostraram com os níveis de acúmulo claramente alterados em tomateiros

infectados com *Cucumber mosaic virus* e *Tomato aspermy virus*, quando comparados com controles inoculados ambos da família *Bromoviridae*, quando comparados com controles inoculados, quantificados por RT-PCR em tempo real (Feng et al., 2009).

Análises do perfil de expressão de dez miRNAs relacionados com desenvolvimento em plantas, por meio de Northern blot, demonstraram um aumento no acúmulo para a maior parte desses miRNAs em *N. benthamiana* infectadas com as quatro espécies de begomovírus: ACMV, CbLCuV, TYLCV e *Cotton leaf curl Multan virus* (CLCuMV) (Amin et al., 2011a). Genes dos mesmos quatro begomovírus, expressos em *N. benthamiana* por meio do vetor viral *Potato virus X* (PVX), foram usados para analisar alterações no perfil de expressão de dez miRNAs também por Northern blot. O gene V2 dos begomovírus monopartidos TYLCV e CLCuMV foi identificado como principal determinante de sintomas, enquanto nos bipartidos ACMV e CbLCuV, mais de um gene parece contribuir com o desenvolvimento de sintomas, refletindo também nos níveis de expressão de miRNAs (Amin et al., 2011b). Tomateiros infectados com ToLCV apresentaram variações significativas de diversas famílias conservadas de miRNAs. O acúmulo dos miRNAs 159 e 172 aumentou, podendo estar relacionados com o progresso da infecção e com os sintomas desenvolvidos pelas plantas infectadas (Naqvi et al., 2010).

CAPÍTULO 2

**REPLICAÇÃO E MOVIMENTO DIFERENCIAL DE ToCMoV EM
LINHAGENS RESISTENTE E SUSCETÍVEL DE TOMATEIRO**

RESUMO

Tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV) é um begomovírus bipartido que infecta culturas de tomate no Brasil. ToCMoV e outros begomovirus do Novo Mundo são compostos por dois componentes de DNA circular de fita simples (conhecidos como DNA-A e DNA-B) que se replicam no núcleo das células infectadas. O DNA-A contém genes relacionados à replicação, transcrição e encapsidação, enquanto o DNA-B possui genes relacionados à movimentação viral. Uma das melhores estratégias para controle da dispersão da doença é o emprego de cultivares resistentes. Recentemente, uma linha quase isogênica de ‘Santa Clara’ (SC) chamada ‘LAM 157’, carregando o gene de resistência *tcm-1*, foi obtida pela Embrapa. O gene *tcm-1* confere resistência a diferentes espécies de begomovírus e é caracterizado pela redução ou ausência de sintomas e restrição do acúmulo viral em plantas infectadas. Este trabalho teve como objetivo estudar o mecanismo de resistência existente em ‘LAM 157’, a fim de verificar se ele está relacionado à replicação ou ao movimento viral a longa distância. Para a análise da replicação viral, *Agrobacterium tumefaciens*, contendo uma repetição parcial em tandem de DNA-A de ToCMoV clonado em pCambia, foi agroinfiltrada a vácuo em plantas suscetíveis SC e resistentes LAM 157. Amostras foram coletadas logo após a infiltração e no segundo, sexto e décimo dia após a agroinfiltração (dai). A replicação viral foi estimada pela avaliação do acúmulo de DNA A de ToCMoV por qPCR nos folíolos infiltrados. A quantidade de DNA viral aumentou com o tempo em todas as plantas infectadas, evidenciando a replicação viral. No entanto, essa quantidade foi estatisticamente menor em LAM 157 a partir de 6 dai. Para a avaliação do movimento viral, um experimento com dupla enxertia foi realizado. Tomateiros SC infectados com ToCMoV foram utilizados como porta-enxerto em dois grupos onde plantas suscetível SC e resistente LAM 157 foram enxertadas. Em ambos os grupos, foi realizado uma segunda enxertia com plantas SC como sobre-enxerto. Foi possível detectar a presença de ToCMoV por PCR nos folíolos apicais do grupo controle, 10 dias após a primeira enxertia. Neste período, não foi detectado vírus no grupo com enxertos de plantas resistentes, evidenciando um atraso no movimento viral. Trinta dias após a segunda enxertia, todas as plantas do grupo controle encontravam-se infectadas, enquanto no grupo com plantas LAM 157, em apenas duas de seis plantas foi detectada a presença do vírus. Os

resultados sugerem que a resistência apresentada pela isolinha LAM 157 se deve a restrição na replicação viral associada a uma menor eficiência no movimento viral.

ABSTRACT

Tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV) is a bipartite begomovirus that infects tomato fields in Brazil. ToCMoV and other begomoviruses from New World are composed by two circular single stranded DNA components (known as DNA-A and DNA-B) that replicate in the nucleus of infected cells. The DNA A contains genes related to viral replication, transcription and encapsidation, while the DNA B harbors genes related with the viral movement. One of the best strategies to control the disease spread is the use of resistant cultivars. Recently, a ‘Santa Clara’ (SC) near-isogenic line named ‘LAM 157’ carrying the resistance locus *tcm-1* was obtained by Embrapa. The broad *tcm-1* locus resistance to different begomovirus species is characterized by the reduction or absence of symptoms and restriction of virus accumulation in infected plants. This work aimed to study the resistance mechanism operating in ‘LAM 157’ in order to verify if it was related to viral replication or with impaired viral movement. To analyze viral replication, *Agrobacterium tumefaciens* containing a partial tandem repeat of ToCMoV DNA-A cloned in pCambia was vacuum-infiltrated in the susceptible cultivar SC and in resistant line ‘LAM 157’ leaves. Samples were collected at the moment of infiltration and two, six and ten days post infiltration (dpi) and viral replication was estimated by evaluating viral DNA accumulation in infiltrated areas by qPCR. The amount of viral DNA increased with time in all the infiltrated plants reflecting viral replication, but it was significantly lower in ‘LAM 157’ from 6 dpi. For evaluation of viral long distance movement, a double grafting experiment was performed. ToCMoV infected SC plants were used as rootstock in two groups where scions of susceptible SC and resistant LAM 157 were grafted. In both, final scions were SC plants. ToCMoV was detected by PCR in apical leaves from control group 10 days after the first grafting. At this time, no virus was detected in resistant graftsd confirming a delay in virus movement. Thirty days after the second grafting, all plants from the control groups were infected, while in the group of LAM 157 intergraft only in two of six plants were detected the presence of virus. The results indicated that the resistant response in “LAM 157” is due the restriction of viral replication, in addition to a lower efficiency of viral movement in these resistant plants.

2.1 INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Begomovirus* pertencem à família *Geminiviridae* e são transmitidas pela mosca-branca *Bemisia tabaci*. Os begomovírus do Novo Mundo apresentam dois componentes de DNA circular fita simples (conhecidos como DNA-A e DNA-B) que se replicam no núcleo das células infectadas. O DNA-A contém genes relacionados à replicação, transcrição e encapsidação viral, enquanto o DNA-B possui genes relacionados à movimentação viral (Brown et al., 2011). Os begomovírus dependem da maquinaria da planta hospedeira para a replicação do próprio DNA e para a movimento sistêmico (Hanley-Bowdoin et al., 2004; Hehnle et al., 2004). *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) é um begomovírus bipartido que infecta culturas de tomate no Brasil. Atualmente os begomovirus são considerados como os patógenos que mais causam prejuízo econômico à cultura do tomate no Brasil e no mundo (Ribeiro et al., 2003; Seal et al., 2006).

A ocorrência de epidemias de doenças virais limita a produção sustentável. No contexto global, a América Latina é a região mais afetada com o maior número de culturas comprometidas e de perdas na produção (Morales and Anderson, 2001). O controle dos geminivírus se baseia essencialmente no uso de tratamento intensivo de inseticidas para o controle do vetor, que afeta diretamente o ecossistema e contribui para o desenvolvimento de resistência a inseticidas nas populações de mosca-branca (Horowitz et al., 2005). Atualmente, o uso de cultivares resistentes produzidos por melhoramento é a melhor opção e com menor custo para reduzir as perdas na produção de tomate (Lapidot and Friedmann, 2002). Quando usadas integradas com outros métodos de controle de pragas, pode garantir o sucesso da produção (Ji et al., 2007b).

Todas as cultivares de tomateiros mais comumente plantadas, não apresentam resistência às begomovirose. No entanto, espécies selvagens do gênero *Solanum* se mostraram resistentes a diferentes espécies de begomovírus e podem servir de fontes de resistência nos programas de melhoramento de tomateiros. Genes de resistência para doenças específicas são ineficazes em várias regiões do mundo, em razão da existência de grande diversidade de espécies de begomovírus que infectam o tomate. Com o desenvolvimento de marcadores moleculares ligados aos genes de resistência, os

melhoristas de plantas podem incorporar eficientemente estes genes em genótipos elite, acelerando assim, a criação de cultivares resistentes (Foolad and Sharma, 2005).

No Brasil, a mais promissora fonte com ampla resistência foi identificada na linhagem de tomate ‘TX-468-RG’ (Santana et al., 2001), resultando na ausência de sintomas e no baixo acúmulo viral quando infectada com diferentes isolados de begomovírus (Garcia-Cano et al., 2008). Essa linhagem é derivada do híbrido *Tyking*, usado em programas de melhoramento, que apresenta um alto nível de resistência a isolados de begomovírus do Velho Mundo (Laterrot, 1995). Testes com ToCMoV revelaram que a resistência apresentada pela linhagem ‘TX-468-RG’ é condicionada pelo *locus* recessivo monogênico nomeado de *tcm-1* (Giordano et al., 2005). Uma linhagem de introgressão de tomate de mesa, nomeada de LAM 157, foi obtida na Embrapa Hortaliças pelo cruzamento da linhagem ‘TX-468-RG’ com a variedade cultivada ‘Santa Clara’. Esta linhagem mostrou-se resistente a infecção de begomovírus bipartidos. No entanto, o mecanismo de resistência envolvido não foi ainda caracterizado.

Como os mecanismos de replicação e movimento são de fundamental importância para a infecção viral (Rojas et al., 2005), ambos foram avaliados na linhagem LAM 157, resistente ao vírus ToCMoV, e na linhagem isogênica suscetível ‘Santa Clara’. A replicação viral foi analisada por meio de agroinfiltração de folíolos com o DNA-A de ToCMoV seguida de quantificação absoluta do acúmulo viral resultante por qPCR no segundo, sexto e décimo dias após a agroinfiltração nas plantas resistente e suscetível. O movimento viral foi avaliado por meio de dupla-enxertia sobre porta enxerto ‘Santa Clara’ infectado com ToCMoV e posterior análise por PCR, para determinar se a resistência conferida pela linhagem LAM 157 impediria a movimentação do vírus a longa distância.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Avaliação do acúmulo de ToCMoV-A em plantas LAM 157 e SC agroinfiltradas

2.2.1.1 Preparo da cultura bacteriana, agroinfiltração a vácuo e coleta e extração das amostras.

Para a análise de replicação viral nas plantas resistente e suscetível, tomateiros da linhagem LAM 157 e ‘Santa Clara’ (SC), com 3 a 4 folhas, foram inoculadas com o ToCMoV-DNA-A por meio de agroinfiltração a vácuo. O preparo da cultura bacteriana de *A. tumefaciens* e a agroinfiltração a vácuo foram realizados de acordo com (Villani et al., 2009). Colônias isoladas de *Agrobacterium tumefaciens* contendo o vetor pCambia-ToCMoV-DNA-A, previamente obtidas por Ribeiro (2006), foram crescidas em pré-inóculos de 50 mL de meio LB líquido suplementado com canamicina (50µg/ml). As colônias foram incubadas a 28°C por 24 horas sob agitação de 180 rpm.

O pré-inóculo foi adicionado a 500 mL de meio LB líquido com canamicina (50 µg/ml) e novamente incubado a 28°C por 24 horas sob agitação a 180 rpm. A cultura resultante foi centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em solução MS-MES (MS com MES 10 mM, pH 5,6) e acetoseringona 150 µM, até atingir a OD₆₀₀ de 0,8 . A suspensão bacteriana foi mantida à temperatura ambiente até o momento da agroinfiltração.

Para a agroinfiltração a vácuo, trinta e três plantas, devidamente numeradas, de cada genótipo estudado (SC e LAM 157) foram posicionadas de forma invertida na solução bacteriana, de modo que toda sua parte apical estivesse submergida na solução, e submetida à pressão negativa (vácuo) de 27 mmHg em câmara de vácuo por cerca de 3 segundos, possibilitando a infiltração da solução bacteriana. Imediatamente após a agroinfiltração, um folíolo localizado na terceira folha foi coletado, como tempo zero, em microtubo de 1,5 mL e armazenado em congelador -80°C para posterior extração do DNA. Além disso, outro folíolo, também localizado na terceira folha de cada uma das plantas, foi marcado para ser coletado no 2º, 6º e 10º dia após a agroinfiltração. Finalizada a agroinfiltração, todas as

plantas foram mantidas em câmara úmida, em casa de vegetação até o término do experimento.

Seguindo o mesmo procedimento de coleta do ponto zero, para cada um dos três pontos após a agroinfiltração (2º, 6º e 10º dia), onze folíolos, de cada genótipo, foram coletados e armazenados em congelador -80°C para posterior extração de DNA.

Para o isolamento de DNA das plantas agroinfiltradas utilizou-se o protocolo modificado do método CTAB (Doyle and Doyle, 1987). Os folíolos coletados e armazenados no congelador -80°C foram macerados com o auxílio de mini-pistilos, até a obtenção de um pó fino. Em seguida, adicionou-se 800 µL do tampão de extração CTAB (NaCl 1,4M; Tris-HCl 100mM; CTAB 2%; EDTA 20mM; β-mercaptoetanol 2%) e 400 µL de Clorofil (Clorofórmio:Álcool Isoamílico – 24:1) aos microtubos, que depois foram incubados a 65 °C por 10 minutos sob agitação. O material foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos. Transferiu-se a fase aquosa superior para novo microtubo contendo 1,2 vezes, referente ao volume transferido, de isopropanol 100%. Centrifugou-se a 12.000 rpm por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* com 500 µl de etanol a 70% centrifugando por 10 minutos a 12000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e secou-se o *pellet* a temperatura ambiente e o DNA foi ressuspendido em 60 µL de TE (Tris 10mM e EDTA 0,1mM) com RNase (100µg/mL).

2.2.1.2 Diluição das amostras de DNA, preparo da curva padrão e quantificação absoluta por PCR quantitativo (qPCR).

A metodologia utilizada no preparo das amostras de DNA das plantas inoculadas, no preparo da curva padrão e na quantificação absoluta por PCR quantitativo foi adotada de acordo com (Mason et al., 2008). Todas as amostras de DNA extraídas dos folíolos coletados nos tempos 0, 2, 6 e 10 foram quantificadas no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Roche) e as concentrações obtidas foram ajustadas primeiramente para 100 ng/µL e posteriormente para a concentração final de 2,3 ng/µL, diluídas em TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM).

Para a quantificação absoluta por qPCR, uma curva padrão, ou curva de diluição seriada, foi preparada com o pCambia-ToCMoV-DNA-A usado na agroinfiltração. Para

tanto, o plasmídeo foi diluído serialmente em 2,3 ng/μL de DNA extraído de plantas sadias, no fator de 1:10, gerando amostras com 10 a 10⁶ cópias, que com base na quantificação inicial foram estabelecidos valores de títulos de cada diluição e suas respectivas concentrações em ng/μL. Para a determinação do número de moléculas foi utilizada a fórmula:

Número de cópias DNA = (y g/μl / [tamanho do plasmídeo em pb x 660]) x 6,022 x 10²³, onde y é a concentração de DNA.

Os *primers* utilizados para a quantificação do ToCMoV-DNA-A, CP1 *forward* (5' TGTCACATCAGAGACGCACA 3') e CP1 *reverse* (5'ACAGGCCCATGTACAGGAAG 3') foram desenhados utilizando o programa Primer 3 (<http://primer3.wi.mit.edu/>) utilizando-se uma região do gene de capa proteica CP, que não se encontrava duplicada no plasmídeo contendo 1,8 cópia do DNA-A. As reações de qPCR, incluindo a quantificação absoluta e a determinação da curva padrão, foram realizadas na F7300 Real Time PCR System (Applied Biosystem) em placas de 96 poços, utilizando-se o reagente Platinum® SYBR® Green RT-qPCR SuperMix-UDG w/ROX (Invitrogen™) composto por um *mix* que contém, com exceção dos *primers* e da fita molde, todos os outros componentes necessários para amplificação e detecção do DNA por qPCR. Todas as reações foram preparadas com 5μL do SuperMix SYBR Green, 0,1μL (0,25μM) de cada *primer* (CP1 *forward* e *reverse*), e 1μL de cada amostra de DNA diluído a 2,24ng. O volume final da reação foi de 10μL. Todas as amostras de DNA foram amplificadas em triplicatas (três repetições técnicas da mesma amostra) e como controle negativo dessas reações utilizou-se o NTC (*No template Control*) composto pelo mesmo *mix* de reação utilizado nas demais amostras com a adição de água MilliQ. A curva padrão foi obtida a partir da regressão linear do valor do ciclo *threshold* (C_T) ou ciclo quantitativo (C_q) de cada uma das triplicatas das amostras de diluição seriada em relação ao log da quantidade total de DNA presente em cada amostra. Sua análise permitiu estabelecer parâmetros como a eficiência dos *primers*, que deve estar entre 90 a 110%, bem como seu coeficiente de correlação (R² - correlação entre a regressão linear e os dados dos pontos da curva). Todas as curvas padrão testadas devem gerar um R² maior ou igual a 0,98. Quanto mais próximo de 1 mais fidedigna é esta correlação. Os ciclos da qPCR consistiram em quatro etapas: 50°C por 2 minutos, 95°C por

10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, e por fim, uma curva de dissociação de 95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos e 95°C por 15 segundos.

