

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOLÓGICA DE UM
ISOLADO DE TOMATO YELLOW VEIN STREAK VIRUS**

LEONARDO CUNHA DE ALBUQUERQUE

BRASÍLIA
2008

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOLÓGICA DE UM
ISOLADO DE TOMATO YELLOW VEIN STREAK VIRUS**

Leonardo Cunha de Albuquerque

Orientadora: Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata

**Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Fitopatologia, do
Departamento de Fitopatologia da
Universidade de Brasília, como requisito
para obtenção do grau de Mestre em
Fitopatologia.**

BRASÍLIA

2008

Dissertação de Mestrado realizada junto ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília sob orientação da Pesquisadora Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata. Apoio institucional da Embrapa Hortaliças e financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Banca examinadora:

Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata (Orientadora)

Universidade de Brasília

Pesquisadora da Embrapa Hortaliças

Dr. Renato de Oliveira Resende

Universidade de Brasília

Dr. Tatsuya Nagata

Universidade Católica de Brasília - UCB

Aos meus pais *Francisco Eudes* e *Francisca Fátima C. de Albuquerque*, aos meus irmãos *Gladson* e *Leila C. de Albuquerque*, **dedico**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente a minha orientadora Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata, pelos ensinamentos, orientação, exemplo de profissionalismo, amizade nos momentos difíceis, conselhos preciosos e incentivos durante a realização deste trabalho.

À minha família de um modo geral, em especial aos meus pais Francisco Eudes de Albuquerque e Francisca Fátima C. de Albuquerque e meus irmãos Leila e Gladson C. de Albuquerque pelo amor, compreensão e confiança.

Ao Dr. Leonardo de Britto Giordano, pelo exemplo e por ter me concedido uma oportunidade no início da minha carreira científica.

Aos meus amigos da Embrapa Hortaliças, Lúcio Flávio Barbosa e Oneilson Medeiros de Aquino pela colaboração, alegria e amizade, fundamentais durante a condução de toda a dissertação.

Aos meus amigos Anelise Franco Orílio, Cristiane Lopes de Oliveira, Fernanda Rausch Fernandes, Carolina Franco Mello, Mariana Martins, Érico Dianese, Sarah da Silva Barreto, Fabrício Magalhães, Pedro Paulo Ferreira Lemos, Silvia Aranha, Vinícius, Paulo de Tarso Oliveira, Patrícia da Silva e em especial a Mariana Hallwass pelo auxílio, dicas e correções e a Edmécia Chaves pela fundamental colaboração durante os experimentos.

Aos meus amigos Cristiano Nascimento, Juarez Junior e Wellington Zahn pela amizade e incentivo.

Aos professores, funcionários e colegas do curso de Pós-Graduação em Fitopatologia, pelos ensinamentos científicos. Em especial, ao amigo Magno Carvalho pela amizade e companheirismo durante todo o curso.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro concedido.

À Embrapa Hortaliças por oferecer a infra-estrutura para a execução dos experimentos.

ÍNDICE

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUÇÃO.....	5
CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
1.1. Família <i>Geminiviridae</i> – Importância econômica.....	8
1.2. Aspectos taxonômicos da família <i>Geminiviridae</i>.....	10
1.3. Características moleculares do gênero <i>Begomovirus</i>.....	15
1.4. Ciclo replicativo da família <i>Geminiviridae</i>.....	21
1.5. Variabilidade genética dos begomovírus.....	22
1.6. Transmissão de begomovírus por insetos.....	26
1.7. Begomovírus em tomateiro no Brasil.....	28
1.8. Begomovírus em batateira no Brasil.....	30
OBJETIVO.....	32
CAPÍTULO 2 - MÉTODO SIMPLES PARA CLONAGEM DO GENOMA COMPLETO DE BEGOMOVÍRUS USANDO A DNA POLIMERASE DO BACTERIÓFAGO ϕ29	
2.1. Introdução.....	33
2.2. Material e Métodos.....	35
2.3. Resultados.....	39
2.4. Discussão.....	42
CAPÍTULO 3 - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOLÓGICA DE UM ISOLADO DE TOMATO YELLOW VEIN STREAK VIRUS	
3.1. Introdução.....	44
3.2. Material e Métodos.....	46
3.3. Resultados.....	52
3.3. Discussão.....	68
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

ÍNDICE
FIGURAS E TABELAS

CAPÍTULO 2

Figura 1.....	39
Figura 2.....	40
Figura 3.....	41

CAPÍTULO 3

Figura 1.....	53
Figura 2.....	54
Figura 3.....	55
Tabela 1.....	57
Figura 4.....	57
Tabela 2.....	59
Figura 5.....	60
Figura 6.....	61
Figura 7.....	62
Figura 8.....	63
Figura 9.....	64
Tabela 3.....	65
Figura 10.....	67

RESUMO

A família *Geminiviridae* é caracterizada pela morfologia geminada das partículas e genoma composto por DNA circular de fita simples. Esta família é dividida em quatro gêneros, *Mastrevirus*, *Begomovirus*, *Curtovirus* e *Topocuvirus*, de acordo com a espécie de inseto vetor, círculo de hospedeiros e organização genômica. Os begomovírus, em sua maioria, possuem dois componentes genômicos (DNA-A e DNA-B), são transmitidos por *Bemisia tabaci* (mosca-branca) e infectam plantas dicotiledôneas. A disseminação de begomovírus em diversas partes do Brasil está associada à introdução e dispersão do biótipo B de *B. tabaci*, que atualmente tem destacada importância como vetor dos begomovírus, não apenas para o tomateiro, mas também para outras hortaliças e mais recentemente, a batata (primeiro relato feito há mais de 20 anos). Atualmente, esse grupo de vírus parece ser o mais importante afetando tomate (e batata, em surtos eventuais) no estado de São Paulo. O objetivo deste trabalho foi caracterizar molecular e biologicamente um begomovírus isolado de batata, denominado Ba-3, provavelmente pertencente à espécie Tomato yellow vein streak virus. Inicialmente, um novo método de clonagem foi desenvolvido utilizando a DNA polimerase do bacteriófago $\phi 29$ via amplificação isotérmica em círculo rolante (RCA). Esta técnica se mostrou eficiente e simples para a realização de clonagens dos begomovírus. Para caracterização molecular, o genoma completo do Ba3 foi amplificado por RCA, clonado e a sequência genômica determinada. Para o seqüenciamento completo do DNA-A e DNA-B foram utilizados primers do vetor e primers internos em ambas as orientações. Análises comparativas indicaram que a identidade de seqüências do DNA-A do isolado Ba3 foi menor que 88% quando comparado com qualquer outro begomovírus com seqüência registrada até o momento, sugerindo que este isolado representa, provavelmente, uma nova espécie do gênero, nomeado como Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV). Para o círculo de hospedeiros, clones contendo 1,5 cópias dos componentes virais foram produzidos e inoculados através de bombardeamento de partículas em plantas cultivadas e daninhas e a detecção realizada por PCR. A infecção foi comprovada em plantas de batata, tomate, *Nicotiana benthamiana* e *Nicandra physaloides*. Para o estudo preliminar de pseudo-recombinação, clones infecciosos dos vírus *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Sida micrantha* mosaic virus