Os dados gerados pela qPCR foram analisados utilizando-se o software 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystem) v2.0.4, compatível com o arquivo gerado pelo F7300, pelo método de quantificação absoluta.

2.2.1.3 Análise estatística da concentração viral

Os dados obtidos pela quantificação absoluta em PCR quantitativo, com o número de cópias virais em cada amostra quantificada, foram utilizados para a análise estatística. Para a comparação das linhagens de tomateiro LAM 157 e SC ao longo das coletas, quanto à quantidade de cópias virais acumuladas, utilizou-se a *Analysis of deviance* ou análise de desvio (ANODEV) atribuindo distribuição binomial negativa para a contagem dessas moléculas, sendo que a escolha dessa distribuição deve-se ao fato que os dados experimentais apresentaram grande variabilidade (McCullagh and Nelder, 1989). Essa mesma distribuição foi utilizada para comparar a média geral de moléculas de vírus entre as linhagens, dentro dos tempos de coleta. As análises foram desenvolvidas no *software* de linguagem estatística R de livre acesso (www.r-project.org) (R Core Team, 2012).

2.2.2 Ensaio de restrição da movimento viral a longa distância

2.2.2.1 Inoculação viral via bombardeamento, extração de DNA e confirmação da infecção por PCR.

Para avaliação do movimento viral a longa distância nas linhagens resistente LAM 157 e suscetível SC, foram realizados ensaios envolvendo a técnica de dupla enxertia usando tomateiros SC infectados com ToCMoV como porta-enxertos.

As plantas da linhagem SC, com 3 semanas de idade, foram inoculadas via bombardeamento com o clone infeccioso de ToCMoV-[BA-Se1] (DNA-A e DNA-B) essencialmente como descrito por Ribeiro et al. (2007b).

O preparo dos clones infecciosos foi feito primeiramente com a digestão do DNA-A com a enzima de restrição *Kpn-I* e do DNA-B com *Hind-III* para separar o segmento viral, clonado no vetor pBluescript (pBS). O produto da digestão foi visualizado em gel de agarose 1% em TAE 1X (Tris 40mM, Ácido Acético 20mM, EDTA 1mM) corado com brometo de etídio. Após a confirmação da digestão, as amostras foram ligadas com a enzima T4 DNA ligase Invitrogen™ a 16°C por 20 horas. Por último realizou-se a precipitação das amostras com 2 vezes o volume do produto de etanol absoluto e 10% do volume de Acetato de Sódio (NaAc). O DNA precipitado foi ressuspendido em 100 µL de TE.

Para a precipitação do DNA viral sobre micropartículas de tungstênio, 2µg de cada componente genômico foram misturados a 50 µL de micropartículas de tungstênio em glicerol 50% (60 mg/mL), 50 µL de CaCl₂ (2,5M) e 20 µL de espermidina (0,1M) e incubados à temperatura ambiente sob agitação lenta durante 10 minutos. Centrifugou-se a solução a 12000 rpm por 10 segundos. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se por duas vezes com 150 µL de etanol absoluto. Ao final, foram ressuspendidas em 30 µL de etanol absoluto e 3,2 µL foram distribuídos na região central de cada membrana carreadora previamente posicionada no suporte de membrana (Rech and Arago, 1998). Cada precipitação é suficiente para sete disparos.

Após o bombardeamento, as plantas foram mantidas em bandejas cobertas por plástico transparente por 24 horas e, posteriormente, foram transferidas para casa de vegetação.

O DNA genômico das amostras de tomate SC bombardeadas com o clone infeccioso ToCMoV-[BA-Se1] foi extraído pelo protocolo modificado do método CTAB (Doyle e Doyle, 1987), como descrito no item 2.1.1. O DNA foi secado a temperatura ambiente e ressuspendido em 60 µL de TE (Tris 10mM e EDTA 0,1 mM) com RNase (100 µg/mL). O material foi quantificado pelo espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Roche) e diluído para 100ng/µL.

O DNA total extraído das amostras de tomate SC bombardeadas foram utilizados para amplificação por PCR (*Polymerase chain reaction*) utilizando os pares de *primers* pAR1c496 (5' AATACTGCAGGGCTTYCTRTACATRGG^{3'}) e pAL1v1978 (5' GCATCTGCAGGCCACATYGTCTTYCCNGT^{3'}) degenerados para a detecção de um

segmento do DNA-A de begomovírus (Rojas et al., 1993). A reação de PCR foi feita em um volume final de 50 μ L, contendo 5 μ L do tampão 10X da enzima *Taq Polimerase* (100mM tris-HCl, pH 8.3 e 500mM KCl, Invitrogen™), 2 μ L de $MgCl_2$ (50mM, Invitrogen™), 0,7 μ L de dNTPs (2,5mM, Invitrogen™), 0,7 μ L de cada par de *primer* (10 μ M), 0,3 μ L da enzima *Taq Polimerase* (5U/ μ L, Invitrogen™), 37,6 μ L de água milliQ e 1 μ L de DNA [100ng]. A amplificação foi realizada no termociclador Master Cycler (Eppendorf), sendo submetida a 94°C por 5 minutos, para uma desnaturação inicial, seguida por 35 ciclos de desnaturação 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e um ciclo final de extensão a 72°C por 5 minutos. O produto do PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% em TAE 1X, corado com brometo de etídio.

2.2.2.2 Enxertia de ‘Santa Clara’ (SC) e LAM 157 sadias sobre SC infectadas e sobre-enxertia de SC não infectadas.

Todos os tomateiros ‘Santa Clara’ (SC) inoculados via bombardeamento (porta-enxertos) foram transplantadas para copos de 500 mL um dia após o bombardeamento. As plantas que tiveram a infecção com ToCMoV confirmada por PCR foram selecionadas e divididas em dois grupos: SC/SC/SC (controle) e SC/LAM 157/SC. A primeira enxertia foi realizada no 15º dia após o bombardeamento. No grupo controle SC/SC/SC, plantas do genótipo SC não infectadas foram enxertadas sobre SC infectadas. No grupo SC/LAM 157/SC, plantas do genótipo ‘LAM 157’ não infectadas, foram enxertadas também sobre SC infectadas (Figura 1). Todas as enxertias foram colocadas em câmara úmida com alta umidade relativa para promover a cicatrização do tecido enxertado. A coleta de um folíolo apical com infecção sistêmica, no enxerto, foi realizada no 5º, 10º e 15º dia após a primeira enxertia.

Quinze dias após a primeira enxertia, foi realizada a segunda enxertia ou sobre-enxertia. Em ambos o grupos foram enxertadas plantas SC não infectadas, para avaliar também a passagem do vírus dos primeiros enxertos para SC (Figura 1). As coletas do folíolo com infecção sistêmica das plantas sobre-enxertadas foram realizadas no 5º, 10º, 15º e 30º dia após a segunda enxertia.

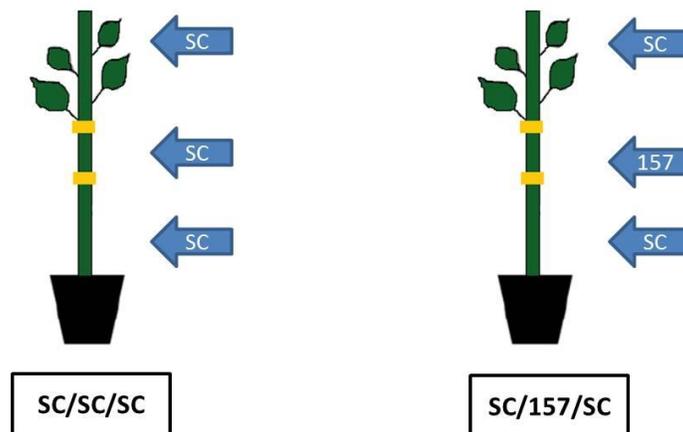


Figura 2.1 – Desenho experimental utilizado no experimento de enxertia dupla. Sobre tomateiros ‘Santa Clara’ (SC) infectados com ToCMoV, foram enxertados tomateiros LAM 157 resistentes no grupo SC/LAM157/SC e tomateiros SC no grupo controle SC/SC/SC. Tomateiros SC saudáveis foram sobre-enxertadas em ambos os grupos. A primeira enxertia foi realizada 15 dias após a inoculação das plantas SC com ToCMoV e a sobre-enxertia foi realizada 15 dias após a primeira enxertia.

2.2.2.3 Detecção viral via tissue blot e via PCR na primeira e segunda enxertia.

Para a detecção de vírus nos porta-enxertos, na primeira e segunda enxertia, foi realizado o teste de *tissue-blot* seguindo a metodologia descrita por Lin et al. (1990). Todas as plantas que serviram de porta-enxerto, imediatamente após o corte com lâminas de bisturi, foram pressionadas de modo firme sobre a superfície de uma membrana nylon (Amersham). Para a fixação e desnaturação do DNA, as membranas foram saturadas com 0,2N de NaOH, seguida de neutralização com 1M de Tris, e SSC 2X, permanecendo por 5 minutos em cada. Em seguida, as membranas foram lavadas com etanol 95% para eliminação da clorofila e secadas a temperatura ambiente. A hibridização foi realizada com sondas marcadas com αP^{32} dCTP específicas para ToCMoV DNA-A, como descrito em (Sambrook et al., 1989).

Todas as reações de PCR dos folíolos coletados após a primeira e segunda enxertia, realizados de acordo com metodologia descrita anteriormente (item 2.2.1), foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em TAE 1X, corado com brometo de etídio.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Avaliação do acúmulo de ToCMoV-A em plantas LAM 157 e SC agroinfiltradas

2.3.1.1 Preparo da curva padrão e quantificação absoluta por meio de PCR quantitativo (qPCR)

A curva padrão utilizada na quantificação absoluta do acúmulo de ToCMoV-A dos folíolos infiltrados foi obtida a partir da diluição do plasmídeo utilizado na agroinfiltração, pCambia-ToCMoV-DNA-A, em solução contendo 2,3 ng/ μ L de DNA extraído de tomateiros SC e LAM 157 sadios, de acordo com Mason et al. (2008). A curva produzida relaciona o valor do ciclo *threshold* (C_T) obtido na quantificação das diluições seriadas, com o número de cópias virais estabelecido pelo cálculo baseado no trabalho de Yun et al. (2006), variando de 10 a 10⁶. Os valores de C_T contra o log da curva padrão produzida gera uma relação linear permitindo determinar o número de cópias virais de ToCMoV-A nas amostras de DNA dos folíolos infiltrados. O coeficiente de correlação R^2 , que corresponde à correlação entre a regressão linear e os dados dos pontos da curva, foi maior ou igual a 0,98 em todas as placas analisadas (Figura 2.2). A eficiência dos *primers* variou entre 90 a 110% e geraram apenas um pico na curva de dissociação, sendo considerados válidos para a utilização na análise de quantificação absoluta (Figura 2.3).

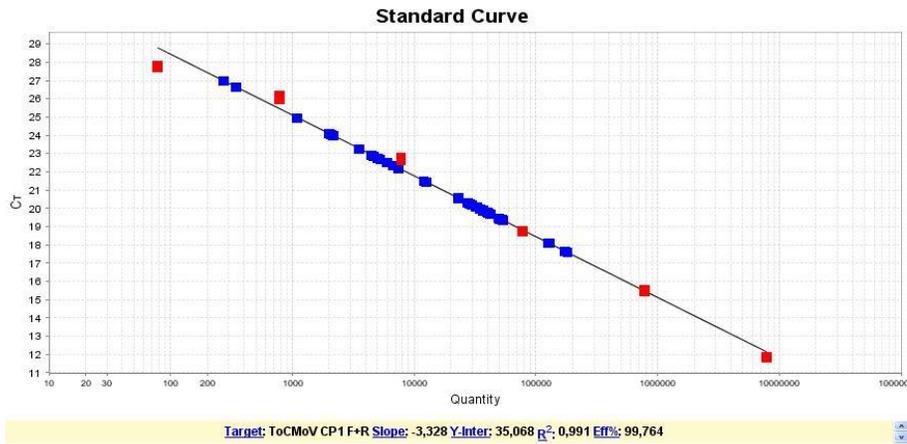


Figura 2.2 – Curva padrão obtida com a diluição seriada do plasmídeo pCambia-ToCMoV-DNA-A. Os pontos azuis indicam a relação entre o valor do ciclo *threshold* (C_T) e o log do número de cópias virais para as amostras de DNA quantificadas. A curva padrão foi preparada com a diluição seriada do plasmídeo em DNA extraído de plantas sadias, no fator de 1:10, gerando amostras com 10 a 10^6 cópias.

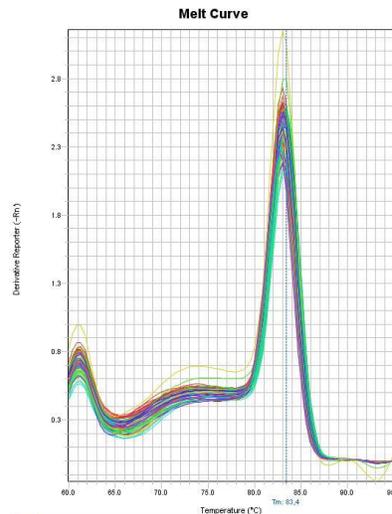


Figura 2.3 – Curva de dissociação obtida para o par de *primers* utilizado, *CPI forward* e *reverse*, mostrando a formação de um único pico, referente à amplificação de um único fragmento específico.

Os valores médios de C_T foram obtidos para cada diluição e para cada amostra como a média aritmética dos C_T das triplicatas. As triplicatas com valores médios de desvio

padrão superiores a 0,5 tiveram a triplicata mais discrepante rejeitada, sendo mantidos os valores mais próximos.

Os dados obtidos a partir da quantificação absoluta, com os valores correspondentes de número de cópias virais em cada triplicata de cada amostra, foram utilizados para a análise estatística.

2.3.1.2 Análise estatística da concentração viral

Os dados gerados na quantificação absoluta em PCR quantitativo, com os valores correspondentes ao número de cópias virais em cada amostra quantificada, foram utilizados para a análise estatística, desenvolvidas no *software* de linguagem estatística R de livre acesso (www.r-project.org) (R Core Team, 2012). Foi utilizada a *Analysis of Deviance* ou análise de desvio (ANODEV) atribuindo distribuição binomial negativa para a contagem dessas moléculas para a comparação das linhagens de tomateiro LAM 157 e SC ao longo das coletas, quanto ao número de cópias virais. A escolha dessa distribuição deve-se ao fato que os dados experimentais apresentaram grande variabilidade (McCullagh and Nelder, 1989).

A quantificação absoluta do número de cópias virais por PCR quantitativo (qPCR) das amostras coletadas imediatamente após a agroinfiltração (tempo 0) e no 2º, 6º, 10º foi realizada a fim de se avaliar o acúmulo de ToCMoV-A em plantas LAM 157 e na linhagem suscetível SC.

No tempo 0 e no 2º dia após a agroinfiltração, foi detectada uma concentração estatisticamente igual de ToCMoV-DNA-A entre as plantas suscetível e resistente. Já no 6º dia, foi possível observar um aumento da carga viral e sendo estatisticamente diferente entre as duas linhagens, e cerca de 50% superior para a linhagem suscetível SC. A taxa máxima de DNA viral foi detectada, para ambas as linhagens, no 10º dia, quando o acúmulo de ToCMoV-DNA-A apresentado por SC foi estatisticamente superior a LAM 157, mantendo a proporção de cerca de 50%. O aumento no acúmulo viral detectado ao longo das coletas, do tempo 0 ao 10º dia após a agroinfiltração, evidencia a ocorrência da replicação viral nas duas linhagens, suscetível e resistente (Figura 2.5). Tais resultados indicam que apesar da replicação viral ocorrer nas plantas resistentes LAM 157, essa é

menos eficiente quando comparada com a linhagem suscetível SC, a partir do 6º dia após a inoculação.