(SimMV) e *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) foram utilizados. Foram observados sintomas em plantas de tomate inoculadas com DNA-A de ToYVSV-[Ba3] + DNA-B de ToSRV, DNA-A de ToSRV + DNA-B de ToYVSV-[Ba3] e DNA-A de ToRMV + DNA-B de ToYVSV-[Ba3] indicando que este isolado pode pseudo-recombinar com outros begomovírus. Estes resultados, juntamente com os estudos mais detalhados que permanecem em andamento, contribuirão para a validação do Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV) como uma espécie definitiva no gênero *Begomovirus*.

ABSTRACT

The *Geminiviridae* family is characterized by a geminated particle morphology and circular single-stranded DNA genome. This family is divided in four genera, *Mastrevirus*, *Begomovirus*, *Curtovirus* and *Topocuvirus*, based on insect vector species, host range and genome organization. The majority of begomoviruses has two genomic components (DNA-A and DNA-B), and they are transmitted by *Bemisia tabaci* (whitefly) for dicotyledonous plants. In most regions of Brazil, the begomovirus dissemination has been associated to the introduction and spread of the B biotype of *B. tabaci*. They occur not only on tomatoes, but also on other vegetables and more recently, on potatoes (the first report was done more than 20 years ago). Currently, this virus seems to be the most important one infecting tomato (and potato in occasional epidemics) in the state of São Paulo. The objective of the present work was to characterize on its biological and molecular aspects the begomovirus isolated from potato, named Ba3, probably belonging to Tomato yellow vein streak virus species. Initially, a new cloning method was developed using the bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase through rolling circle isothermal amplification (RCA). This technique was demonstrated to be efficient and simple for begomovirus genome cloning. For the molecular characterization, the complete genome of Ba3 was amplified, cloned and the genome sequence determined. The complete sequencing of DNA-A and DNA-B was done using vector and internal primers in both orientations. Analysis indicated that the Ba3 DNA-A sequence shared less than 88% nucleotide identity with any other begomovirus sequence available, suggesting that this isolate most likely represents a new species of *Begomovirus* genus, named Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV). For host range studies, clones containing 1.5 copies of each genome segment were inoculated via particle bombardment in cultivated and weed plants, and detection done by PCR. Infection was confirmed in potato, tomato, *Nicotiana benthamiana* and *Nicandra physaloides* plants. For a preliminary study of the ability to form pseudo-recombinants, infectious clones of the viruses *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Sida micrantha* mosaic virus (SimMV) and *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) were used. Symptoms were observed in tomato plants inoculated with DNA-A of ToYVSV-[Ba3] + DNA-B of ToSRV, DNA-A of ToSRV + DNA-B of ToYVSV-[Ba3] and DNA-A of ToRMV + DNA-B of ToYVSV-

[Ba3] indicating that this isolate can form viable pseudo-recombinants with other begomoviruses. These results, together with more detailed studies which remain in course, will contribute to validate Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV) as a definite species.

INTRODUÇÃO GERAL

A família *Geminiviridae* é caracterizada estruturalmente pela morfologia geminada da partícula viral, e, geneticamente, por possuir uma (monopartidos) ou duas (bipartidos) moléculas de DNA circular de fita simples (ssDNA) (Lazarowitz, 1992). Esta família é dividida em quatro gêneros, *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus* e *Topocuvirus*, de acordo com a organização genômica, círculo de hospedeiros e inseto vetor (Fauquet *et al.*, 2000). Os begomovírus possuem grande importância econômica, sendo uma das maiores ameaças à agricultura, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Morales & Anderson, 2001; Monci *et al.*, 2002; Briddon, 2003).

Os begomovírus são transmitidos naturalmente por *Bemisia tabaci* (Homóptera: Aleyrodidae), conhecida popularmente como “mosca-branca”. Em 1973, Costa *et al.* (1973) relataram surtos populacionais de *B. tabaci* associados com o aumento do cultivo de soja no Brasil. A soja é uma excelente hospedeira da *B. tabaci* e, como praga, praticamente não causa danos a essa cultura. No entanto, após a maturação e a colheita da soja a migração do inseto para plantios de feijoeiro cultivados próximos às regiões produtoras de soja levou à disseminação do begomovírus *Bean golden mosaic virus* (BGMV), agente causal do mosaico dourado do feijoeiro (Costa, 1975).

O aumento populacional de *B. tabaci* observado no Brasil durante a década de 1970 não levou à disseminação de begomovírus na cultura do tomateiro, provavelmente porque o biótipo A predominante naquela época colonizava o tomateiro com baixa eficiência (Bedford *et al.*, 1994). Em alguns países da América Latina e América do Norte, ao longo da década de 1980, perdas substanciais foram relatadas em tomateiros como resultado de infecção por begomovírus. Nessas regiões predominava o biótipo B de *B. tabaci* e que a partir de 1992 também foi relatado no Brasil (Melo, 1992). Ao contrário do já existente biótipo A, o biótipo B mostrou-se extremamente adaptado ao tomateiro e disseminou-se rapidamente pelas regiões quentes e secas do Brasil (Lourenção & Nagai, 1994; França *et al.*, 1996). Concomitantemente, relatos de sintomas típicos de infecção por begomovírus em tomateiros ocorreram no Distrito Federal (Ribeiro *et al.*, 1994), no Triângulo Mineiro (Resende *et al.*, 1996; Zerbini *et al.*, 1996), no Rio de Janeiro (Galvão *et al.*, 1998), em São Paulo (Faria *et al.*, 1997), na região Nordeste, incluindo o estado da Bahia (Ribeiro *et al.*,

1996) e região do Sub-Médio do São Francisco (Bahia e Pernambuco), até então a principal região produtora de tomate para processamento industrial no Brasil (Bezerra *et al.*, 1997). A explicação mais provável para o surgimento repentino e disseminação de begomovírus não apenas na cultura do tomateiro, mas também em outras hortaliças e mais recentemente na batata, é a capacidade do Biótipo B de *B. tabaci* em colonizar plantas silvestres e daninhas, possibilitando que vírus nativos presentes nessas plantas sejam transferidos para outras hospedeiras. Essa característica de polifagia do biótipo B permite que begomovírus diferentes infectem a mesma planta possibilitando infecções mistas. Essas infecções aumentam a probabilidade de eventos de recombinação e/ou pseudo-recombinação entre componentes genômicos que podem levar ao surgimento de novas espécies mais adaptadas.