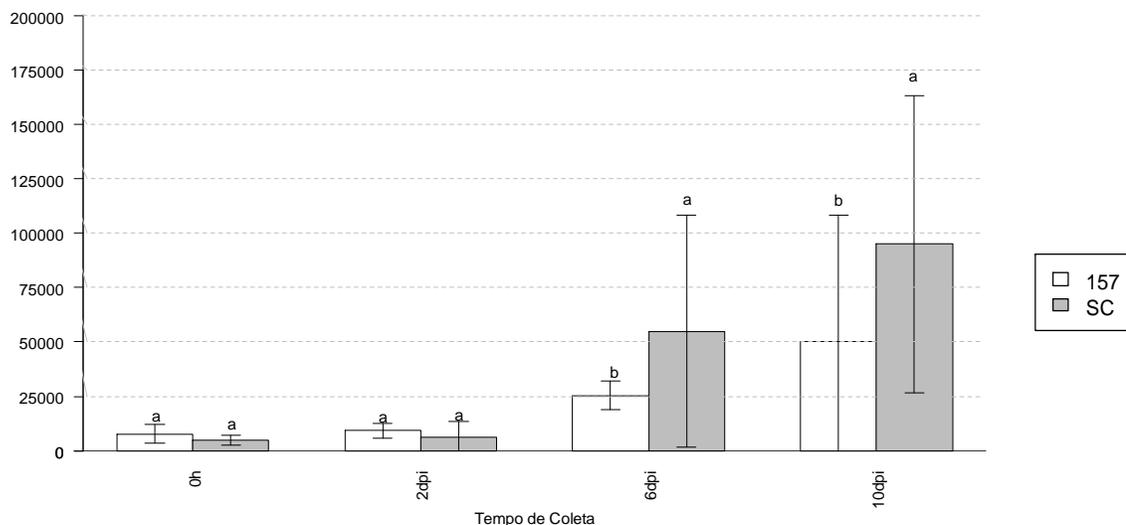


Figura 2.5 – Quantidade média de moléculas de vírus (eixo y) \pm desvio padrão para cada linhagem, ‘Santa Clara’ (SC) e LAM 157 (157), nos tempos de coleta 0, 2, 6 e 10 dias após a infiltração (dpi – eixo x). Letras diferentes indicam que os genótipos, dentro do tempo de coleta, diferem significativamente ($P < 0.05$) segundo os contrastes obtidos no modelo binomial negativo.

2.3.2 Enxertia de tomateiros ‘Santa Clara’ (SC) e LAM 157 sadias sobre tomateiros SC infectadas e sobre-enxertia de tomateiros SC não infectados.

Com o intuito de avaliar se a resistência presente na linhagem LAM 157 atua impedindo a movimentação viral de ToCMoV a longa distância, foi realizado experimento de dupla enxertia. Na primeira enxertia, tomateiros SC, 15 dias após a inoculação com ToCMoV via bombardeamento, foram utilizados como porta-enxertos em dois grupos: grupo controle SC/SC/SC, no qual segmentos de plantas SC foram enxertadas, e SC/LAM157/SC, com plantas LAM 157 resistente enxertadas. Após 15 dias, foi realizada uma segunda enxertia com plantas SC em ambos os grupos para determinar se a linhagem

resistente LAM 157, usada na posição intermediária, seria capaz de impedir ou retardar o movimento entre o porta-enxerto SC infectado e a planta SC sobre-enxertada. Coletas foram realizadas no 5º, 10º e 15º dia após a primeira enxertia e no 5º, 10º, 15º e 30º dia após a segunda enxertia.

No 5º dia após a primeira enxertia, não foi possível detectar a presença do vírus por meio de PCR em nenhuma planta dos dois grupos. Entretanto, no 10º dia foi possível detectar a presença de ToCMoV por PCR em três de seis dos folíolos apicais das enxertias do grupo controle. No mesmo período, não foi detectado vírus no grupo com enxertos de plantas resistentes SC/LAM157/SC, evidenciando um atraso no movimento viral. No 15º dia, cinco das seis enxertias no grupo controle se encontravam infectadas. No grupo SC/LAM157/SC, em quatro plantas do total de seis foi detectada a presença de vírus (Figura 2.6). Tais resultados obtidos com a primeira enxertia sugerem que a linhagem LAM 157 não é capaz de impedir a translocação viral, porém, é responsável por um atraso no movimento viral.

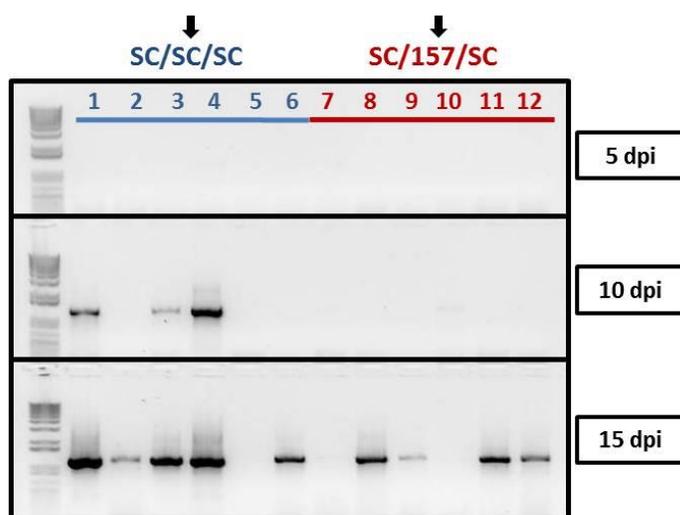


Figura 2.6 –Eletroforese em gel de agarose de fragmentos de ToCMoV amplificados por PCR a partir de DNA extraído dos folíolos dos enxertos coletados 5, 10 e 15 dias após a primeira enxertia. A seta identifica a posição e linhagem das plantas analisadas em cada grupo, Santa Clara (SC) ou LAM 157 (157). Marcador 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen).

Trinta dias após a segunda enxertia, todas as plantas do grupo controle encontravam-se infectadas, enquanto no grupo com plantas LAM 157, em apenas duas das seis sobre-enxertias foi detectada a presença do vírus (Figura 2.7).

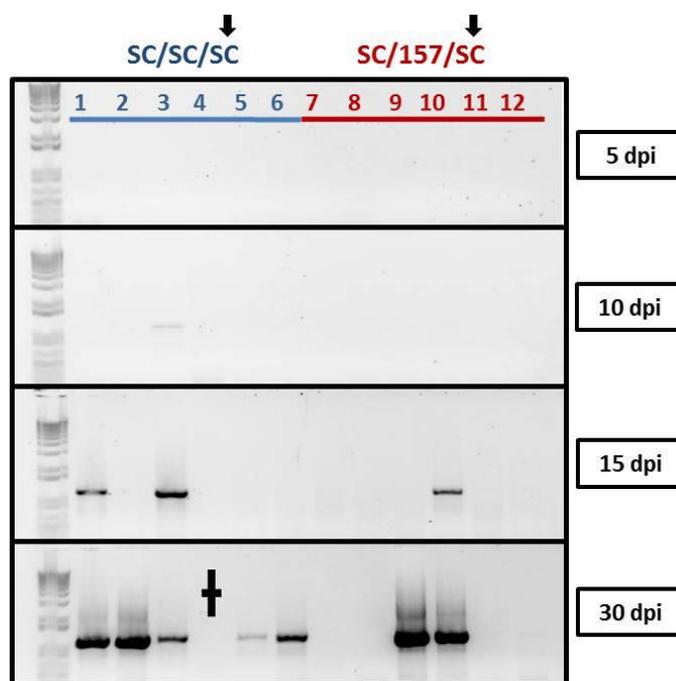


Figura 2.7 – Eletroforese em gel de agarose de fragmentos de ToCMoV amplificados por PCR a partir de DNA extraído dos folíolos dos enxertos coletados 5, 10 e 15 e 30 dias após a segunda enxertia. A seta identifica a posição e linhagem das plantas analisadas em cada grupo, Santa Clara (SC) ou LAM 157 (157). A enxertia 4 do grupo SC/SC/SC, marcada com uma cruz, morreu antes da última coleta ser realizada. Marcador 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen).

2.3.2.1 Detecção viral via tissue blot dos folíolos coletados, na primeira e segunda enxertia.

O tissue blot realizado no momento da primeira enxertia, com o corte das plantas SC infectadas que serviram como porta-enxertos, confirmou a infecção das plantas inoculadas com ToCMoV via bombardeamento, selecionadas para o experimento. O corte das plantas que permaneceram por 15 dias no topo da enxertia, SC e LAM 157 nos grupos

SC/SC/SC e SC/LAM157/SC, respectivamente, revelou que quatro das seis plantas SC encontravam-se infectadas enquanto em apenas uma planta LAM 157 o vírus foi detectado (Figura 2.8). Quando comparado o resultado obtido na análise do *tissue blot* realizado na segunda enxertia e do PCR dos folíolos dessas mesmas plantas, é possível observar que foi detectado um maior número de plantas infectadas por PCR, refletindo a maior eficiência e sensibilidade da amplificação por PCR para a detecção de DNA viral. Todas as plantas que tiveram a infecção confirmada por tissue blot, foram também positivas na amplificação por PCR, que detectou a infecção em um número maior de plantas.

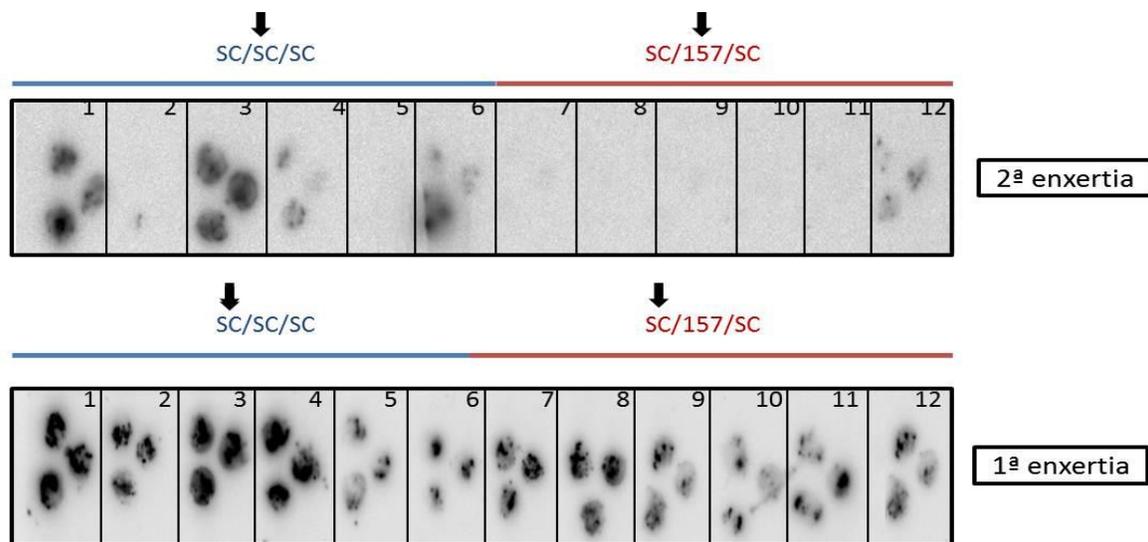


Figura 2.8 – *Tissue blots* de seções de caules de porta-enxertos de tomateiro Santa Clara (SC) infectados (1ª enxertia) e do caule das enxertias que foram cortadas para a 2ª enxertia, sendo essas ‘Santa Clara’ (SC) para o grupo SC/SC/SC e LAM 157 (157) para o grupo SC/157/SC.

2.4 DISCUSSÃO

A identificação e a caracterização de genótipos resistentes são prioridades em programas de melhoramento, assim como, a determinação dos mecanismos de resistência envolvidos, que atuam no processo de restrição à infecção viral. Os processos de replicação e movimento viral são mecanismos fundamentais no ciclo viral e na patogenicidade (Rojas et al., 2005). Alterações nesses processos estão associadas à resistência a geminivírus, resultando, por exemplo, em uma menor eficiência na replicação viral, na restrição do movimento e, até mesmo, afetando simultaneamente esses dois mecanismos (Czosnek et al., 1993; Fargette et al., 1996; Garcia-Cano et al., 2010; Garcia-Neria and Rivera-Bustamante, 2011; Pereira-Carvalho, 2009).

A linhagem resistente de introgressão de tomate de mesa, LAM 157, foi obtida pelo cruzamento da linhagem ‘TX-468-RG’ com a variedade amplamente cultivada ‘Santa Clara’(SC). Estudos anteriores com a linhagem ‘TX-468-RG’ revelaram que plantas infectadas com begomovírus, monopartidos e bipartidos, apresentaram menor acúmulo viral e restrição na translocação viral (Garcia-Cano et al., 2008; Pereira-Carvalho, 2009; Pereira-Carvalho et al., 2010; Santana et al., 2001). Testes com ToCMoV revelaram que a resistência apresentada pela linhagem TX-468-RG é condicionada pelo *locus* recessivo monogênico nomeado de *tcm-1* (Giordano et al., 2005). No presente trabalho, os mecanismos de replicação e movimento viral foram avaliados na linhagem LAM 157, resistente ao vírus ToCMoV e na linhagem suscetível ‘Santa Clara’.

Os geminivírus multiplicam-se em células já diferenciadas, porém, não possuem uma polimerase própria. Desse modo, para a replicação do DNA viral, desenvolveram mecanismos que reativam a maquinaria de replicação nas células do hospedeiro para promover a própria replicação (Gutierrez, 1999; Gutierrez et al., 2004; Hanley-Bowdoin et al., 2000). A taxa de replicação viral é um parâmetro importante para a avaliação e seleção de genótipos resistentes (Garcia-Neria and Rivera-Bustamante, 2011).

A fim de se avaliar a replicação de ToCMoV-A em plantas LAM 157 e na linhagem suscetível SC, foi realizada a quantificação absoluta do número de cópias virais por PCR quantitativo (qPCR) das amostras coletadas no 2º, 6º, 10º e imediatamente após a agroinfiltração (tempo 0). Devido a sua maior sensibilidade quando comparadas com outras

técnicas, como o PCR convencional, hibridização molecular e métodos sorológicos; o uso do qPCR na quantificação de infecções virais em plantas vem sendo utilizado com frequência (Fabre et al., 2003; Korimbocus et al., 2002; Mason et al., 2008; Mumford et al., 2004). A quantificação do begomovírus *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* em tomateiros demonstrou que o PCR em tempo real é até 2200 vezes mais sensível que a hibridização em membranas, possibilitando, com isso, a detecção de até 10 cópias virais em uma amostra (Mason et al., 2008). A quantidade de DNA viral aumentou com o tempo em todas as plantas infectadas, evidenciando a replicação viral. Os valores de cópias virais detectadas nos tempos 0 e 2 foram estatisticamente iguais nas duas linhagens, e estatisticamente diferentes nos tempos 6 e 10, sendo cerca de 50% superior na linhagem suscetível SC. Tais resultados indicam que, apesar da replicação viral ocorrer nas plantas resistentes LAM 157, esta é menos eficiente quando comparada à linhagem suscetível SC, a partir do 6º dia após a inoculação. Para eliminar a influência do movimento viral a longa distância e de célula-a-célula, o DNA-A de ToCMoV foi infiltrado isoladamente. Apesar de Galvão et al. (2003) e Fontenelle et al. (2007) terem demonstrado que o DNA-A do isolado ToCMoV-[MG-Bt1], inoculado por biobalística, foi capaz de infectar sistemicamente *Nicotiana benthamiana* e *S. lycopersicum* sem a presença do DNA-B, Ribeiro et al. (2007b) observaram que, após a inoculação também via biobalística do DNA-A e do DNA-B de ToCMoV-[BA-Se1] isoladamente, não foi verificada a presença do DNA viral e de sintomas sistêmicos. Isso indica que é necessária a presença de ambos os componentes de ToCMoV-[BA-Se1] para que a infecção sistêmica seja estabelecida. Considerando que a resistência na linhagem LAM 157 é conferida pelo locus recessivo *tcm-1* e que os begomovírus dependem da maquinaria do hospedeiro para promover a própria replicação (Gutierrez, 1999; Gutierrez et al., 2004; Hanley-Bowdoin et al., 2000), é possível que o locus *tcm-1*, por mecanismos ainda desconhecidos, possa afetar essa interação entre as proteínas de replicação de geminivírus, Rep e REn, com os diversos fatores relacionados com a reprogramação do ciclo celular com os quais interagem (Hanley-Bowdoin et al., 2004), diminuindo assim a eficiência do ciclo de replicação viral.

O mecanismo de movimento dos begomovírus envolve diferentes genes virais e é mediado por proteínas que facilitam a passagem do vírus pelos limites e barreiras celulares. Essa etapa é essencial para o acúmulo viral sistêmico e para o desenvolvimento de

sintomas. A restrição da translocação pode ser um resultado do bloqueio da entrada no floema, pela inibição de fatores do hospedeiro necessários para a movimentação ou, ainda, pela limitação do movimento viral no floema em resposta do hospedeiro ao reconhecimento do vírus (Hull, 2002; Pereira-Carvalho, 2009). No experimento de dupla enxertia com LAM 157, foi possível detectar a presença de ToCMoV por PCR nos folíolos apicais do grupo controle SC/SC/SC 10 dias após a primeira enxertia. No mesmo período, não foi detectado vírus no grupo com enxertos de plantas resistentes, evidenciando um atraso no movimento viral. Trinta dias após a segunda enxertia, todas as plantas do grupo controle encontravam-se infectadas, enquanto no grupo com plantas LAM 157, em apenas duas de seis plantas, foi detectada a presença do vírus.

O híbrido *Tyking* é constantemente usado em programas de melhoramento e apresenta um alto nível de resistência a isolados de begomovírus (Laterrot, 1995). A resistência de *Tyking* foi avaliada por meio de inoculações por enxertia e de estudos sorológicos, revelando que a resistência em *Tyking* leva a uma restrição no movimento do vírus pelo floema (Fargette et al., 1996). A linhagem FLA653, derivada do cruzamento entre o híbrido *Tyking* e *S. chilense* e apresenta o alelo recessivo *tgr-1*, mostrou-se resistente ao begomovírus *Tomato leaf curl virus* (TLCV) com ausência de acúmulo viral após agroinoculação e com a restrição do movimento viral em experimentos de dupla-enxertia (Bian et al., 2007). Na linhagem ‘TX-468-RG’ contendo o *locus* recessivo *tcm-1*, também derivada do híbrido *Tyking*, e um dos parentais da LAM 157, foi observada uma redução do acúmulo e da translocação viral em plantas infectadas com o begomovírus monopartido *Tomato yellow leaf curl virus-Israel* (TYLCV-IL) (Pereira-Carvalho, 2009). Com isso, os resultados obtidos com menor acúmulo e restrição no movimento viral de begomovírus tanto em bipartidos como em monopartidos podem estar ligados a fatores de resistência herdados do híbrido *Tyking*, e o mesmo parece ocorrer na linhagem LAM 157 em infecções com ToCMoV. Além disso, Hutton et al. (2012) sugerem que seja possível que os alelos recessivos *tgr-1*, *tcm-1*, e o mais recentemente descoberto, o *locus* de resistência recessiva *ty-5*, correspondam ao mesmo alelo derivado do híbrido *Tyking*, ainda não mapeado. Estudos adicionais envolvendo marcadores moleculares para o *locus tcm-1* deverão resolver essa questão.

A infecção sistêmica é considerada como a soma de diversos processos, tais como replicação, movimento, resposta do hospedeiro e reações de combate à defesa viral. No entanto, até o momento, não é possível isolar o mecanismo de infecção sistêmica dos outros processos, incluindo o de replicação (Ueki and Citovsky, 2007). Portanto, é possível que a translocação do vírus seja similar em ambas as linhagens, apesar de a maior eficiência na replicação torne a propagação viral mais rápida nas plantas suscetíveis, como foi sugerido para as linhagens de pimenta resistente à begomovírus e de damasco resistente à Potyvírus (Garcia-Neria and Rivera-Bustamante, 2011; Ion-Nagy et al., 2006).

Em conclusão, os resultados deste trabalho indicam que a resistência conferida pelo locus *tcm-1* na linhagem LAM 157 manifesta-se por meio da restrição na replicação viral, em associação a uma menor eficiência no movimento viral, resultando em um menor acúmulo do vírus nos tecidos do hospedeiro e na ausência ou atenuação dos sintomas nas plantas infectadas.

CAPÍTULO 3

**ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE MICRORNAs EM
LINHAGENS RESISTENTE E SUSCETÍVEL DE TOMATEIRO**

RESUMO

Tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV), é eficientemente transmitido pela mosca-branca *Bemisia tabaci*, e um dos principais begomovírus que afetam a cultura do tomateiro no Brasil. Plantas infectadas com ToCMoV geralmente desenvolvem sintomas de clorose internerval, manchas cloróticas e mosqueado amarelo. LAM 157 é uma linhagem quase isogênica da cultivar 'Santa Clara' (SC) contendo o locus recessivo monogênico *tcm-1*. A resistência é manifestada por uma redução ou ausência de sintomas e um acúmulo viral reduzido. MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs endógenos que regulam a expressão de diversos genes que estão envolvidos com muitos processos biológicos fundamentais. Para verificar uma possível expressão diferencial de miRNAs em tomateiros inoculados com ToCMoV, foram analisados o acúmulo de miRNAs previamente associados com o desenvolvimento da planta e miRNAs relacionados com as respostas à estresse. Plantas suscetíveis de SC e de plantas resistentes da linhagem 'LAM 157' foram inoculados por bombardeamento de partículas com clone infeccioso de ToCMoV. Ácidos nucleicos totais foram isolados a partir de folhas apicais com infecção sistêmica, 17 dias após a inoculação, e separados em gel desnaturante de poliacrilamida. Foram realizados Northern blots utilizando como sondas oligonucleótidos complementares aos miRNAs, marcados com $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP na extremidade 5'. A quantidade de miRNAs 159, 164, 168 e 172 (previamente associados com o desenvolvimento da planta) acumulada pelas plantas controle, foi comparada nas plantas SC e 'LAM 157' infectadas com ToCMoV. Os resultados mostraram um acúmulo diferencial de miRNAs entre plantas resistentes e suscetíveis, infectadas e controles inoculados. Estes resultados sugerem que a expressão dos miRNAs da planta hospedeira pode ser afetada em consequência da infecção por ToCMoV e podem refletir diferenças na intensidade da expressão de sintomas, bem como nos níveis de resistência ao vírus.

ABSTRACT

Tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV), member of the genus *Begomovirus*, is efficiently transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci* and one of the begomovirus species affecting tomatoes in Brazil. Plants infected with ToCMoV generally develop symptoms of vein chlorosis, chlorotic spots, and mottling. LAM 157 is a ‘Santa Clara’ near isogenic tomato line containing the monogenic recessive gene *tcm-1*. The resistance is manifested by either reduction or absence of symptoms and reduced viral accumulation. MicroRNAs (miRNAs) are small endogenous RNAs that regulate the expression of several genes that are involved in many important biological processes. To verify a possible differential expression of miRNAs in tomato inoculated with ToCMoV, the accumulation of miRNAs previously reported to be related to plant development and with stress responses was studied. Susceptible ‘Santa Clara’ (SC) plants and resistant ‘LAM 157’ plants were inoculated by particle bombardment with infectious clone of ToCMoV. Total nucleic acids were isolated from systemically infected leaves 17 days post inoculation and loaded in denaturing polyacrylamide gel. Northern blots were performed using as probes gamma³²P- γ ATP end-labeled oligonucleotides complementary to miRNAs. The amount of miRNAs 159, 164, 168 and 172 (previously related with plant development) accumulated by control plants of SC and ‘LAM 157’ was compared with those in ToCMoV-infected plants. The results showed differential accumulation of miRNAs between infected susceptible and resistant plants and mock-inoculated controls. These results suggest that the expression of host miRNAs can be affected as a result of ToCMoV infection and may reflect differences in symptom expression intensity as well as in the levels of virus resistance.

3.1 INTRODUÇÃO

Os *Begomovirus*, pertencentes à família *Geminiviridae*, apresentam DNA circular fita simples, composto por um ou dois componentes genômicos denominados DNA-A e DNA-B, com aproximadamente 2,6 Kb cada (ICTV). *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) é um membro bipartido do gênero begomovírus que infecta tomateiros causando severas perdas na produção (Ribeiro et al., 2007a).

O controle das begomoviroses se baseia geralmente no controle da população de *Bemisia tabaci* com o uso de grandes volumes de inseticida, afetando diretamente o ecossistema e contribuindo para o desenvolvimento de resistência a pesticida nas populações de mosca-branca (Horowitz et al., 2005). A maneira mais eficiente e com o menor custo para o controle de begomoviroses é o uso de plantas resistentes, que podem garantir o sucesso da produção (Ji et al., 2007b). LAM 157 é uma linhagem quase isogênica da cultivar 'Santa Clara' (SC) contendo o locus recessivo monogênico *tcm-1*. A resistência é manifestada por uma redução ou ausência de sintomas e uma redução significativa no acúmulo viral nos tecidos infectados. Os mecanismos de resistência envolvidos no processo ainda não foram caracterizados, no entanto, recentemente, alteração nos padrões de expressão de microRNAs endógenos nos tecidos infectados vem sendo associados a diversos mecanismos de defesa de plantas à infecção por fitopatógenos.

Os microRNAs formam uma classe de pequenos RNAs não codantes e endógenos, com 20 a 24 nucleotídeos, que desempenham papel fundamental na regulação da expressão gênica em eucariotos (Naqvi et al., 2012; Voinnet, 2009). Em plantas, estão relacionados com diversas funções biológicas, como a morfogênese das folhas, transição de fase de desenvolvimento, regulação hormonal, desenvolvimento de flores e raízes e respostas a estímulos bióticos e abióticos (Aukerman and Sakai, 2003; Chen, 2004; Kidner and Martienssen, 2004; Kidner and Martienssen, 2005). Em 2002, 16 miRNAs foram descritos em *Arabidopsis thaliana*, muitos deles apresentando expressão diferencial durante o desenvolvimento da planta (Reinhart et al., 2002). Desde então, diversos miRNAs foram identificados em diferentes espécies de plantas.

Estudos recentes demonstram que a expressão e atividade de miRNAs variam em resposta a estresses bióticos e abióticos em plantas (Khraiwesh et al., 2012). Entre os

estresses bióticos, as infecções virais podem resultar no desenvolvimento de diversos sintomas devido à interferência da infecção viral nos processos de desenvolvimento da planta (Feng et al., 2009).

Algumas proteínas virais, conhecidas como fatores de supressão de silenciamento, interferem no mecanismo de RNA interferente (RNAi) da planta hospedeira, alterando atividades celulares, para assim reprimir o silenciamento dos seus genes e favorecer sua própria replicação e propagação. Em begomovírus bipartidos, essas proteínas podem corresponder aos genes AC2, AC4 e AV2 (Chapman et al., 2004a; Chellappan et al., 2005; Vanitharani et al., 2004). Tais supressores de silenciamento podem interferir em importantes processos da planta hospedeira, levando ao desenvolvimento anormal e ao aparecimento de sintomas (Schott et al., 2012). O estudo do acúmulo de microRNAs mediante a infecção viral possibilita a associação de miRNAs específicos com os mecanismos envolvidos na patogenicidade dos vírus, além da caracterização da resposta das diferentes linhagens à infecção viral.

Para verificar um possível envolvimento de miRNAs na expressão dos sintomas em tomate inoculados com ToCMoV, o acúmulo de miRNAs previamente associados com o desenvolvimento da planta e com as respostas ao estresse foram analisados. Plantas suscetíveis da cultivar SC e de plantas resistentes da linha 'LAM 157' foram inoculados por bombardeamento de partículas com clones infecciosos de ToCMoV. Ácidos nucleicos totais foram isolados a partir de folhas superiores, 17 dias após a inoculação, e separados em gel de poliacrilamida. Foram realizados Northern blots utilizando como sondas oligonucleótidos complementares aos miRNAs, marcados com $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP. A quantidade de miRNAs 159, 164, 168 e 172 acumulada pelas plantas controle, foram comparadas entre as plantas SC e 'LAM 157' infectadas com ToCMoV.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Análise do perfil de expressão de microRNAs em linhagens resistente e suscetível de tomateiro.

3.2.1.1 Inoculação de tomateiros ‘Santa Clara’ (SC) e LAM 157 com ToCMoV via bombardeamento.

O experimento foi realizado em casa de vegetação, câmara de crescimento e no laboratório na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Foi utilizada a cultivar de tomateiro suscetível ‘Santa Clara’ (SC) como controle e a linhagem resistente LAM 157. As plantas foram germinadas em casa de vegetação e após a inoculação via bombardeamento com ToCMoV, foram transferidas para câmara de crescimento com condições de luz e temperatura controladas.

Para avaliação do perfil de expressão de microRNAs nas linhagens LAM 157 e SC, plantas de ambas linhagens, com 3 semanas de idade, foram inoculadas via bombardeamento com o clone infeccioso de ToCMoV-[BA-Se1] (DNA-A e DNA-B), essencialmente como descrito por Ribeiro et al. (2007b).

O preparo dos clones infecciosos foi feito primeiramente com a digestão do DNA-A com a enzima de restrição *Kpn-I* e do DNA-B com *Hind-III* para separação do segmento viral do vetor de clonagem pBluescript (pBS). O produto da digestão foi visualizado em gel de agarose 1% em TAE 1X (Tris 40mM, Ácido Acético 20mM, EDTA 1mM) corado com brometo de etídio. Após a confirmação da digestão, as amostras foram ligadas com a enzima *T4 DNA ligase* Invitrogen™ a 16°C por 20 horas. Por último realizou-se a precipitação das amostras para o volume final de 400 µL com 2 vezes o volume da solução de etanol absoluto e 10% do volume de Acetato de Sódio (NaAc). O DNA precipitado foi ressuspendido em 100 µL de TE.

Para a precipitação do DNA viral sobre micropartículas de tungstênio, 2µg de cada componente genômico foram misturados a 50 µL de micropartículas de tungstênio em glicerol 50% (60 mg/mL), 50 µL de CaCl₂ (2,5M) e 20 µL de espermidina (0,1M) e incubados à temperatura ambiente sob agitação lenta durante 10 minutos. Centrifugou-se a

solução a 12000 rpm por 10 segundos. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o precipitado por duas vezes com 150 µL de etanol absoluto. Ao final, foram ressuspensos em 30 µL de etanol absoluto e 3,2 µL foram distribuídos na região central de cada membrana carreadora previamente posicionada no suporte de membrana (Rech and Aragao, 1998). Cada precipitação foi suficiente para sete disparos.

Para que a comparação dos resultados obtidos, permitissem identificar apenas os efeitos relacionados à infecção viral, e não também ao estresse causado pelo processo de bombardeamento, plantas de ‘Santa Clara’ e LAM 157 foram bombardeadas com o plasmídeo do vetor pBluescript (pBS) na concentração de 2µg, em cada precipitação, para servir como grupo controle. Após o bombardeamento, as plantas foram mantidas por 24 horas cobertas por plástico transparente e depois foram transferidas para câmara de crescimento com condições de luz e temperatura controladas..

3.2.1.2 Extração de DNA de tomates ‘Santa Clara’ (SC) e LAM 157 inoculados via bombardeamento e confirmação da infecção por PCR.

Dezessete dias após a inoculação com ToCMoV dos tomates ‘Santa Clara’ (SC) e LAM 157 via bombardeamento, folíolos jovens foram coletados na parte apical das plantas para posterior confirmação por PCR da infecção ou da ausência de infecção, nas plantas inoculadas com pBS, e extração de ácidos nucleicos totais. Todas as amostras coletadas foram transportadas em nitrogênio líquido e armazenadas em congelador -80°C.

Para o isolamento de DNA, foi utilizado um dos folíolos coletados, e realizou-se o protocolo modificado do método CTAB (Doyle and Doyle, 1987). Os folíolos coletados e armazenados no refrigerador -80°C foram macerados dentro de microtubos, com o auxílio de mini-pistilos, até a obtenção de um pó fino. Em seguida, adicionou-se 800 µL do tampão de extração CTAB (NaCl 1,4M; Tris-HCl 100mM; CTAB 2%; EDTA 20mM; β-mercaptoetanol 2%) e 400 µL de Clorofil (Clorofórmio:Álcool Isoamílico – 24:1) aos microtubos, que depois foram incubados a 65 °C por 10 minutos sob agitação. O material foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos. Transferiu-se a fase aquosa superior para novo microtubo contendo 1,2 vezes, referente ao volume transferido, de isopropanol 100%.

Centrifugou-se a 12.000 rpm por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* com 500 µl de etanol a 70% centrifugando por 10 minutos a 12000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e secou-se o *pellet* a temperatura ambiente e o DNA foi ressuspendido em 60 µL de TE (Tris 10mM e EDTA 0,1mM) com RNase (100µg/mL).

O DNA total extraído dos folíolos coletados de tomateiros SC e LAM 157 bombardeados foram utilizados para amplificação por PCR (*Polymerase chain reaction*) utilizando os pares de *primers* pAR1c496 (5' AATACTGCAGGGCTTYCTRTACATRGG3') e pAL1v1978 (5' GCATCTGCAGGCCACATYGTCTTYCCNGT3') degenerados para a detecção de um segmento do DNA-A de begomovirus (Rojas et al., 1993). A reação de PCR foi feita em um volume final de 50 µL, contendo 5 µL do tampão 10X da enzima *Taq Polimerase* (100mM tris-HCl, pH 8.3 e 500mM KCl, Invitrogen™), 2 µL de MgCl₂ (50mM, Invitrogen™), 0,7 µL de dNTPs (2,5mM, Invitrogen™), 0,7 µL de cada par de *primer* (10µM), 0,3 µL da enzima *Taq Polimerase* (5U/µL, Invitrogen™), 37,6 µL de água milliQ e 1 µL de DNA [100ng]. A amplificação foi realizada no termociclador Master Cycler (Eppendorf), sendo submetida a 94°C por 5 minutos, para uma desnaturação inicial, seguida por 35 ciclos de desnaturação 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e um ciclo final de extensão a 72°C por 5 minutos. O produto do PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% em TAE 1X, corado com brometo de etídio.

3.2.1.3 Extração e análise qualitativa e quantitativa de Ácidos nucleicos totais dos folíolos coletados 17 dias após o bombardeamento.

Para a extração de Ácidos nucleicos totais utilizou-se o protocolo modificado de extração de RNA de Chang et al. (1993). Foram utilizadas as seguintes soluções: Tampão de extração CTAB (2% CTAB, 2% polivinilpirrolidona (PVP; 30000), 100mM Tris-HCl pH 8.0, 25mM EDTA, 2M NaCl, 0,5g/L espermidina), Clorofil (Clorofórmio:Álcool Isoamílico – 24:1), Isopropanol (100%) e Etanol 70% a -20°C. O tampão de extração CTAB foi autoclavado a 120°C por 20 minutos.