Atualmente, os bancos de dados públicos listam 13 espécies de begomovírus isolados de tomateiro no Brasil: *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato mottle leaf curl virus* (TMoLCV), *Tomato golden vein virus* (TGVV), *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), *Tomato chlorotic vein virus*, *Tomato severe mosaic virus*, *Tomato infections yellow virus*, *Tomato crinkle leaf yellow virus* e *Tomato mild leaf curl virus*. As espécies *Tomato golden mosaic virus*, *Tomato chlorotic mottle virus*, *Tomato rugose mosaic virus* e *Tomato severe rugose virus* são aceitas como espécies definitivas e as demais esperam por uma definição taxonômica. Porém, dessas 13 espécies listadas apenas 3 espécies (ToSRV, TGVV e TMoLCV) aparentemente predominam no Brasil (Fernandes *et al.*, 2008), indicando que o processo seletivo é favorável à sobrevivência dos begomovírus mais bem adaptados.

A caracterização molecular e biológica das espécies de begomovírus que estão surgindo no Brasil aumentará o conhecimento com relação à variabilidade genética e diferenças e semelhanças patogênicas entre begomovírus. O estudo de pseudo-recombinação entre espécies virais distintas é uma maneira fácil e confiável para detectar a relação evolutiva entre begomovírus bipartidos. Estes conhecimentos fornecerão, no futuro, informações fundamentais para o desenvolvimento de estratégias eficientes para o controle de begomovírus em diversas hospedeiras.

Em batata (*Solanum tuberosum*), o primeiro relato de begomovírus no Brasil foi feito no início da década de 1980 por Daniels & Castro (1985). Posteriormente, esse isolado

foi clonado e sequenciado parcialmente, demonstrando alta identidade de seqüência (97%) com um vírus previamente descrito em tomate por Faria *et al.* (1997), denominado de Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV-U79998). Neste trabalho um isolado de batata, denominado de Ba3, causando sintomas de mosaico com deformação foliar, foi selecionado e submetido ao estudo de caracterização molecular e biológica.

Alguns dos estudos mais importantes sobre diversidade dos begomovírus brasileiros são baseados no seqüenciamento parcial do genoma desses vírus, porém estudos recentes têm mostrado que, cada vez mais, a seqüência completa do genoma é importante para o entendimento da diversidade genética e da dinâmica populacional desses vírus. No entanto, a clonagem completa dos componentes genômicos, tão importante na caracterização molecular e no estudo filogenético, é limitado pela baixa eficiência dos métodos de clonagem existentes. Para suprir essa limitação, um método simples para amplificação de DNA circular usando a DNA polimerase do bacteriófago $\phi 29$, denominado de TempliPhi (Amersham Biosciences, atualmente GE), foi desenvolvido para clonagem do genoma de begomovírus.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Família *Geminiviridae* – Importância econômica

Algumas espécies de vírus, pertencentes à família *Geminiviridae*, são responsáveis por severas perdas econômicas em todo o mundo. O aumento mundial da população e da distribuição do inseto vetor facilita o surgimento de novas doenças limitando a produção agrícola, particularmente em regiões tropicais e subtropicais no mundo (Rojas et al., 2005). Espécies como o *African cassava mosaic virus* (ACMV) em mandioca (*Manihot esculenta*) nos países africanos (Varma & Malathi, 2003), *Bean golden mosaic virus* (BGMV) em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) nas Américas (Morales & Anderson, 2001), *Maize streak virus* (MSV) em milho (*Zea mays*) na África (Martin et al., 1999) e em tomate (*Solanum lycopersicum*) o *Tomato leaf curl virus* (ToLCV) e *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) na África, nas Américas, Ásia, Austrália e partes da Europa (Varma & Malathi, 2003) têm causado sérios problemas na agricultura mundial. Perdas econômicas devido a infecções provocadas por geminivírus em mandioca são estimadas em 2 bilhões de dólares anuais na África (Rojas et al., 2005), 5 bilhões, entre 1992 – 97, para algodão no Paquistão (Briddon & Markham, 2000), 300 milhões de dólares anuais em leguminosas na Índia (Varma et al., 1992) e 140 milhões de dólares entre 1991-92 na Flórida somente em tomate (Moffat, 1999). Nas últimas duas décadas a incidência e severidade das doenças causadas por geminivírus têm aumentado rapidamente em várias áreas do mundo. O aumento na incidência de vírus, membros do gênero *Begomovirus* no Brasil, está especificamente associado à explosão populacional da mosca-branca (*Bemisia tabaci*) (Ribeiro et al., 2002).

Em tomate, o TYLCV assume posição de destaque causando sérios problemas econômicos, com perdas, frequentemente, chegando a 100% no campo (Czosnek & Laterrot, 1997). Este vírus é amplamente distribuído na África, nas Américas do Norte e Central, Ásia, Austrália e parte da Europa. Espécies que causam o Tomato yellow leaf curl disease (TYLCD) foram primeiramente observadas em Israel em 1939-1940 e o surgimento da doença coincidiu com o aumento da população de mosca-branca (Varma & Malathi,

2003). Tal vírus foi primeiramente descrito em Israel, em 1964, onde ainda se constitui um fator limitante à cultura do tomateiro (Czosnek *et al.*, 1988; Cohen & Antignus, 1994). Em Marrocos, o tomate é a segunda cultura em importância para exportação. A ocorrência do TYLCD, neste país, foi descrita inicialmente em 1996-1997, e em 1998 já havia disseminado em todas as áreas produtoras de tomate (Jebbour, 2001). No final da década de 1980, TYLCD também havia disseminado nas Américas e Europa (Accotto *et al.*, 2000). Nas Américas a introdução de geminivírus do “velho mundo” é considerada, na história dos geminivírus transmitidos por mosca-branca, uma tragédia, afetando culturas de alto valor econômico. Essa entrada ocorreu no Caribe em 1989-1990, quando um isolado de TYLCV-Israel, surgiu na República Dominicana (Polston *et al.*, 1996). Este vírus foi provavelmente introduzido por meio de tomate infectado importado de Israel, e rapidamente causou o colapso na indústria de tomate, onde perdas na produção entre 1989 e 1995 causadas pelo TYLCV têm sido estimadas em 50 milhões de dólares (Gonzales *et al.*, 1995; McGlashan *et al.*, 1994). Na Flórida, o TYLCV foi detectado em junho de 1997 e em abril de 1998 foi observada 100% de incidência nos campos de tomate (Polston *et al.*, 1999). Na Europa, o TYLCV foi primeiramente descrito na Sardenia em 1988 (Gallitelli *et al.*, 1991) e subsequentemente na Sicília e sul da Itália (Polizzi & Areddia, 1992).