Cerca de 3g dos folíolos coletados e armazenados previamente em congelador - 80°C foram macerados em almofariz pré-refrigerado, até a obtenção de um pó fino e homogêneo. Todo o processo de maceração foi feito com o tecido em nitrogênio líquido. O pó obtido foi transferido rapidamente para tubos Falcon de 50 mL, pré-refrigerados e pré-nomeados, até se alcançar a marca de 5 mL. Os tubos foram colocados novamente em nitrogênio líquido e mantidos até o momento de serem utilizados.

O tampão de extração CTAB foi pré-aquecido a 65°C em banho-maria. Beta-mercaptoetanol foi adicionado na concentração final de 2% ao tampão imediatamente antes do uso. Foram adicionados em cada tubo Falcon 20 mL do tampão de extração CTAB pré-aquecido, homogeneizado com o auxílio de um agitador do tipo vórtex e incubados em banho-maria a 65°C por 15 minutos. Em seguida adicionou-se 15 mL de clorofil, após nova homogeneização, foram então centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. A fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo Falcon de 50 mL e, 15 mL de clorofil foram adicionados, novamente agitados no vórtex e centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. À fase aquosa superior foi adicionado um volume equivalente de isopropanol 100%, sendo então incubado por 2 horas no congelador -20°C para que ocorresse a precipitação. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 30 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e ao *pellet* foram adicionados 5 mL de etanol 70% gelado. Centrifugou-se a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C e em seguida descartou-se o sobrenadante. Após cerca de aproximadamente 15 minutos, em temperatura ambiente, o *pellet* foi ressuspenso em 100 µL de H₂O milliQ.

Para a avaliação quantitativa das amostras foi feita a espectrofotometria do ácido nucleico total a 260nm, utilizando o espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). A pureza foi confirmada com a relação 260/280nm entre 1,9 e 2,0 U.A. (Unidade de Absorbância) indicando que as amostras estavam com grau de pureza adequado e, portanto, passíveis de serem utilizadas nos próximos procedimentos.

Para a avaliação qualitativa, quanto à integridade do material extraído, foi feita a análise por eletroforese em gel de agarose 1,0%, não desnaturante, corado com brometo de etídio, com tampão de corrida TAE 1X e voltagem de 80V por aproximadamente 40 minutos.

3.2.1.4 Eletroforese dos Ácidos nucleicos totais em gel desnaturante de acrilamida 15% e transferência para membrana.

Para a análise das amostras em gel de acrilamida 15%, todas as amostras de ácidos nucleicos totais, coletadas dos folíolos bombardeados de SC e LAM 157, foram utilizadas para formar amostras combinadas (*pools*). Dois *pools* foram formados para cada linhagem inoculada com ToCMoV (SC e LAM 157) e um *pool* foi formado para cada linhagem inoculada com o vetor pBS, cada um contendo ácidos nucleicos totais extraídos de duas plantas, com 20µg de cada uma totalizando 40µg em cada *pool*.

As amostras de ácidos nucleicos totais foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante de acrilamida 15%, preparado com as seguintes soluções: 14,9 mL de acrilamida (19:1) 40% (Bio-Rad), 16,8g de uréia (Sigma), 4 mL de TBE 10x (Tris Base 0,89M, ácido bórico 0,89M, EDTA 0,02M) e água milliQ autoclavada suficiente para completar o volume final de 40 mL. Para a polimerização do gel foram adicionados 320 µL de persulfato de amônio (APS) 10% e 42,6 µL de TEMED (Tetra-metil-etilenodiamina).

Anteriormente a aplicação das amostras de ácidos nucleicos totais, foi feita uma pré-corrída a voltagem constante de 200V (± 20 mA) por 1 hora. As amostras foram preparadas da seguinte forma: em 40µg de ácidos nucleicos totais adicionou-se o mesmo volume de cada amostra com o tampão RNA *loading gel buffer* (Ambion). Em seguida, as amostras foram desnaturadas a 95°C durante 5 minutos e colocadas imediatamente no gelo para evitar a renaturação. Após esses procedimentos, as amostras foram aplicadas no gel de poliacrilamida e separadas por eletroforese também à voltagem constante de 220V (± 30 mA) durante cerca de 3 horas.

Ao final da eletroforese, os géis foram fotografados em transiluminador com luz UV, os RNAs foram transferidos para uma membrana de nylon Hybond+ (Amersham) por um sistema de transferência semi-seca em equipamento de transferência apropriado (*Transfer semi-dry* Bio-Rad). A transferência foi feita em TBE (Tris-Borato 0.9M, EDTA 0.01M, pH 8.3) 0,5X, a 200mA, durante 2 horas e 30 minutos. Posteriormente, a membrana foi fixada em forno à 80°C por 2 horas.

3.2.1.5 Marcação de sondas de oligonucleotídeos com $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP e hibridização.

Oligonucleotídeos complementares aos miRNAs de *Solanum lycopersicum* miR159, miR164, miR168 e miR172 foram marcados radioativamente na extremidade 5' com $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP utilizando-se a enzima T4 polinucleotideo quinase (New England Biolabs) e purificados em colunas G25 (GE healthcare). As sequências dos oligonucleotídeos usados estão listadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Nome e sequência dos oligonucleotídeos utilizados como sondas para a identificação de miRNAs em tomateiros.

miRNA	Sequência
miR159	5'TAGAGCTCCCTTCAATCCAAA ^{3'}
miR164	5'TGCACGTGCCCTGCTTCTCCA ^{3'}
miR168	5'TTCCCGACCTGCACCAAGCGA ^{3'}
miR172	5'ATGCAGCATCATCAAGATTCT ^{3'}

A hibridização das membranas foi precedida de uma pré-hibridização durante 30 minutos a 40°C com o tampão de hibridização *Ultraspeed-oligo buffer*. Em seguida, foi adicionada a sonda radioativa, procedida pela hibridização durante a noite a 40°C. Após este período, as membranas foram lavadas 2 vezes a 40°C durante 30 minutos cada, com tampão de lavagem SSC 2X (Citrato de Sódio 30mM; NaCl 0,3M; pH 7) contendo SDS a 0,5%. Em seguida, as membranas foram seladas e expostas em cassetes (Image Plate-Fujifilm) e reveladas no Scanner FLA-3000. Todas as membranas foram hibridizadas com o sRNA constitutivo U6, usado como controle de carregamento.

3.2.1.6 Análise da concentração de microRNAs em SC e LAM 157 infectados com ToCMoV.

A intensidade das bandas foi quantificada por meio do software Image J versão 1.32j (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). A intensidade obtida na quantificação do sRNA U6 foi usada para a normalização dos dados obtidos em cada banda. O valor de densidade encontrado para a banda correspondente aos miRNAs de plantas não infectadas foi definido como 1, e o valor de densidade das bandas de plantas infectadas foi calculado relativo a esse valor.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Análise do perfil de expressão de microRNAs em linhagens resistente e suscetível de tomateiro inoculadas com ToCMoV.

Dezessete dias após a inoculação via bombardeamento com ToCMoV, as plantas SC apresentavam fortes sintomas de enrolamento foliar e clorose internerval, enquanto as plantas LAM 157 variaram de sintomas leves a ausência de sintomas (Figura 3.1).

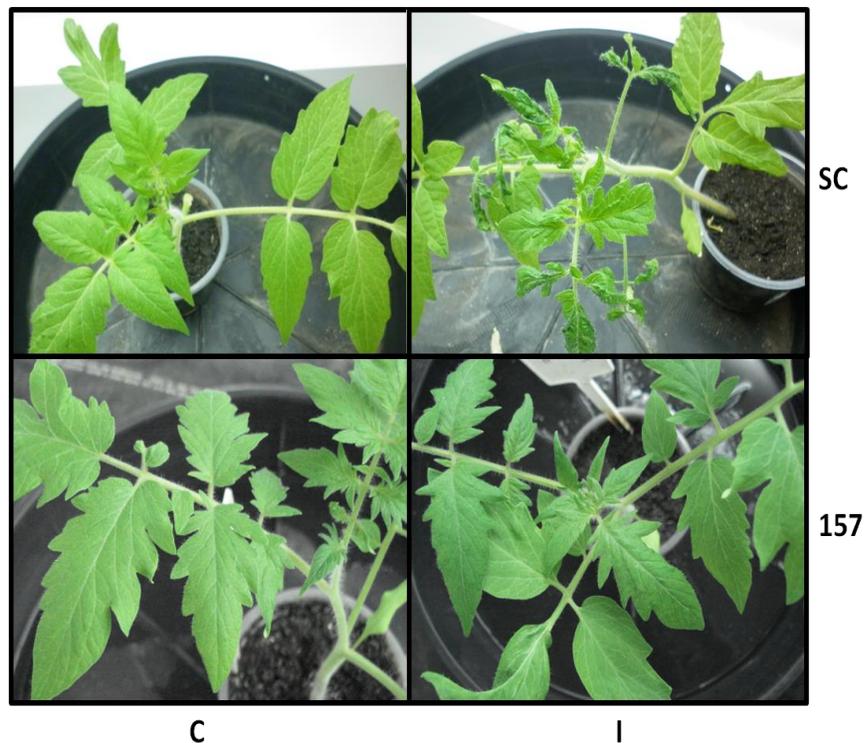


Figura 3.1 – Sintomas apresentados pelas plantas suscetíveis ‘Santa Clara’ (SC) e resistentes LAM 157 (157) 17 dias após a inoculação via bombardeamento com o clone infeccioso de ToCMoV (I) e controles inoculados com o vetor pBS (C). SC infectadas apresentaram fortes sintomas de enrolamento foliar enquanto as plantas LAM 157 variaram de sintomas leves a ausência de sintomas.

3.3.2 Confirmação da infecção viral por PCR

A infecção das plantas bombardeadas foi confirmada por meio de amplificação por PCR do DNA extraído de folíolos com infecção sistêmica 17 dias após a inoculação. Em todas as plantas bombardeadas com ToCMoV, de ambos os genótipos, a infecção viral foi confirmada. As plantas controle, de ambas as linhagens, inoculadas com o vetor pBS também foram testadas por PCR com os *primers* degenerados pAR1c496 e pAL1v1978 e foi confirmando a ausência de vírus em todas as plantas testadas (Figura 3.2).

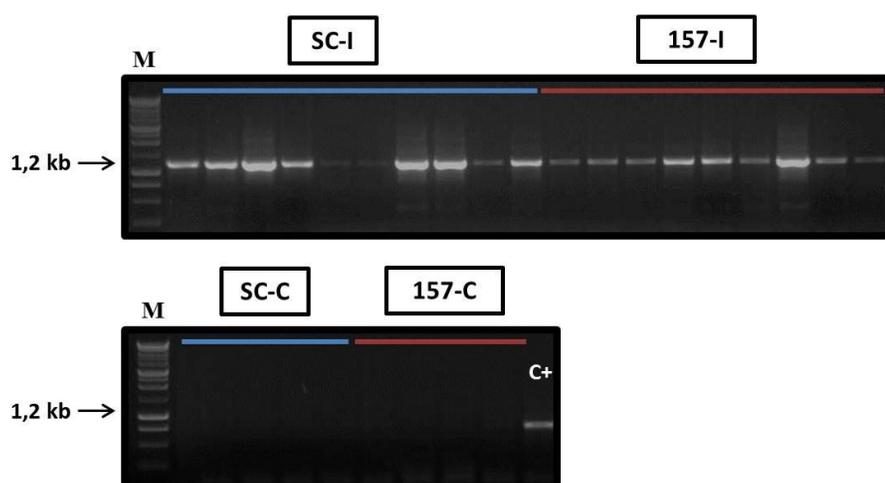


Figura 3.2 – Eletroforese em gel de agarose de fragmentos de ToCMoV amplificados por PCR a partir de DNA extraído de folhas apicais com infecção sistêmica em tomateiros ‘Santa Clara’ (SC) e LAM 157 infectados com ToCMoV, (SC-I e 157-I) e nos controles SC e LAM 157 bombardeados com vetor pBS (SC-C e 157-C). Quatro plantas infectadas de cada linhagem do total de dez e duas plantas consideradas como controles do total de quatro foram selecionadas para a extração de ácidos nucleicos totais. DNA de planta infectada com ToCMoV foi usado como controle positivo (C+). (M) Marcador 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen).

3.3.3 Análise qualitativa e quantitativa de Ácidos nucleicos

Todas as amostras de ácidos nucleicos tiveram a pureza confirmada por meio de espectrofotometria a 260nm, utilizando o espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). As amostras apresentaram relação 260/280nm entre 1,9 e 2,0 U.A. (Unidade de Absorbância) indicando que estavam com grau de pureza adequado e portanto, passíveis de serem utilizadas nos próximos procedimentos. A integridade de todas as amostras extraídas foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1,0% (Figura 3.3).

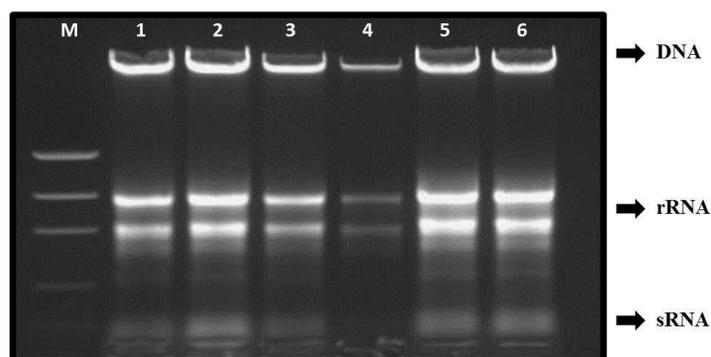


Figura 3.3 - Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, contendo os ácidos nucleicos totais extraídos de amostras de ‘Santa Clara’ infectadas (SC-I) e controle (SC-C). Visualiza-se fragmentos de DNA genômico (DNA), rRNAs 28S e 18S (rRNA) e pequenos RNAs (sRNA). Amostras no gel: (M) Marcador Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) – fragmentos de 2000 pb até 100 pb; (1) SC-I 1; (2) SC-I 2; (3) SC-I 3; (4) SC-I 4; (5) SC-C 1; (6) SC-C 2.

3.3.4 Análise da concentração de microRNAs de SC e LAM 157 infectados com ToCMoV e controles.

A análise da concentração dos miRNAs foi realizada por meio da quantificação das imagens geradas por Northern blot, pelo *software* Image J, do acúmulo dos miRNAs miR159, miR164, miR168 e miR172, após a infecção com ToCMoV em plantas SC e LAM 157 e nas plantas controle. O sRNA U6 foi usado para normalizar as amostras

quantificadas, como controle de carregamento. O valor de densidade encontrado para a banda correspondente aos miRNAs de plantas controle foi definido como 1, e o valor de densidade das bandas de plantas infectadas foi calculado relativo a esse valor. Para as plantas infectadas, foi considerada a média do valor da densidade das duas bandas quantificadas.

As plantas SC e LAM 157, infectadas com ToCMoV, apresentaram níveis de miRNA 159 diminuídos, em 0,61 e 0,45 vezes, respectivamente, quando comparadas com as plantas de cada linhagem não infectadas. A infecção viral nas plantas SC resultou em um pequeno aumento de 1,15 vezes no acúmulo do miRNA 164, enquanto nas plantas LAM 157, resultou na diminuição em 0,57 vezes, quando comparadas com o controle. Tais alterações observadas podem estar relacionadas à resposta a infecção viral e com a progressão da doença. As variações no acúmulo do miRNA 164 entre as plantas SC e LAM 157 podem estar relacionadas com a resposta diferenciada das plantas resistentes à infecção. Nenhuma alteração significativa foi observada nos níveis dos miRNAs 168 e 172 das plantas infectadas comparadas com as plantas controle, indicando que a infecção viral não afeta ao acúmulo desse microRNAs.

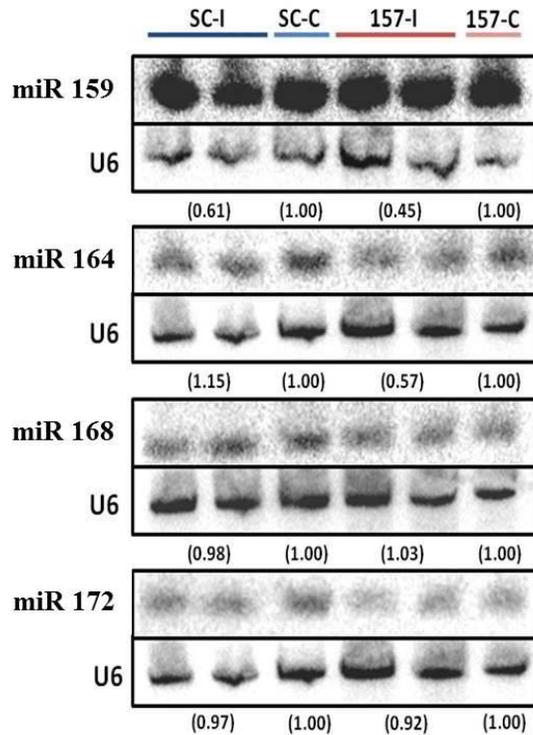


Figura 3.4 – Análises por Northern blot do acúmulo de miR159, miR164, miR168 e miR172, após a infecção com ToCMoV em plantas ‘Santa Clara’ (SC-I) e LAM 157 (157-I) e nas plantas controle SC (SC-C) e LAM 157 (157-I). O sRNA U6 foi usado para normalizar as amostras quantificadas no *software* Image J. O valor de densidade encontrado para a banda correspondente aos miRNAs de plantas controle foi definido como 1, e o valor de densidade das bandas de plantas infectadas foi calculado relativo a esse valor. Para as plantas infectadas, foi considerada a média do valor da densidade das duas bandas quantificadas.