Os geminivírus transmitidos por mosca-branca são espécies do gênero *Begomovirus*, nome derivado de um dos primeiros vírus transmitidos por mosca-branca na América Latina: *Bean golden mosaic virus* (BGMV). Este vírus foi primeiramente observado em 1961 no estado de São Paulo infectando feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) e feijão lima (*P. lunatus*). Costa (1965) descreveu três doenças do feijoeiro transmitidas por mosca-branca no estado de São Paulo. A primeira, “Crumpling” causada por *Euphorbia mosaic virus*, transmitida a partir da planta daninha *Euphorbia prunifolia*. A incidência dessa doença foi considerada baixa e sem importância. A segunda, “Mottled dwarf” causada por *Abutilon mosaic virus*, transmitida a partir de *Sida* spp. para plantas de feijão. A incidência dessa doença em plantas daninhas da família Malvaceae é alta, mas em cultura de feijão não passa dos 5%. Posteriormente essa doença foi renomeada como Bean dwarf mosaic (Costa, 1975). E a terceira, “Golden mosaic”, considerada como um potencial patógeno causador de epidemias quando comparada com as duas primeiras, mas de importância econômica insuficiente para justificar qualquer medida de controle. Na década

seguinte, o Bean golden mosaic disseminou-se completamente pelos dois mais importantes estados produtores de feijão do Brasil: São Paulo e Paraná (Costa, 1975).

No Brasil, Costa *et al.* (1975) relataram seis begomovírus induzindo mosaico dourado em tomate no estado de São Paulo. Um desses vírus foi purificado e nomeado *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) (Matyis *et al.*, 1975). Nessa mesma época, a incidência de TGMV foi atribuída à migração do vetor a partir da soja e do feijão e a existência de reservatórios de vírus, com a alta incidência tomate para processamento durante o outono (Costa, 1976). Em meados da década de 1990, o biótipo B de *B. tabaci* foi introduzido no Brasil. Ao contrário do já existente biótipo A, no qual normalmente não colonizava tomate, o biótipo B mostrou-se extremamente adaptado a esse hospedeiro (Lourenção & Nagai, 1994; França *et al.*, 1996). Desde então, novos begomovírus têm emergido e severas epidemias com perdas econômicas significativas foram relatadas em tomateiro no Brasil nos últimos anos.

1.2. Aspectos taxonômicos da família *Geminiviridae*

A família *Geminiviridae* é caracterizada estruturalmente pela morfologia geminada da partícula viral, com aproximadamente 18-30 nm e geneticamente por possuir uma (monopartidos) ou duas (bipartidos) moléculas de DNA circular de fita simples (ssDNA). Cada uma das moléculas apresenta aproximadamente 2500-3000 nucleotídeos encapsidada por uma única proteína estrutural que se arranja na forma de 22 capsômeros formando dois icosaedros incompletos que confere o aspecto geminado das partículas virais, característico desta família de vírus de plantas (Lazarowitz, 1992).

A família *Geminiviridae* é dividida em quatro gêneros, *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus* e *Topocuvirus*, de acordo com a organização genômica, círculo de hospedeiros e inseto vetor (Fauquet *et al.*, 2000).

Os vírus pertencentes ao gênero *Mastrevirus* possuem genoma monopartido, são transmitidos por cigarrinhas (Homoptera: Cicadellidae) e infectam, geralmente, espécies monocotiledôneas, tais como *Wheat dwarf virus* (WDV), *Digitaria streak virus* (DSV) e *Maize streak virus* (MSV), sendo este último a espécie-tipo do gênero *Mastrevirus*. Como exceções, existem algumas espécies dentro do gênero que são adaptadas a plantas

dicotiledôneas, tais como *Tabacco yellow dwarf virus* (TYDV) (Morris *et al.*, 1992) e *Bean yellow dwarf virus* (BeYDV) (Liu *et al.*, 1997). Todas as espécies do gênero são encontradas no “velho mundo”.

O gênero *Curtovirus*, espécie-tipo *Beet curly top virus* (BCTV), possui espécies que são transmitidas por cigarrinhas (Homóptera: Cicadellidae), também possui genoma monopartido, assim como os *Mastrevirus*. No entanto, estas apresentam diferenças na organização genômica e infectam plantas dicotiledôneas. O gênero *Curtovirus* consiste de cinco espécies: *Beet curly top virus* (BCTV), *Beet severe curly top virus* (BSCTV), *Beet mild curly top virus* (BMCTV), *Horseradish curly top virus* (HrCTV) e, mais recentemente, *Spinach curly top virus* (SCTV), sendo que todos causam o “curly top disease” em plantas dicotiledôneas (Baliji *et al.*, 2004; Fouquet & Stanley, 2005). Os vírus pertencentes a este grupo podem ser encontrados tanto no “velho” quanto no “novo mundo”.

O gênero *Begomovirus* inclui os geminivírus que podem possuir genoma tanto monopartido quanto bipartido, são transmitidos por biótipos de mosca-branca (*Bemisia tabaci*) e infectam um amplo ciclo de plantas dicotiledôneas tanto no “velho” quanto no “novo mundo” (Rojas *et al.*, 2005). Entre os membros mais comumente estudados que apresentam genoma bipartido estão o *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV), espécie-tipo do gênero (Fauquet *et al.*, 2000), *African cassava mosaic virus* (ACMV), *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) e *Squash leaf curl virus* (SLCV). Entre os monopartidos destaca-se a espécie *Tomato yellow leaf curl virus* (Gutierrez, 2002).

O último gênero a ser incluído dentro da família *Geminiviridae* foi o *Topocuvirus*, possuindo apenas um membro, *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV). Possui genoma monopartido e é transmitido a plantas dicotiledôneas através de membracídeos (Homoptera: Auchenorrhynca). Análises do genoma de TPCTV revelam características típicas tanto do gênero *Mastrevirus* quanto do *Begomovirus*, indicando ser um recombinante natural (Bridson *et al.*, 1996).

A maioria dos vírus de plantas possui genoma constituído de RNA, assim, os geminivírus representam um dos poucos exemplos de vírus de DNA que estabeleceram com sucesso o parasitismo em plantas. Evidências sugerem que os geminivírus tenham evoluído a partir de bacteriófagos, como ϕ X174, ou de plasmídeos bacterianos com genoma composto de ssDNA (Koonin & Ilyina, 1992). Essa evolução pode ter ocorrido a

partir de replicons extracromossomais de DNA, presente em procariontes ou eucariontes primitivos, onde, esse ancestral é descrito como DNA plasmidial circular fita simples extracromossomal que replica via mecanismo círculo rolante e envolve uma forma replicativa de DNA fita dupla. Evidências que este ancestral surgiu inicialmente na evolução baseiam-se tanto na natureza conservada da Rep (Replication-associated protein), entre procariontes e replicons de DNA eucarióticos, quanto nas características procarióticas presentes nos geminivírus modernos: como promotor da proteína capsidial funcional em *E. coli*, mRNA policistrônico e a capacidade de replicar em células procarióticas (Frischmuth *et al.*, 1990; Selth *et al.*, 2002). Essa capacidade de replicação foi demonstrada em *Tomato leaf curl virus* (TLCV), onde se observou a acumulação do DNA viral em *Agrobacterium tumefaciens* (Ridgen *et al.*, 1996). Assim, os geminivírus primitivos podem ter surgido há milhões de anos, e estes, provavelmente, possuindo somente um ou dois genes responsáveis pela replicação do DNA. Durante a evolução das células eucarióticas, estes replicons certamente co-evoluíram com as células hospedeiras adquirindo novos genes através de recombinações entre o DNA do hospedeiro ou entre outros replicons (Rojas *et al.*, 2005).

Análises filogenéticas sugerem que os geminivírus e os nanovírus evoluíram a partir de um ancestral comum ou de um evento evolutivo semelhante (Rybicki, 1994). O gênero *Nanovirus* possui genoma composto de ssDNA encapsidados em partículas isométricas e transmitidos por afídeos. Nos nanovírus poucas proteínas foram funcionalmente caracterizadas. A seqüência N-terminal da proteína capsidial (CP) e proteínas envolvidas com a replicação e ciclo celular têm sido estudadas. Evidências de que nanovírus e geminivírus tenham evoluído de um mesmo ancestral baseiam-se no fato de que, nos nanovírus, a replicação do genoma segue o mecanismo círculo rolante, muito similar aos bacteriófagos e aos geminivírus (Gronenborn, 2004), e o DNA apresenta uma estrutura conservada (“hairpin”) e a seqüência TAG/TTATTAC, muito similar ao nonanucleotídeo TAATATTAC presente nos geminivírus (Timchenko, 2000). Saunders & Stanley (1999) reforçam a idéia de um ancestral comum ao demonstrar a recombinação entre geminivírus e nanovírus produzindo um componente defectivo resultando em um complexo de vírus causando yellow vein disease em *Ageratum conyzoides*.

A partir de um processo de especiação ocorrido ao longo da evolução, em relação à estrutura genômica, tipo de vetor e hospedeiro, a família *Geminiviridae* foi dividida em

quatro gêneros. Resultados de comparações de seqüências e análise filogenéticas mostram que os gêneros *Mastrevirus* e *Begomovirus* são muito divergentes e que possivelmente o geminivírus ancestral tinha um único componente genômico que era transmitido a plantas monocotiledôneas por cigarrinhas. Mais tarde mudanças nas ORFs desse ancestral deram origem aos geminivírus transmitidos por mosca-branca e com apenas um componente, sendo este de ocorrência no velho mundo. Sugere-se, então, que o segundo componente genômico tenha surgido depois na escala evolutiva. O segundo componente que está presente em alguns begomovírus do “velho mundo” e em todos do “novo mundo” pode ter contribuído para aumentar o movimento do vírus dentro da planta e/ou na eficiência de transmissão pela mosca-branca (Padidam *et al.*, 1995b). A evolução do genoma bipartido provavelmente ocorreu antes da deriva continental, porque ocorre tanto no velho quanto no novo mundo (Rojas *et al.*, 2005)

Segundo Padidam (1999), o gênero *Curtovirus* possui um genoma híbrido, onde o gene da capa protéica é similar ao gênero *Mastrevirus* e o restante do genoma similar ao *Begomovirus*, propondo que os curtovírus podem ter evoluído após um vírus transmitido por mosca-branca (*Begomovirus*) adquirir a seqüência da capa protéica de um vírus transmitido por cigarrinha (*Mastrevirus*) por recombinação. Os curtovírus têm uma distribuição geográfica limitada e possuem menos espécies reconhecidas quando comparadas com os begomovírus, fato que pode ser o reflexo da limitada distribuição do inseto vetor.

Muitos begomovírus monopartidos infectam eficientemente certas plantas dicotiledôneas como, por exemplo, o tomate (*Solanum lycopersicum*). No entanto, evidentes limitações impostas pelo hospedeiro levaram estes a uma associação com outros tipos de moléculas ssDNA circular, nos quais provavelmente tenham co-evoluído independentemente com as plantas. A aquisição dessas moléculas, denominadas de DNA satélite, resultou em função(s) essencial(s) para o vírus “helper”, análogo a aquisição do DNA-B pelos begomovírus bipartidos (Rojas *et al.*, 2005). Dry *et al.* (1997) demonstraram, previamente, que o begomovírus *Tomato leaf curl virus* (ToLCV) estaria associado com uma molécula de ssDNA satélite e que esta não teria influência na replicação viral e nos sintomas causados por ToLCV. Tal DNA satélite com aproximadamente 682 nucleotídeos não possui seqüência relacionada ao ToLCV e requer este para replicação, movimento na

planta e transmissão pelo inseto vetor. Posteriormente, moléculas satélites relacionadas para o ToLCV foram identificadas em outros begomovírus monopartidos. Estas moléculas, denominadas DNA- β , com aproximadamente metade do genoma do seu vírus “helper” e semelhante a molécula satélite de ToLCV, precisa do cognato para replicar, movimentar na planta e ser transmitido pelo vetor (Briddon *et al.*, 2003). Diferente do DNA satélite de ToLCV, previamente descrito, o DNA- β afeta a replicação dos seu vírus “helper” e altera a indução de sintomas em algumas hospedeiras (Saunders *et al.*, 2000; Briddon *et al.*, 2001). Estas moléculas encontram-se difundidas em todo o “velho mundo”, onde begomovírus monopartidos ocorrem. Análises de seqüências têm revelado características altamente conservadas entre moléculas de DNA- β , consistindo de uma ORF conservada (β C1), uma região rica em adenina (A-rich region) e uma região com seqüência altamente conservada denominada SCR (satellite conserved region). Este SCR possui uma estrutura em forma de “hairpin” apresentando a seqüência TAAGTATTAC, similar à origem de replicação dos geminivírus e nanovírus (Briddon *et al.*, 2003).

Todas as moléculas de DNA- β associadas aos begomovírus identificadas até o momento têm origem no “velho mundo”. O único begomovírus associado com DNA- β conhecido com ocorrência no “novo mundo” é o *Honeysuckle yellow vein mosaic virus* (HYVMV) que infecta *Lonicera japonica*, utilizada para fins ornamentais (Briddon *et al.*, 2003). No entanto, HYVMV não é nativo do novo mundo, pois foi introduzido na América no Norte no início do século XIX e possui características associadas com os begomovírus do “velho mundo”. Esta evidência sugere que a evolução entre os begomovírus e DNA- β ocorreu após a deriva continental (Briddon *et al.*, 2003). Zhou *et al.* (2003) por meio da identidade de nucleotídeos compararam moléculas de DNA- β e seus respectivos vírus “helper” indicando que pode ter ocorrido uma co-evolução entre o DNA- β e seu cognato DNA viral.