3.4 DISCUSSÃO

Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram mecanismos de combate às infecções virais, envolvendo o silenciamento de RNA como uma defesa natural contra as viroses invasoras. Entretanto, os vírus em plantas e em animais são capazes de alterar a via de silenciamento de RNA do hospedeiro, modificando a regulação de expressão de genes por meio de proteínas supressoras de silenciamento de RNA viral presente em diversos vírus, incluindo os geminivírus (Finnegan and Matzke, 2003; Voinnet, 2005). Tais proteínas são capazes de inibir as atividades de miRNAs, podendo desencadear severos problemas no desenvolvimento das plantas, o que contribui na patogenicidade de diversas viroses e, muitas vezes, resulta em sintomas como clorose, necrose, despigmentação, curvamento e enrugamento das folhas, e alterações no tamanho e morfologia das plantas (Chapman et al., 2004b; Feng et al., 2009). Contudo, não é claro se essa interação é parte da estratégia de sobrevivência dos vírus ou é apenas um efeito colateral do ciclo de infecção viral (Amin et al., 2011b).

No presente estudo, o perfil de expressão de quatro miRNAs relacionados com o desenvolvimento da planta e com a biogênese de miRNAs, miR159, miR164, miR168 e miR172, foi analisado em tomateiros infectados com o begomovírus ToCMoV.

O miR159 modula a expressão das proteínas MYB, fatores de transcrição dependentes do hormônio vegetal giberelina e que se ligam ao promotor do gene LEAFY, os quais são necessários para o início da indução de florescimento (Jones-Rhoades, 2010) para o desenvolvimento de órgãos florais (Achard et al., 2004) e para a germinação (Reyes and Chua, 2007). A redução na expressão dos genes LEAFY resulta na transição da fase vegetativa para a fase reprodutiva. Plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* miR159 tiveram o crescimento inibido pela redução na proliferação celular (Alonso-Peral et al., 2010). Já a superexpressão do miR159, reduzindo a expressão dos genes MYB, foi associado com o atraso na floração e esterilidade (Millar and Gubler, 2005).

N. benthamiana infectadas com os begomovírus *African cassava mosaic virus* (ACMV), *Cabbage leaf curl virus* (CbLCuV), *Cotton leaf virus* (CLCuMV) e *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) apresentaram um aumento no acúmulo do miR159 (Amin et al., 2011a). Porém, a expressão individual da CP desses mesmos begomovírus, bem

como da MP e da NSP dos vírus bipartidos ACMV e CbLCuV, resultaram na diminuição dos níveis de miR159 (Amin et al., 2011b). A infecção com o begomovírus *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) em tomateiros levou a um aumento de cerca de quatro vezes quando comparado com plantas saudáveis, sugerindo que o miR159 possa ser um fator decisivo na alteração do fenótipo em infecções com ToLCNDV (Naqvi et al., 2010). Na infecção com ToCMoV, as plantas SC e LAM 157 apresentaram níveis de miRNA 159 diminuídos em 0,61 e em 0,45 vezes, respectivamente, quando comparadas com as plantas de cada linhagem não infectadas, demonstrando que as duas linhagens apresentaram um padrão de regulação negativa similar em relação ao miR159. Portanto, é possível que a infecção com ToCMoV esteja também relacionada com alterações na expressão do miR159, resultando na diminuição dos níveis do miR159 tanto nas plantas suscetíveis SC como nas plantas resistentes LAM 157.

O miR164 foi associado à formação e manutenção dos limites entre meristema e os órgãos primordiais em emergência e à regulação do número de pétalas por meio da regulação dos genes *CUP-SHAPED COTYLEDONI (CUC1)*, *CUC2* e *CUC3*, fatores de transcrição NAC-like (Aida et al., 1999; Baker et al., 2005; Laufs et al., 2004; Takada et al., 2001). Problemas ao estabelecer esses limites resultam em alterações severas no desenvolvimento da planta (Aida et al., 1997). Também foi demonstrado que a expressão do miR164 diminui gradualmente com o envelhecimento da planta por meio da supressão do gene *EIN2 (ethylene insensitive 2)*, que leva, por sua vez, a indução da expressão de *ORE1*, membro da família de fatores de transcrição NAC-like, promovendo a morte celular e senescência. Portanto, a regulação positiva do miR164 combate a morte celular e a senescência (Woo et al., 2004). A infecção com ToCMoV nas plantas SC, resultou em um ligeiro aumento do acúmulo do miR164. O mesmo foi relatado em infecções em *N. benthamiana* com quatro begomovírus ACMV, CLCuMV, CbLuV e TYLCV. Amin et al. (2011b) sugeriram que a infecção com esses vírus seja responsável pela regulação negativa dos fatores de transcrição NAC-like, sendo então relacionados com a indução dos sintomas apresentados pelas plantas infectadas. Nas plantas LAM 157 infectadas com ToCMoV, foi observado o oposto: o miR164 teve seu acúmulo reduzido em 0,57 vezes quando comparado com o controle. Isso indica que essa discrepância nos níveis do miR164 entre as duas linhagens pode estar relacionada com a resposta de resistência de LAM 157 e com o

desenvolvimento de sintomas, geralmente ausentes ou reduzidos na LAM 157 e severos na suscetível SC.

Em análises da expressão dos genes Trap dos begomovírus ACMV, CbLCuV e TYLCV mediada por PVX, verificou-se um aumento significativo nos níveis do miR164 (Amin, 2011), indicando que essas proteínas virais, associada a alterações na regulação do miR164, podem ser responsáveis pela diferença no fenótipo apresentado na infecção com esses vírus, o que também pode estar ocorrendo com ToCMoV na infecção em Santa Clara.

O miR168 regula a expressão dos genes da proteína Argonauta AGO, principalmente AGO1, que desempenham papel fundamental na regulação e na biossíntese de outros miRNAs (Mallory and Vaucheret, 2009). Análises baseadas em microarranjo de tomates cultivar Pusa Ruby em folhas infectadas com ToLCNDV revelaram um aumento nos níveis do miR168 de cerca de duas vezes (Naqvi et al., 2010). O miRNA 168 apresentou um leve a moderado aumento em infecções em *N. benthamiana* com ACMV, CbLCuV, CLCuMV e TYLCV (Amin et al., 2011a). O miR172, juntamente com o miR156, regula seus alvos temporalmente, tendo papel fundamental na mudança da fase juvenil para a fase adulta e na indução floral (Poethig, 2009). Os níveis de miR172 são baixos durante a fase juvenil e aumentam à medida em que a planta se desenvolve e se aproxima do florescimento, o contrário ocorre com o miR156 (Wu et al., 2009). O miR172, regula negativamente alguns repressores florais, como o APETALA2 (AP2), que inibem o principal gene indutor da floração FLOWERING LOCUS T (FT), induzindo o florescimento (Nonogaki, 2010; Poethig, 2009). Nenhuma alteração significativa foi observada nos níveis dos miRNAs 168 e 172 das plantas infectadas com ToCMoV quando comparadas com as plantas controle, indicando que a infecção viral não afetou o acúmulo desses microRNAs.

Portanto, no presente estudo, o mesmo comportamento observado nas plantas resistentes foi observado nas plantas suscetíveis quanto ao acúmulo dos níveis dos miRNAs miR159, miR168 e miR172. No entanto, foi verificado que o miR164 apresentou comportamento diferente nas duas linhagens infectadas com ToCMoV: maior acúmulo nas plantas suscetíveis quando comparadas com o controle, o que também se verificou na infecção com outras begomovirose; e diminuição na linhagem resistente LAM 157. A partir de experimentos adicionais para a análise da expressão do miRNAs, como

microarranjos e RT-qPCR, será possível confirmar e avaliar se a atenuação dos sintomas exercida pela LAM 157 pode estar relacionada com a diferença na regulação do miR168.

CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

- Apesar da replicação viral ocorrer nas plantas resistentes LAM 157, essa é cerca de 50% menos eficiente, quando comparada com a linhagem suscetível SC, no 6º e 10º dia após a inoculação.
- Resultados obtidos com a enxertia de plantas suscetíveis e resistentes indicaram um atraso no movimento viral na linhagem LAM 157.
- Os resultados obtidos sugerem que a resistência apresentada pela isolinha LAM 157 se deve a restrição na replicação viral associado a uma menor eficiência no movimento viral.
- Na análise do perfil de expressão de miRNAs, foi verificado o mesmo comportamento observado nas plantas resistentes e nas plantas suscetíveis quanto ao acúmulo dos níveis dos miRNAs miR159, miR168 e miR172. No entanto, o miR164 apresentou comportamento diferente nas duas linhagens infectadas com ToCMoV, com maior acúmulo nas plantas suscetíveis quando comparadas com o controle e diminuição na linhagem resistente LAM 157.
- É possível que a infecção com ToCMoV esteja também relacionada com alterações na expressão do miR159, resultando na diminuição dos níveis do miR159 tanto nas plantas suscetíveis SC como nas plantas resistentes LAM 157.
- A partir de experimentos adicionais para a análise da expressão do miRNAs, como microarranjos e RT-qPCR, será possível confirmar e avaliar se a atenuação dos sintomas exercida pela LAM 157 pode estar relacionada com a diferença na regulação do miR168.

- Os resultados do presente estudo em conjunto com trabalhos anteriores com a linhagem LAM 157 confirmam a sua potencial utilização no cultivo de tomate de mesa resistente à begomoviroses de maneira sustentável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Achard P., Herr A., Baulcombe D.C., Harberd N.P. (2004) Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development* 131:3357-65.

Aguilera J.G., Malta A.W.O., Flores M.P., Almeida V.S., Nick C., Xavier C.A.D., Silva D.J.H., Zerbini F.M. (2011) Characterization of the resistance of tomato accessions from the BGH-UFV to the geminivirus Tomato yellow spot virus. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável* 1:66-70.

Aida M., Ishida T., Fukaki H., Fujisawa H., Tasaka M. (1997) Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell* 9:841-57.

Aida M., Ishida T., Tasaka M. (1999) Shoot apical meristem and cotyledon formation during Arabidopsis embryogenesis: interaction among the CUP-SHAPED COTYLEDON and SHOOT MERISTEMLESS genes. *Development* 126:1563-70.

Alberter B., Ali Rezaian M., Jeske H. (2005) Replicative intermediates of Tomato leaf curl virus and its satellite DNAs. *Virology* 331:441-8.

Alonso-Peral M.M., Li J., Li Y., Allen R.S., Schnippenkoetter W., Ohms S., White R.G., Millar A.A. (2010) The microRNA159-regulated GAMYB-like genes inhibit growth and promote programmed cell death in Arabidopsis. *Plant Physiol* 154:757-71.

Ambrozevicius L.P., Calegario R.F., Fontes E.P.B., Carvalho M.G., Zerbini F.M. (2002) Genetic diversity of begomovirus infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 27:372-377.

Amin I., Patil B., Briddon R., Mansoor S., Fauquet C. (2011a) A common set of developmental miRNAs are upregulated in *Nicotiana benthamiana* by diverse begomoviruses. *Virol J* 8:143.

Amin I., Patil B.L., Briddon R.W., Mansoor S., Fauquet C.M. (2011b) Comparison of phenotypes produced in response to transient expression of genes encoded by four distinct begomoviruses in *Nicotiana benthamiana* and their correlation with the levels of developmental miRNAs. *Virology* 453:233-241.

Arvey A., Larsson E., Sander C., Leslie C.S., Marks D.S. (2010) Target mRNA abundance dilutes microRNA and siRNA activity. *Molecular Systems Biology* 6:363.

Aukerman M.J., Sakai H. (2003) Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell* 15:2730-41.

Baker C.C., Sieber P., Wellmer F., Meyerowitz E.M. (2005) The early extra petals1 mutant uncovers a role for microRNA miR164c in regulating petal number in *Arabidopsis*. *Current Biology* 15:303-15.

Barbosa J., Barreto S., Inoue-Nagata A., Reis M., Firmino A., Bergamin Filho A., Rezende J. (2009) Natural infection of *Nicotiana glauca* by Tomato severe rugose virus in Brazil. *Journal of General Plant Pathology* 75:440-443.

Bian X.Y., Thomas M.R., Rasheed M.S., Saeed M., Hanson P., De Barro P.J., Rezaian M.A. (2007) A Recessive Allele (*tgr-1*) Conditioning Tomato Resistance to Geminivirus Infection Is Associated with Impaired Viral Movement. *Phytopathology* 97:930-7.

Blawid R., Fontenele R., Lacorte C., Pereira-Carvalho R.C., Resende R.O., Boiteux L.S., Fonseca M.E.N., Ribeiro S.G. (2010) Resistência ampla de linhagens de tomateiro contendo o loci *tcm-1* e *Ty-1* a begomovirus bipartidos. In: 43. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2010, Cuiabá. *Tropical Plant Pathology* 35:219.

Blawid R., Fontenele R.S., Lacorte C., Pereira-Carvalho R.C., Resende R.O., Boiteux L.S., Fonseca M.E.N., BRASILEIRO A.C.M., Ribeiro S.G. (2011) Real-time qPCR as a tool for the Quantification of Tomato chlorosis mottle virus (ToCMoV) in susceptible and resistant tomato lines. In: III Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, 2011, Ilhéus. Abstract III Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas:47.

- Boiteux L.S., Oliveira V.R., Silva C.H., Makishima N., Inoue-Nagata A.K., Fonseca M.E.N., Giordano L.B. (2007) Reaction of tomato hybrids carrying the Ty-1 locus to Brazilian bipartite Begomovirus species. *Horticultura Brasileira* 25:20-23.
- Briddon R.W., Pinner M.S., Stanley J., Markham P.G. (1990) Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology* 177:85-94.
- Brodersen P., Sakvarelidze-Achard L., Bruun-Rasmussen M., Dunoyer P., Yamamoto Y.Y., Sieburth L., Voinnet O. (2008) Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* 320:1185-90.
- Brown J.K., Fauquet C.M., Briddon R.W., Zerbini M., Moriones E., Navas-Castillo J. (2011) Geminiviridae. In: Fauquet, C.M.; Mayo, M.A.; Maniloff, J.; Desselberger, U. & Ball, L.A. (eds) *Virus Taxonomy*, 9th report of the ICTV. Elsevier/Academic Press. London.
- Bruce G., Gu M., Shi N., Liu Y., Hong Y. (2011) Influence of retinoblastoma-related gene silencing on the initiation of DNA replication by African cassava mosaic virus Rep in cells of mature leaves in *Nicotiana benthamiana* plants. *Virol J* 8:561.
- Buchmann R.C., Asad S., Wolf J.N., Mohannath G., Bisaro D.M. (2009) Geminivirus AL2 and L2 proteins suppress transcriptional gene silencing and cause genome-wide reductions in cytosine methylation. *J Virol* 83:5005-13.
- Calegário R.F. (2004) Caracterização de um isolado do begomovírus *Sida micrantha* mosaic virus (SiMMV). Universidade Federal de Viçosa.
- Calegario R.F., Ferreira S.S., Andrade E.C., Zerbini F.M. (2007) Characterization of Tomato yellow spot virus (ToYSV), a novel tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Braz J Agric Res* 42:1335–1343.
- Campos-Olivas R., Louis J.M., Clerot D., Gronenborn B., Gronenborn A.M. (2002) ¹H, ¹³C, and ¹⁵N assignment of the N-terminal, catalytic domain of the replication initiation protein from the geminivirus TYLCV. *J Biomol NMR* 24:73-4.

Carrijo F.R.F., Albuquerque L.C., Ávila A.C., Giordano L.B., Boiteux L.S., Inoue-Nagata A.K. (2005) Incidence of begomovirus in tomato for processing and for fresh market in 2004. *Fitopatologia Brasileira* 30:187.

Carthew R.W., Sontheimer E.J. (2009) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136:642-55.

Castillo-Urquiza G.P., Beserra Jr. J.E., Bruckner F.P., Lima A.T., Varsani A., Alfenas-Zerbini P., Zerbini M.F. (2008) Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Arch Virol* 153:1985–1989.

Castillo A.G., Collinet D., Deret S., Kashoggi A., Bejarano E.R. (2003) Dual interaction of plant PCNA with geminivirus replication accessory protein (Ren) and viral replication protein (Rep). *Virology* 312:381-94.

Castillo A.G., Kong L.J., Hanley-Bowdoin L., Bejarano E.R. (2004) Interaction between a geminivirus replication protein and the plant sumoylation system. *J Virol* 78:2758-69.