1.3. Características moleculares do gênero *Begomovirus*

A maioria dos begomovírus possui genoma bipartido, conhecido como DNA-A e DNA-B, que são transcritos bidirecionalmente em ambos os genomas. O DNA-A codifica todas as proteínas necessárias para replicação, transcrição e encapsidação de ambos os

DNAs, enquanto o DNA-B contribui com as funções necessárias para o movimento do vírus na planta e desenvolvimento de sintomas (Rojas *et al.*, 2005). Assim, o componente A codifica a CP (Coat Protein ou AV1) no sentido viral e quatro proteínas no sentido complementar: Rep (Replication-associated protein ou AC1), TrAP (Transcriptional activator protein ou AC2), REn (Replication enhancer protein ou AC3) e AC4. O DNA-B codifica duas proteínas, uma no sentido viral, a NSP (Nuclear shuttle protein ou BV1), e outra no sentido complementar, a MP (Movement protein ou BC1). Ambos os componentes genômicos possuem tamanho parecido não compartilhando identidade de seqüência, exceto por uma região altamente conservada (>90%) denominada de região comum (RC) com aproximadamente 200 nucleotídeos (Fontes *et al.*, 1994; Stanley, 2004; Gutierrez, 2000). Geralmente, ambos os componentes genômicos, DNA-A e DNA-B, são necessários para a infecção sistêmica (Sunter & Bisaro, 1992), porém, Galvão *et al.* (2003) verificaram que em *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMV-[MG-Bt1]) o DNA-A, na ausência do DNA-B, foi capaz de infectar sistemicamente *Nicotiana benthamiana*. Mais recentemente, Fontenelle *et al.* (2007) demonstraram a capacidade desse mesmo vírus em infectar sistemicamente tomate (*S. lycopersicum*) e outras hospedeiras, na ausência do DNA-B.

A CP é a proteína capsidial dos geminivírus, onde os monômeros são arranjados em capsômeros produzindo a morfologia geminada da partícula viral. É uma proteína multifuncional, desempenhando funções como a de proteger o DNA viral durante a transmissão pelo inseto vetor ou transmissão mecânica; é essencial para transmissão e determina a especificidade do inseto vetor (Unselde *et al.*, 2004). Experimentos demonstram que a troca do gene CP do *African cassava mosaic virus* (ACMV), um begomovírus transmitido por mosca-branca, pelo correspondente do *Beet curly top virus* (BCTV), um curtovírus transmitido por cigarrinha, resultou na alteração da especificidade do inseto vetor (Briddon *et al.*, 1990).

Para *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), que infecta, predominantemente, solanáceas e um dos mais bem estudados geminivírus bipartidos, experimentos demonstram que a CP não é necessária para a infecção sistêmica ou desenvolvimento de sintomas. Gardiner *et al.* (1988) mostraram que mutantes ar1 de TGMV foram capazes de infectar sistemicamente *N. benthamiana* e que a CP tem influência na patogenicidade em alguns hospedeiros, onde alguns mutantes produziram sintomas tardios ou atenuados quando

comparados com TGMV não mutado. Embora esses mutantes tenham sido viáveis, análises de *Squash leaf curl virus* (SqLCV) têm mostrado que, em algumas condições, a CP pode ser necessária para infecção sistêmica. Recentemente, foi demonstrado que o movimento sistêmico do DNA-A de ToCMV-[MG-Bt1], na ausência do DNA-B, é dependente da capa protéica (Fontenelle *et al.*, 2007). Assim, a capacidade de begomovírus bipartidos mutantes para o gene CP em produzir infecção sistêmica pode estar restrita tanto ao hospedeiro quanto a características genéticas do vírus (Pooma *et al.*, 1996), como resultado disso, alguns vírus requerem e outros dispensam a CP para infecção sistêmica.

A proteína Rep (Replication-associated protein ou AC1) é uma proteína com, aproximadamente, 40 kDa e absolutamente necessária para replicação viral. Em todos os geminivírus testados até o momento, a Rep tem a capacidade de se ligar especificamente ao DNA, bem como, possuir atividade endonucleolítica, clivando o DNA em seqüências específicas (Gutierrez, 2002).

Muitas proteínas necessárias para a replicação viral são originadas da célula infectada, exceto a proteína Rep, uma vez que o genoma viral não codifica nenhuma DNA polimerase ou fatores acessórios. No entanto, estas proteínas não estão funcionais ou podem aparentemente estar ausentes em células diferenciadas. A replicação dos geminivírus não ocorre em tecidos meristemáticos, onde fatores de replicação são disponíveis, conseqüentemente assume-se que os geminivírus podem induzir a célula a um estágio favorável para sua replicação (Gutierrez, 2002). Evidências sugerem que a proteína Rep seja responsável pela reprogramação do ciclo celular. Estudos indicam que a infecção causada por geminivírus afeta diretamente a expressão gênica celular, onde a Rep induz a expressão de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) que é uma proteína nuclear e possui um papel fundamental na iniciação da proliferação celular. Demonstrou-se que o PCNA ocorre em células diferenciadas infectadas por TGMV, ao passo que, em células não infectadas por TGMV o PCNA não foi detectado (Nagar *et al.*, 1995). Outra proteína na qual a Rep também interage é o homólogo vegetal da proteína retinoblastoma (pRBR) que está envolvida na regulação negativa do ciclo celular (Rojas *et al.*, 2005), onde a transição da fase G1 para a fase S (período de replicação do DNA) do ciclo celular é regulada por essa proteína (Gutierrez, 2002). Assim, a proteína Rep possui múltiplas funções, não apenas

as relacionadas com a replicação, mas também as relacionadas com a expressão gênica, promovendo condições favoráveis para a síntese do DNA viral em células já diferenciadas.

A TrAP (Transcriptional activator protein ou AC2) é uma proteína com aproximadamente 15 kDa, sendo necessária para ativar a expressão da CP e da BV1 (proteína de movimento). Estudos têm mostrado que o acúmulo da CP de TGMV requer a ORF AC2 intacta e que o produto do gene AC2 trans-ativa a expressão da capa protéica. No entanto, essas observações não afetam a capacidade de mutantes da TrAP em causar infecção, uma vez que a CP, no geral, não é necessária para obter infectividade. Entretanto a BV1, que é necessária para disseminação do vírus na planta, na ausência da TrAP pode acumular de forma insuficiente, resultando em uma infecção não sistêmica (Sunter & Bisaro, 1992). Outra possível função da TrAP seria a de interagir e inativar Kinases, como adenosina kinase (ADK) e SNF1 que são enzimas envolvidas na defesa do hospedeiro. Wang *et al.* (2003) demonstraram que a atividade da ADK é reduzida em plantas transgênicas expressando a proteína viral TrAP e em plantas infectadas com geminivírus. Em contraste, a atividade da ADK é aumentada após a inoculação da planta com vírus de RNA (*Cucumber mosaic virus* e *Potato virus X*) ou com geminivírus mutantes com TrAP não funcional. Mostrou-se, previamente, que as proteínas TrAP de TGMV e TrAP de BCTV são determinantes de patogenicidade, causando aumento na suscetibilidade quando expressadas em plantas transgênicas (Sunter *et al.*, 2001).

REn (Replication enhancer protein, ou AC3) é uma proteína de aproximadamente 16 kDa (Gutierrez, 1999), altamente hidrofóbica, composta de apenas 134 aminoácidos. Esta proteína junto com a Rep, é necessária para uma eficiente replicação do DNA viral, onde a Rep aparece sendo essencial para a replicação, enquanto a REn uma proteína nuclear (Pedersen *et al.*, 1994; Nagar *et al.*, 1995) que interage com a Rep (Settlage *et al.*, 1996), aumenta o acúmulo de DNA viral por meio de um mecanismo ainda desconhecido (Castillo *et al.*, 2003). Alguns experimentos sugerem que a REn pode aumentar a afinidade da Rep na origem de replicação. Outra possibilidade é que a REn direciona a Rep para o domínio de ligação Rep/DNA no local de clivagem no início da replicação (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). Embora a proteína REn funcional não seja necessária para infectividade, estudos envolvendo mutações têm mostrado retardamento e atenuação de sintomas (Elmer *et al.*, 1988; Eteessami *et al.*, 1991). Acredita-se também que a REn regula

a interação entre a Rep e a pRBR. Esta observação é consistente, uma vez que os *Mastrevirus* não codificam uma proteína homóloga a REn e, nesses geminivírus, a Rep é responsável pela replicação, enquanto uma outra proteína, RepA, interage com pRBR (Settlage *et al.*, 2001).

A ORF AC4 presente em begomovírus bipartido é homóloga a ORF C4 de begomovírus monopartido como, por exemplo, ToLCV e TYLCV, onde tal ORF tem se mostrado importante na determinação da severidade dos sintomas e no movimento sistêmico do vírus na planta (Jupin *et al.*, 1994; Rigden *et al.*, 1994). No entanto, em alguns vírus bipartidos essa ORF mostrou ter efeito insignificante no que diz respeito a infectividade. Fontenelle *et al.* (2007) demonstraram através de mutantes da ORF AC4 de ToCMoV-[MG-Bt] que esta não está envolvida nem no desenvolvimento de sintomas nem no movimento sistêmico do vírus na planta, pois os mutantes de AC4 não distinguiram dos originais em relação a estes aspectos. Em contraste, resultados obtidos em ACMV e Sri Lanka cassava mosaic virus (SLCMV) demonstram que a ORF AC4 está envolvida na supressão de mecanismos de defesa anti-viral das plantas (Vanitharani *et al.*, 2004; Wezel *et al.*, 2002).

O DNA-B codifica duas proteínas, uma no sentido viral, a NSP (Nuclear Shuttle Protein ou BV1), e outra no sentido complementar, a MP (Movement Protein ou BC1). A NSP é necessária para o tráfego intracelular do DNA viral do núcleo para o citoplasma e a MP é responsável pelo movimento célula-a-célula, via plasmodesmas. O DNA viral é replicado no núcleo e o transporte do DNA (tanto ssDNA como dsDNA) para o citoplasma é mediado pela NSP (Noueiry *et al.*, 1994). A NSP interage com a MP, interação que é necessária para transferir o DNA para o complexo MP que é, então, conduzido através dos plasmodesmas (Sanderfoot & Lazarowitz, 1996). Estas proteínas de movimento interagem diretamente com o DNA viral, reconhecendo-o de maneira específica com base na forma e no tamanho, refletindo o estado replicativo do vírus (ds-DNA) e o tamanho do genoma (2,5 – 3,0 kb) (Noueiry *et al.*, 1994; Rojas *et al.*, 1998).

Algumas espécies de begomovírus apresentam genoma monopartido, o qual possui os genes necessários para desempenhar todas as funções essenciais do vírus, sejam aquelas relacionadas à replicação ou ao movimento viral célula-a-célula e a longa distância, e diferem em número de ORFs em relação ao DNA-A dos bipartidos. Estes vírus, ToLCV e

ToYLCV, possuem duas ORFs (CP e AV2) no sentido viral, enquanto os bipartidos apresentam apenas a CP (Padidam *et al.*, 1996). Em essência, o genoma dos begomovírus monopartidos é homólogo ao DNA-A de bipartidos. Os genes no sentido complementar C1, C2 e C3 são homólogos dos AC1, AC2 e AC3, respectivamente.

Recentemente, esses begomovírus monopartidos têm sido encontrados associados com moléculas satélites. Estas moléculas são definidas como vírus ou ácidos nucleicos que dependem do vírus “helper” para sua replicação, mas sem possuir uma alta identidade de sequência com o vírus “helper” e são dispensáveis para a proliferação viral (Mayo *et al.*, 2005). Um outro tipo de agente, denominado de ácido nucleico semelhante a satélite, também depende do vírus “helper” para replicação, mas possui funções necessárias para o sucesso biológico do vírus “helper” e, portanto, considerado como parte do genoma do mesmo (Briddon & Stanley, 2006).

O primeiro begomovírus satélite descoberto, referido como ToLCV-sat, foi isolado de tomate infectado por ToLCV, um begomovírus monopartido (Dry *et al.*, 1997). O ToLCV-sat não é necessário para a infectividade do ToLCV e não tem efeito na indução de sintomas pelo vírus “helper”, mas é dependente dele para sua replicação e encapsidação e, portanto, possui as características de DNA satélite (Briddon & Stanley, 2006).

Ageratum conyzoides é uma planta daninha que frequentemente apresenta sintoma de amarelecimento de nervura que é atribuído ao begomovírus monopartido *Ageratum yellow vein virus* (AYVV). Tal vírus foi isolado de plantas de *ageratum* infectadas e mostrou-se infectivo em *N. benthamiana* (Tan *et al.*, 1995). No entanto, quando o clone do componente genômico é reintroduzido em *ageratum* produz somente infecção assintomática (Saunders & Stanley, 1999; Saunders *et al.* 2000) sugerindo que, em contraste com ToLCV, outro fator seria necessário para restaurar a patogenicidade em seu hospedeiro natural. Em pesquisas preliminares, componentes recombinantes pequenos e circulares foram isolados de plantas de *ageratum* infectadas (Stanley *et al.*, 1997). Quando co-inoculados em *N. benthamiana* o recombinante comporta-se como um DNA defeitivo ampliando os sintomas causado por AYVV e reduzindo a acumulação do vírus “helper”. Recombinantes semelhantes também foram identificados em begomovírus associados ao Cotton leaf curl disease (CLCuD) (Liu *et al.*, 1998; Briddon *et al.*, 2000, 2001).