Chang S., Puryear J., Cairney J. (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* 11:113-116. Chapman E.J., Prokhnevsky A.I., Gopinath K., Dolja V.V., Carrington J.C. (2004a) Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev* 18:1179-86.

Chapman E.J., Prokhnevsky A.I., Gopinath K., Dolja V.V., Carrington J.C. (2004b) Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes and Development* 18:1179 - 1186.

Chellappan P., Vanitharani R., Fauquet C.M. (2005) MicroRNA-binding viral protein interferes with Arabidopsis development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:10381-6.

Chellappan P., Vanitharani R., Pita J., Fauquet C.M. (2004) Short interfering RNA accumulation correlates with host recovery in DNA virus-infected hosts, and gene silencing targets specific viral sequences. *J Virol* 78:7465-77.

Chen X. (2004) A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science* 303:2022-5.

Choudhury N.R., Malik P.S., Singh D.K., Islam M.N., Kaliappan K., Mukherjee S.K. (2006) The oligomeric Rep protein of Mungbean yellow mosaic India virus (MYMIV) is a likely replicative helicase. *Nucleic Acids Res* 34:6362-77.

Clerot D., Bernardi F. (2006) DNA helicase activity is associated with the replication initiator protein rep of tomato yellow leaf curl geminivirus. *J Virol* 80:11322-30.

Cotrim M.A.A., Krause-Sakate R., Narita N., Zerbini F.M., Pavan M.A. (2007) Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. *Summa Phytopathologica* 33:300-303.

Czosnek H., Kheyr-Pour A., Gronenborn B., Remetz E., Zeidan M., Altman A., Rabinowitch H.D., Vidavsky S., Kedar N., Gafni Y., et al. (1993) Replication of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) DNA in agroinoculated leaf discs from selected tomato genotypes. *Plant Mol Biol* 22:995-1005.

Doyle J.J., Doyle J.L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.

Duan Y.P., Powell C.A., Purcifull D.E., Broglio P., Hiebert E. (1997) Phenotypic variation in transgenic tobacco expressing mutated geminivirus movement/pathogenicity (BC1) proteins. *Mol Plant Microbe Interact* 10:1065-74.

Eckardt N.A. (2012) A microRNA cascade in plant defense. *Plant Cell* 24:840.

Egelkroun E.M., Robertson D., Hanley-Bowdoin L. (2001) Proliferating cell nuclear antigen transcription is repressed through an E2F consensus element and activated by geminivirus infection in mature leaves. *Plant Cell* 13:1437-52.

Fabre F., Kervarrec C., Mieuzet L., Riault G., Vialatte A., Jacquot E. (2003) Improvement of Barley yellow dwarf virus-PAV detection in single aphids using a fluorescent real time RT-PCR. *J Virol Methods* 110:51-60.

Fahlgren N., Jogdeo S., Kasschau K.D., Sullivan C.M., Chapman E.J., Laubinger S., Smith L.M., Dasenko M., Givan S.A., Weigel D., Carrington J.C. (2010) MicroRNA gene evolution in *Arabidopsis lyrata* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 22:1074-89.

Fargette D., Leslie M., Harrison B.D. (1996) Serological studies on the accumulation and localisation of three tomato leaf curl geminiviruses in resistant and susceptible *Lycopersicon* species and tomato cultivars. *Annals of Applied Biology* 128.

Faria J.C., Souza-Dias J.A.C., Slack S., Maxwell D.P. (1997) A new geminivirus associated with tomato in the State of São Paulo, Brazil. *Plant Disease* 81:423.

Fauquet C.M., Bisaro D.M., Briddon R.W., Brown J.K., Harrison B.D., Rybicki E.P., Stenger D.C., Stanley J. (2003) Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family Geminiviridae, and an updated list of begomovirus species. *Arch Virol* 148:405-21.

Feng J., Wang K., Liu X., Chen S., Chen J. (2009) The quantification of tomato microRNAs response to viral infection by stem-loop real-time RT-PCR. *Gene* 437:14-21.

Fernandes F.R., Albuquerque L.C., Giordano L.B., Boiteux L.S., Ávila A.C., Inoue-Nagata A.K. (2008) Diversity and prevalence of Brazilian Bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes* 36:251-258.

Fernandes J.J., Carvalho M.G., Andrade E.C., Brommonschenkel S.H., Fontes E.P.B., Zerbini F.M. (2006) Biological and molecular properties of Tomato rugose mosaic virus (ToRMV), a new tomatoinfecting begomovirus from Brazil. *Plant Pathology* 55:513-522.

Ferreira S.S., Alfenas P.F., Lima A.T.M., Barros D.R., Senna L., Zerbini F.M. (2005) Detection of begomoviruses infecting tomatoes at Paty de Alferes, Rio de Janeiro. *Fitopatologia Brasileira* 30:S183.

Finnegan E.J., Matzke M.A. (2003) The small RNA world. *J Cell Sci* 116:4689-93.

Flores E., Silberschmidt K., Kramer M. (1960) Observações de “clorose infecciosa” das malváceas em tomateiros do campo. *O Biológico*, São Paulo 26:65-69,.

Fontenele R.S., Blawid R., Lacorte C., Pereira-Carvalho R.C., Resende R.O., Boiteux L.S., Fonseca M.E.N., Ribeiro S.G. (2010) Seleção de isolinhas de tomateiro resistentes a Begomovirus para estudos de transcriptoma e proteoma. In: 43. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2010, Cuiabá. *Tropical Plant Pathology* 35:219.

Fontenelle M.R., Luz D.F., Gomes A.P., Florentino L.H., Zerbini F.M., Fontes E.P. (2007) Functional analysis of the naturally recombinant DNA-A of the bipartite begomovirus Tomato chlorotic mottle virus. *Virus Res* 126:262-7.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2012) <faostat.fao.org> acessado em 7 de novembro de 2012.

Foolad M.R., Sharma A. (2005) Molecular markers as selection tools in tomato breeding. *Acta Hort. (ISHS)* 695:225-240.

Gafni Y., Epel B.L. (2002) The role of host and viral proteins in intra- and inter-cellular trafficking of geminiviruses. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 60:231-241.

Galvao R.M., Mariano A.C., Luz D.F., Alfenas P.F., Andrade E.C., Zerbini F.M., Almeida M.R., Fontes E.P. (2003) A naturally occurring recombinant DNA-A of a typical bipartite begomovirus does not require the cognate DNA-B to infect *Nicotiana benthamiana* systemically. *J Gen Virol* 84:715-26.

Garcia-Cano E., Navas-Castillo J., Moriones E., Fernandez-Munoz R. (2010) Resistance to Tomato chlorosis virus in wild tomato species that impair virus accumulation and disease symptom expression. *Phytopathology* 100:582-92.

Garcia-Cano E., Resende R.O., Boiteux L.S., Giordano L.B., Fernandez-Munoz R., Moriones E. (2008) Phenotypic expression, stability, and inheritance of a recessive resistance to monopartite begomoviruses associated with tomato yellow leaf curl disease in tomato. *Phytopathology* 98:618-27.

Garcia-Neria M.A., Rivera-Bustamante R.F. (2011) Characterization of Geminivirus resistance in an accession of *Capsicum chinense* Jacq. *Mol Plant Microbe Interact* 24:172-82.

Giordano L.B., Silva-Lobo V.L., Santana F.M., Fonseca M.E.N., Boiteux L.S. (2005) Inheritance of resistance to the bipartite Tomato chlorotic mottle begomovirus derived from *Lycopersicon esculentum* cv. 'Tyking':27-33.

Gutierrez C. (1999) Geminivirus DNA replication. *Cell Mol Life Sci* 56:313-29.

Gutierrez C., Ramirez-Parra E., Mar Castellano M., Sanz-Burgos A.P., Luque A., Missich R. (2004) Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. *Vet Microbiol* 98:111-9.

Hamilton W.D., Bisaro D.M., Coutts R.H., Buck K.W. (1983) Demonstration of the bipartite nature of the genome of a single-stranded DNA plant virus by infection with the cloned DNA components. *Nucleic Acids Res* 11:7387-96.

Hanley-Bowdoin L., Settlage S.B., Orozco B.M., Nagar S., Robertson D. (2000) Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 35:105-40.

Hanley-Bowdoin L., Settlage S.B., Robertson D. (2004) Reprogramming plant gene expression: a prerequisite to geminivirus DNA replication. *Mol Plant Pathol* 5:149-56.

Hanson P.M., Green S.K., Kuo G. (2006) Ty-2, a gene on chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato. *Rep. Tomato Genet. Coop.* 56:17-18.

Hehnle S., Wege C., Jeske H. (2004) Interaction of DNA with the movement proteins of geminiviruses revisited. *J Virol* 78:7698-706.

Hoege C., Pfander B., Moldovan G.L., Pyrowolakis G., Jentsch S. (2002) RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419:135-41.

Horowitz R., Svetlana K., Vadim K., Isaac I. (2005) Biotypes B and Q of Bemisia tabaci and their relevance to Neonictinoid and Pyriproxyfen resistance. Arch. Insect Biochem. Physiol. 58:216–225.

Hou Y.M., Sanders R., Ursin V.M., Gilbertson R.L. (2000) Transgenic plants expressing geminivirus movement proteins: abnormal phenotypes and delayed infection by Tomato mottle virus in transgenic tomatoes expressing the Bean dwarf mosaic virus BV1 or BC1 proteins. Mol Plant Microbe Interact 13:297-308.

Hull R. (2002) Matthews Plant Virology. 4th ed. Academic Press. San Diego.

Hurtado F.D., Gil M.A., Zubiaur Y.M., Aguilera J.G., Xavier C.A.D., Zerbini Jr F.M., Silva D.J.H. (2012) Fontes de resistência em tomateiro aos begomovírus bissegmentados Tomato yellow spot virus e Tomato severe rugose virus. Horticultura Brasileira 30:639-644.

Hutton S.F., Scott J.W., Schuster D.J. (2012) Recessive Resistance to Tomato yellow leaf curl virus from the Tomato Cultivar Tyking Is Located in the Same Region as Ty-5 on Chromosome 4. Hortscience 47:324-327.

IBGE. (2010) Produção Agrícola Municipal: Culturas Temporárias e Permanentes.

Ilyina T.V., Koonin E.V. (1992) Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes and archaeobacteria. Nucleic Acids Res 20:3279-85.

Ion-Nagy L., Lansac M., Eyquard J.P., Salvador B., Garcia J.A., Le Gall O., Hernould M., Schurdi-Levraud V., Decroocq V. (2006) PPV long-distance movement is occasionally permitted in resistant apricot hosts. Virus Res 120:70-8.

Jeske H. (2009) Geminiviruses. Curr Top Microbiol Immunol 331:185-226.

Jeske H., Lutgemeier M., Preiss W. (2001) DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of Abutilon mosaic virus. EMBO J 20:6158-67.

Ji Y., Schuster D.J., Scott J.W. (2007a) Ty-3, a begomovirus resistance locus near the Tomato yellow leaf curl virus resistance locus Ty-1 on chromosome 6 of tomato. *Molecular Breeding* 20:271-284.

Ji Y., Scott J.W., Hanson P., Graham E., Maxwell D.P. (2007b) Sources of Resistance, Inheritance, and Location of Genetic Loci Conferring Resistance to Members of the Tomato-Infecting Begomoviruses, in: H. Czosnek (Ed.), *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease*, Springer Netherlands. pp. 343-362.

Ji Y., Scott J.W., Schuster D.J., Maxwell D.P. (2009) Molecular Mapping of Ty-4, a New Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance Locus on Chromosome 3 of Tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 134:281-288.

Jones-Rhoades M.W. (2010) Prediction of plant miRNA genes. *Methods Mol Biol* 592:19-30.

Jones-Rhoades M.W., Bartel D.P. (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell* 14:787-99.

Jovel J., Preiss W., Jeske H. (2007) Characterization of DNA intermediates of an arising geminivirus. *Virus Res* 130:63-70.

Kaliappan K., Choudhury N.R., Suyal G., Mukherjee S.K. (2012) A novel role for RAD54: this host protein modulates geminiviral DNA replication. *FASEB J* 26:1142-60.

Khraiwesh B., Zhu J.K., Zhu J. (2012) Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochim Biophys Acta* 1819:137-48.

Kidner C.A., Martienssen R.A. (2004) Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1. *Nature* 428:81-4.

Kidner C.A., Martienssen R.A. (2005) The developmental role of microRNA in plants. *Curr Opin Plant Biol* 8:38-44.

Kleinow T., Nischang M., Beck A., Kratzer U., Tanwir F., Preiss W., Kepp G., Jeske H. (2009a) Three C-terminal phosphorylation sites in the Abutilon mosaic virus movement protein affect symptom development and viral DNA accumulation. *Virology* 390:89-101.

Kleinow T., Tanwir F., Kocher C., Krenz B., Wege C., Jeske H. (2009b) Expression dynamics and ultrastructural localization of epitope-tagged Abutilon mosaic virus nuclear shuttle and movement proteins in *Nicotiana benthamiana* cells. *Virology* 391:212-20.

Kong L.J., Hanley-Bowdoin L. (2002) A geminivirus replication protein interacts with a protein kinase and a motor protein that display different expression patterns during plant development and infection. *Plant Cell* 14:1817-32.

Koonin E.V., Ilyina T.V. (1992) Geminivirus replication proteins are related to prokaryotic plasmid rolling circle DNA replication initiator proteins. *J Gen Virol* 73 (Pt 10):2763-6.

Korimbocus J., Coates D., Barker I., Boonham N. (2002) Improved detection of Sugarcane yellow leaf virus using a real-time fluorescent (TaqMan) RT-PCR assay. *J Virol Methods* 103:109-20.

Kunik T., Palanichelvam K., Czosnek H., Citovsky V., Gafni Y. (1998) Nuclear import of the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in plant and insect cells. *Plant J* 13:393-9.

Lapidot M., Friedmann M. (2002) Breeding for resistance to whitefly-transmitted geminiviruses. *Annals of Applied Biology* 140:109-127.

Laterrot H. (1995) Breeding network to create tomato varieties resistant to tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). *Fruits* 50:439-444.

Laufs P., Peaucelle A., Morin H., Traas J. (2004) MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in *Arabidopsis* meristems. *Development* 131:4311-22.

Lazarowitz S.G., Beachy R.N. (1999) Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *Plant Cell* 11:535-48.

Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843-54.

Lefeuvre P., Martin D.P., Harkins G., Lemey P., Gray A.J., Meredith S., Lakay F., Monjane A., Lett J.M., Varsani A., Heydarnejad J. (2010) The spread of tomato yellow leaf curl virus from the Middle East to the world. *PLoS Pathog* 6:e1001164.

Lin N.S., Hsu Y.H., Hsu H.T. (1990) Immunological detection of plant viruses and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. *Phytopathology* 80:824-828.

Liu H., Boulton M.I., Thomas C.L., Prior D.A., Oparka K.J., Davies J.W. (1999) Maize streak virus coat protein is karyophilic and facilitates nuclear transport of viral DNA. *Mol Plant Microbe Interact* 12:894-900.

Lourenção A.L., Nagai H. (1994) Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no estado de São Paulo. *Bragantia* 53:53-59.

Luque A., Sanz-Burgos A.P., Ramirez-Parra E., Castellano M.M., Gutierrez C. (2002) Interaction of geminivirus Rep protein with replication factor C and its potential role during geminivirus DNA replication. *Virology* 302:83-94.

Machado M.R., Mendoza L., Lacorte C., Pereira-Carvalho R.C., Fonseca M.E.N., Ribeiro S.G., Boiteux L.S. (2012) Eficiência de novas fontes de resistência em tomateiro contra quatro espécies de begomovírus bipartidos. XVII Encontro do Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Mallory A.C., Vaucheret H. (2009) ARGONAUTE 1 homeostasis invokes the coordinate action of the microRNA and siRNA pathways. *EMBO Rep* 10:521-6.

Mansoor S., Briddon R.W., Zafar Y., Stanley J. (2003) Geminivirus disease complexes: an emerging threat. *Trends Plant Sci* 8:128-34.

Maranca G. (1982) Tomate; variedades, cultivo, pragas, doenças, comercialização. 2 ed., São Paulo.

Marouelli W.A., Silva H.R., Silva W.L.C. (2012) Irrigação do tomateiro para processamento. Circular Técnica da Embrapa Hortaliças 102.

Mason G., Caciagli P., Accotto G.P., Noris E. (2008) Real-time PCR for the quantitation of Tomato yellow leaf curl Sardinia virus in tomato plants and in *Bemisia tabaci*. *J Virol Methods* 147:282-289.

Matyis J.C., Silva D.M., Oliveira A.R., Costa A.S. (1975) Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. *Summa Phytopathologica* 1:267-275.

McCullagh P., Nelder J.A. (1989) *Generalized Linear Models*. London: Chapman and Hall.

Meng Y., Shao C., Wang H., Chen M. (2011) The regulatory activities of plant microRNAs: a more dynamic perspective. *Plant Physiol* 157:1583-95.

Michelson I., Zamir D., Czosnek H. (1994) Accumulation and translocation of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in a *Lycopersicon esculentum* breeding line containing the *L. chilense* TYLCV tolerance gene *Ty-1*. *Phytopathology* 84:928-933.

Millar A.A., Gubler F. (2005) The Arabidopsis GAMYB-Like Genes, MYB33 and MYB65, Are MicroRNA-Regulated Genes That Redundantly Facilitate Anther Development. *The Plant Cell Online* 17:705-721.

Morales F.J., Anderson P.K. (2001) The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Arch Virol* 146:415-41.

Morilla G., Castillo A.G., Preiss W., Jeske H., Bejarano E.R. (2006) A versatile transreplication-based system to identify cellular proteins involved in geminivirus replication. *J Virol* 80:3624-33.

Morra M.R., Petty I.T. (2000) Tissue specificity of geminivirus infection is genetically determined. *Plant Cell* 12:2259-70.

Mumford R., Skelton A., Metcalfe E., Walsh K., Boonham N. (2004) The reliable detection of Barley yellow and mild mosaic viruses using real-time PCR (TaqMan). *J Virol Methods* 117:153-9.

Naqvi A.R., Haq Q.M., Mukherjee S.K. (2010) MicroRNA profiling of tomato leaf curl New Delhi virus (toLCDV) infected tomato leaves indicates that deregulation of mir159/319 and mir172 might be linked with leaf curl disease. *Virol J* 7:281.

Naqvi A.R., Sarwat M., Hasan S., Roychodhury N. (2012) Biogenesis, functions and fate of plant microRNAs. *J Cell Physiol* 227:3163-8.

Nash T.E., Dallas M.B., Reyes M.I., Buhrman G.K., Ascencio-Ibanez J.T., Hanley-Bowdoin L. (2011) Functional analysis of a novel motif conserved across geminivirus Rep proteins. *J Virol* 85:1182-92.

Nonogaki H. (2010) MicroRNA gene regulation cascades during early stages of plant development. *Plant Cell Physiol* 51:1840-6.

Noueiry A.O., Lucas W.J., Gilbertson R.L. (1994) Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell* 76:925-32.

Nozawa M., Miura S., Nei M. (2012) Origins and evolution of microRNA genes in plant species. *Genome Biol Evol* 4:230-9.

Pan H., Chu D., Yan W., Su Q., Liu B., Wang S., Wu Q., Xie W., Jiao X., Li R., Yang N., Yang X., Xu B., Brown J.K., Zhou X., Zhang Y. (2012) Rapid spread of tomato yellow leaf curl virus in China is aided differentially by two invasive whiteflies. *PLoS One* 7:e34817.

Pascal E., Sanderfoot A.A., Ward B.M., Medville R., Turgeon R., Lazarowitz S.G. (1994) The geminivirus BR1 movement protein binds single-stranded DNA and localizes to the cell nucleus. *Plant Cell* 6:995-1006.

Pasquinelli A.E., Reinhart B.J., Slack F., Martindale M.Q., Kuroda M.I., Maller B., Hayward D.C., Ball E.E., Degan B., Muller P., Spring J., Srinivasan A., Fishman M., Finnerty J., Corbo J., Levine M., Leahy P., Davidson E., Ruvkun G. (2000)

Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408:86-9.

Pasumarthy K.K., Mukherjee S.K., Choudhury N.R. (2011) The presence of tomato leaf curl Kerala virus AC3 protein enhances viral DNA replication and modulates virus induced gene-silencing mechanism in tomato plants. *Virology* 8:178.

Pereira-Carvalho R.C. (2009) Expressão fenotípica e mecanismos de ação de genes envolvidos na resistência ampla a Begomovirus monopartidos e bipartidos em tomate (Tese de Doutorado em Fitopatologia). Brasília, Distrito Federal: Universidade de Brasília.

Pereira-Carvalho R.C., Boiteux L.S., Fonseca M.E.N., Díaz-Pendón J.A., Moriones E., Fernández-Muñoz R., Charchar J.M., Resende R.O. (2010) Multiple Resistance to *Meloidogyne* spp. and to Bipartite and Monopartite Begomovirus spp. in Wild *Solanum* (*Lycopersicon*) Accessions. *Plant Disease* 94:179-185.

Picó B., Díez M.J., Nuez F. (1996) Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The Tomato yellow leaf curl virus — a review. *Scientia Horticulturae* 67:151-196.

Pilartz M., Jeske H. (1992) Abutilon mosaic geminivirus double-stranded DNA is packed into minichromosomes. *Virology* 189:800-2.

Piriyapongsa J., Jordan I.K. (2008) Dual coding of siRNAs and miRNAs by plant transposable elements. *RNA* 14:814-21.

Piroux N., Saunders K., Page A., Stanley J. (2007) Geminivirus pathogenicity protein C4 interacts with *Arabidopsis thaliana* shaggy-related protein kinase AtSKeta, a component of the brassinosteroid signalling pathway. *Virology* 362:428-40.

Poethig R.S. (2009) Small RNAs and developmental timing in plants. *Curr Opin Genet Dev* 19:374-8.

Polston J.E., Anderson P.K. (1997) The Emergence Of Whitefly-Transmitted Geminiviruses in Tomato in the Western Hemisphere. *Plant Disease* 81:1358-1369.

Poornima Priyadarshini C.G., Ambika M.V., Tippeswamy R., Savithri H.S. (2011) Functional Characterization of Coat Protein and V2 Involved in Cell to Cell Movement of *Cotton Leaf Curl Kokhran Virus-Dabawali*. PLoS One 6:e26929.

Preiss W., Jeske H. (2003) Multitasking in replication is common among geminiviruses. J Virol 77:2972–2980.

R Core Team. (2012) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.

Rahman J., Karjee S., Mukherjee S. (2012) MYMIV-AC2, a Geminiviral RNAi Suppressor Protein, Has Potential to Increase the Transgene Expression. Appl Biochem Biotechnol 167:758-775.

Rech E.L., Aragao F.J.L. (1998) Biobalística. In: Brasileiro, A. C. M.; Carneiro, V. T. C. eds. Manual de Transformação genética de plantas p307.

Reinhart B.J., Slack F.J., Basson M., Pasquinelli A.E., Bettinger J.C., Rougvie A.E., Horvitz H.R., Ruvkun G. (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. Nature 403:901-6.

Reinhart B.J., Weinstein E.G., Rhoades M.W., Bartel B., Bartel D.P. (2002) MicroRNAs in plants. Genes Dev 16:1616-26.

Reyes J.L., Chua N.H. (2007) ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination. Plant J 49:592-606.

Ribeiro S.G. (2006) Diversity and host interactions of emerging tomato begomoviruses in Brazil. PhD thesis, Wageningen University, The Netherlands.

Ribeiro S.G., Ambrozevicius L.P., Avila A.C., Bezerra I.C., Calegario R.F., Fernandes J.J., Lima M.F., de Mello R.N., Rocha H., Zerbini F.M. (2003) Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. Arch Virol 148:281-95.

Ribeiro S.G., Ávila A.C., Bezerra I.C., Fernandes J.J., Faria J.C., Lima M.F., Gilbertson R.L., Zambolim E.M., Zerbini F.M. (1998) Widespread Occurrence of

Tomato Geminiviruses in Brazil, Associated with the New Biotype of the Whitefly Vector. *Plant Disease* 82:830.

Ribeiro S.G., Lohuis H., Goldbach R., Prins M. (2007a) Tomato chlorotic mottle virus is a target of RNA silencing but the presence of specific short interfering RNAs does not guarantee resistance in transgenic plants. *J Virol* 81:1563-73.

Ribeiro S.G., Martin D.P., Lacorte C., Simoes I.C., Orlandini D.R., Inoue-Nagata A.K. (2007b) Molecular and Biological Characterization of Tomato chlorotic mottle virus Suggests that Recombination Underlies the Evolution and Diversity of Brazilian Tomato Begomoviruses. *Phytopathology* 97:702-11.

Ribeiro S.G., Melo L.V., Boiteux L.S., Kitajima E.W., Faria J.C. (1994) Tomato infection by a geminiviruses in the Federal District, Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 19:330.

Rojas M.R., Gilbertson R.L., Russell D.R., Maxwell D.P. (1993) Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77:340-347.

Rojas M.R., Hagen C., Lucas W.J., Gilbertson R.L. (2005) Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annu Rev Phytopathol* 43:361-94.

Rojas M.R., Jiang H., Salati R., Xoconostle-Cazares B., Sudarshana M.R., Lucas W.J., Gilbertson R.L. (2001) Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, Tomato yellow leaf curl virus. *Virology* 291:110-25.

Rojas M.R., Noueiry A.O., Lucas W.J., Gilbertson R.L. (1998) Bean Dwarf mosaic geminivirus movement proteins recognize DNA in a form- and size-specific manner. *Cell* 95:105-13.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanchez-Duran M.A., Dallas M.B., Ascencio-Ibanez J.T., Reyes M.I., Arroyo-Mateos M., Ruiz-Albert J., Hanley-Bowdoin L., Bejarano E.R. (2011) Interaction between geminivirus replication protein and the SUMO-conjugating enzyme is required for viral infection. *J Virol* 85:9789-800.

Sanderfoot A.A., Lazarowitz S.G. (1996) Getting it together in plant virus movement: cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. *Trends Cell Biol* 6:353-8.

Santana F.M., Ribeiro S.G., Moita A.W., Moreira D.J.J., Giordano L.B. (2001) Sources of resistance in *Lycopersicon* spp. to a bipartite whitefly-transmitted geminivirus from Brazil. *Euphytica* 122:45-51.

Schott G., Mari-Ordonez A., Humber C., Alioua A., Voinnet O., Dunoyer P. (2012) Differential effects of viral silencing suppressors on siRNA and miRNA loading support the existence of two distinct cellular pools of ARGONAUTE1. *EMBO J* 31:2553-2565.

Scott J.W., Stevens M.R., Barten J.H.M., Thome C.R., Polston J.E., Schuster D.J., Serra C.A. (1996) Introgression of resistance to whitefly-transmitted geminiviruses from *Lycopersicon chilense* to tomato. In D. Gerling & R.T. Mayer (Eds.), *Bemisia 1995: Taxonomy, Biology, Damage Control and Management*. Andover, UK: Intercept:357-367.

Seal S.E., vandenBosch F., Jeger M.J. (2006) Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: Implications for sustainable control. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25:23-46.

Seki M., Narusaka M., Ishida J., Nanjo T., Fujita M., Oono Y., Kamiya A., Nakajima M., Enju A., Sakurai T., Satou M., Akiyama K., Taji T., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Kawai J., Hayashizaki Y., Shinozaki K. (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J* 31:279-92.

Shankara Naika, Joep van Lidt de Jeude, Marja de Goffau, Martin Hilmi, Dam B.v. (2006) A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização. Digigrafi, Wageningen, Países Baixos

Shivaprasad P.V., Chen H.M., Patel K., Bond D.M., Santos B.A., Baulcombe D.C. (2012) A microRNA superfamily regulates nucleotide binding site-leucine-rich repeats and other mRNAs. *Plant Cell* 24:859-74.

Singh D.K., Islam M.N., Choudhury N.R., Karjee S., Mukherjee S.K. (2007) The 32 kDa subunit of replication protein A (RPA) participates in the DNA replication of Mung bean yellow mosaic India virus (MYMIV) by interacting with the viral Rep protein. *Nucleic Acids Res* 35:755-70.

Sung Y.K., Coutts R.H. (1995) Mutational analysis of potato yellow mosaic geminivirus. *J Gen Virol* 76 (Pt 7):1773-80.

Sunkar R., Zhu J.K. (2004) Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *Plant Cell* 16:2001-19.

Sunter G., Bisaro D.M. (1997) Regulation of a geminivirus coat protein promoter by AL2 protein (TrAP): evidence for activation and derepression mechanisms. *Virology* 232:269-80.

Sunter G., Hartitz M.D., Bisaro D.M. (1993) Tomato golden mosaic virus leftward gene expression: autoregulation of geminivirus replication protein. *Virology* 195:275-80.

Suyal G., Mukherjee S.K., Srivastava P.S., Choudhury N.R. (2012) Arabidopsis thaliana MCM2 plays role(s) in mungbean yellow mosaic India virus (MYMIV) DNA replication. *Arch Virol*.

Takada S., Hibara K., Ishida T., Tasaka M. (2001) The CUP-SHAPED COTYLEDON1 gene of Arabidopsis regulates shoot apical meristem formation. *Development* 128:1127-35.

Takeoka G.R., Dao L., Flessa S., Gillespie D.M., Jewell W.T., Huebner B., Bertow D., Ebeler S.E. (2001) Processing Effects on Lycopene Content and Antioxidant Activity of Tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:3713-3717.

The Tomato Genome Consortium. (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485:635-41.

Todesco M., Rubio-Somoza I., Paz-Ares J., Weigel D. (2010) A collection of target mimics for comprehensive analysis of microRNA function in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* 6:e1001031.

Tomas D.M., Canizares M.C., Abad J., Fernandez-Munoz R., Moriones E. (2011) Resistance to Tomato yellow leaf curl virus accumulation in the tomato wild relative *Solanum habrochaites* associated with the C4 viral protein. *Mol Plant Microbe Interact* 24:849-61.

Ueki S., Citovsky V. (2007) Spread Throughout the Plant: Systemic Transport of Viruses, in: E. Waigmann and M. Heinlein (Eds.), *Viral Transport in Plants*, Springer Berlin Heidelberg. pp. 85-118.

Vadivukarasi T., Girish K.R., Usha R. (2007) Sequence and recombination analyses of the geminivirus replication initiator protein. *J Biosci* 32:17-29.

van Wezel R., Liu H., Tien P., Stanley J., Hong Y. (2001) Gene C2 of the monopartite geminivirus tomato yellow leaf curl virus-China encodes a pathogenicity determinant that is localized in the nucleus. *Mol Plant Microbe Interact* 14:1125-8.

Vanitharani R., Chellappan P., Pita J.S., Fauquet C.M. (2004) Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *J Virol* 78:9487-98.

Vidavski F. (2007) Exploitation of resistance genes found in wild tomato species to produce resistant cultivars; Pile up of Resistant Genes, in: H. Czosnek (Ed.), *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease*, Springer Netherlands. pp. 363-372.

Vieira B.G., Nogueira I., Costa A.F., Blawid R., Pereira-Carvalho R.C., Resende R.O., Boiteux L.S., Lacorte C., Ribeiro S.G., Fonseca M.E.N. (2011) Molecular phenotyping of Ty-1, Ty-2 and Ty-3 associated markers in new sources of resistance to Tomato chlorotic mottle virus in *Solanum* (Section *Lycopersicon*) Germplasm. In: III Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, 2011, Ilhéus. Abstract III Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, Ilhéus:87.

Villani M.E., Morgun B., Brunetti P., Marusic C., Lombardi R., Pisoni I., Bacci C., Desiderio A., Benvenuto E., Donini M. (2009) Plant pharming of a full-sized, tumour-targeting antibody using different expression strategies. *Plant Biotechnol J* 7:59-72.

Voinnet O. (2005) Non-cell autonomous RNA silencing. *FEBS Lett* 579:5858-71.
Voinnet O. (2009) Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* 136:669-87.

Waigmann E., Ueki S., Trutnyeva K., Citovsky V. (2004) The Ins and Outs of Nondestructive Cell-to-Cell and Systemic Movement of Plant Viruses. *Critical Reviews in Plant Sciences* 23:195-250.

Wang H., Hao L., Shung C.Y., Sunter G., Bisaro D.M. (2003) Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Plant Cell* 15:3020-32.

Wege C., Siegmund D. (2007) Synergism of a DNA and an RNA virus: enhanced tissue infiltration of the begomovirus *Abutilon mosaic virus* (AbMV) mediated by *Cucumber mosaic virus* (CMV). *Virology* 357:10-28.

Woo H.R., Kim J.H., Nam H.G., Lim P.O. (2004) The delayed leaf senescence mutants of *Arabidopsis*, *ore1*, *ore3*, and *ore9* are tolerant to oxidative stress. *Plant Cell Physiol* 45:923-32.

Wu G., Park M.Y., Conway S.R., Wang J.W., Weigel D., Poethig R.S. (2009) The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell* 138:750-9.

- Yun J.J., Heisler L.E., Hwang, H., Wilkins O., Lau S.K., Hycza M., Jayabalasingham B., Jin J., McLaurin J., Tsao M.S., Der S.D. (2006) Genomic DNA functions as a universal external standard in quantitative real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 34:e85.
- Zambrano K., Carballo O., Geraud F., Chirinos D., Fernández C., Marys E. (2007) First Report of Tomato yellow leaf curl virus in Venezuela. *Plant Disease* 91:768-768.
- Zamir D., Ekstein-Michelson I., Zakay Y., Navot N., Zeidan M., Sarfatti M., Eshed Y., Harel E., Pleban T., van-Oss H., Kedar N., Rabinowitch H.D., Czosnek H. (1994) Mapping and introgression of a tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, TY-1. *Theoretical and Applied Genetics* 88:141-146.
- Zhang S.C., Ghosh R., Jeske H. (2002) Subcellular targeting domains of Abutilon mosaic geminivirus movement protein BC1. *Arch Virol* 147:2349-63.
- Zhang S.C., Wege C., Jeske H. (2001) Movement proteins (BC1 and BV1) of Abutilon mosaic geminivirus are cotransported in and between cells of sink but not of source leaves as detected by green fluorescent protein tagging. *Virology* 290:249-60.
- Zhu J.K. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* 53:247-73.