CLCuD tem sido o maior limitante na produção de algodão no Paquistão a partir da última década (Briddon & Markhan, 2000). A doença está associada a begomovírus monopartido e a recombinantes (Zhou *et al.*, 1998; Idris & Brown, 2002; Briddon, 2003; Mansoor *et al.*, 2003; Kirthi *et al.*, 2004). Assim como observado em AYVV, clones de Cotton leaf curl virus não produziram sintomas típicos de CLCuD, sugerindo a presença de outros fatores (Briddon *et al.*, 2000). Pesquisas voltadas para o estudo de tais fatores resultaram no isolamento de pequenas moléculas de ssDNA circular, denominadas de DNA-1 (Mansoor *et al.*, 1999), que é representante de uma nova classe de componentes associados com monopartidos que têm recebido essa nomenclatura (Briddon *et al.*, 2004). O DNA-1 de CLCuD possui aproximadamente metade do tamanho do vírus “helper” (1370 nucleotídeos) e codifica a Rep. Este pode ter uma replicação autônoma, embora dependa do vírus “helper” para encapsidação e movimento, tanto dentro como entre plantas. Por outro lado, componentes de ssDNA também com aproximadamente metade do tamanho do vírus “helper” têm sido isolados e mostraram-se capazes de induzir os sintomas típicos de amarelecimento de nervura quando reintroduzido juntamente com AYVV em plantas de *ageratum* (Saunders *et al.*, 2000). Tais componentes foram nomeados como DNA- β , pois funcionalmente assemelha-se ao componente B de begomovírus bipartido. A transmissão de ambos os componentes e a propagação da doença em *ageratum* usando o vetor mosca-branca confirmou a etiologia da doença (Briddon *et al.*, 2001).

As moléculas de DNA- β , exceto por uma estrutura em forma de “hairpin” e a seqüência TAAGTATTAC, tem pouca identidade de seqüência entre os componentes virais dos begomovírus (Saunders *et al.*, 2000; Briddon *et al.*, 2001) e são necessárias para induzir sintomas típicos em plantas das quais estas foram isoladas (Gou & Zhou, 2006). Análises de seqüências revelam características conservadas entre estas moléculas: A ORF β C1 codificada no sentido complementar sendo única e altamente conservada (Briddon *et al.*, 2001; Saunders *et al.*, 2004), uma região rica em adenina, e uma região conservada satélite (RCS), com aproximadamente 200 nucleotídeos, contendo um “hairpin” provavelmente envolvido na replicação (Briddon *et al.*, 2001). Evidências sugerem que a ORF β C1 é um determinante de patogenicidade, pois CLCuD apresentando DNA- β mutante onde a ORF β C1 foi excluída foram replicadas pelo vírus “helper” e moveram-se sistemicamente pela planta, mas foram incapazes de induzir sintomas típicos da doença

(Briddon *et al.*, 2003). Já a região rica em adenina, apesar de conservada, não possui função bem definida. Tao *et al.* (2004) demonstraram que quando mutantes de DNA- β com a região rica em adenina foi excluída, tais mutantes foram capazes de replicar, encapsidar e infectar sistemicamente as plantas, indicando que esta região não é primordial para tais funções. No entanto, este mutante causou sintomas atenuados. Assim, é necessário um estudo mais detalhado a fim de obter resultados conclusivos, principalmente em relação à ORF β C1 para identificar os diversos fatores, tanto viral quanto da hospedeira, os quais interagem e entender de forma precisa seu papel no desenvolvimento dos sintomas.

1.4. Ciclo replicativo da família *Geminiviridae*

O primeiro estágio do ciclo infectivo envolve a entrada do ssDNA dentro da célula vegetal através do inseto vetor. Os vírus desta família replicam através de um intermediário fita dupla de DNA (dsDNA) no núcleo da célula infectada. O movimento para o núcleo é dependente da CP e dos mecanismos de transporte do hospedeiro. Este mecanismo não é muito claro, pois não se sabe, ao certo, se o vírus inoculado pelo vetor move-se para o núcleo encapsidado ou se este é desencapsidado e move-se como um complexo nucleoproteico. Aparentemente, a CP está envolvida neste estágio de transporte, provavelmente através de interações com a cadeia de transporte do hospedeiro (Gafni & Epel, 2002). Evidência para essa hipótese de envolvimento da CP com o transporte do ssDNA para o núcleo foi demonstrada por meio de experimentos de microinjeções com ssDNA de MSV que, na ausência da CP, o DNA injetado não entra no núcleo. No entanto, quando injetado com a CP, o DNA foi rapidamente transportado para o interior do núcleo (Liu *et al.*, 1999).

Uma vez dentro do núcleo, o ssDNA é convertido em um dsDNA intermediário que atua como molde tanto para a replicação como para a transcrição do genoma viral. Esta síntese do DNA complementar é realizada inteiramente por proteínas do hospedeiro. Este dsDNA viral é associado com histonas, sendo chamado de minicromossomos (Pilartz & Jeske, 1992). Acredita-se que os genes que codificam as proteínas envolvidas na replicação e na transcrição (Rep, TrAP e REn) são expressos antes daqueles genes no sentido viral (CP e NSP). Após a expressão destes genes no sentido complementar, a multiplicação do

genoma viral ocorre via mecanismo ciclo rolante, onde são geradas novas moléculas de ssDNA a partir de um intermediário de dsDNA. As moléculas de ssDNA produzidas nesse processo podem ter dois destinos dependendo do estágio da infecção. No primeiro estágio, o ssDNA viral pode ser convertido, pela maquinaria do hospedeiro, em dsDNA. Estas moléculas podem entrar no processo de transcrição e/ou replicação, amplificando o genoma viral dentro da célula (Timmermans *et al.*, 1994). A segunda alternativa ocorre em um estágio tardio quando o produto dos genes CP e NSP está presente e pode se ligar ao ssDNA para encapsidá-lo ou para transportá-lo para fora do núcleo. Uma vez no citoplasma, o vírus move-se para as células vizinhas mediado pela proteína MP através dos plasmodesmas e finalmente para o floema, onde é transportado a longa distância. Em geminivírus bipartido, as proteínas associadas com o movimento viral são codificadas pelo DNA-B. No caso do *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV), o movimento do ssDNA e dsDNA para fora do núcleo é mediado pela proteína NSP, enquanto o transporte intercelular do dsDNA é mediado pela proteína MP (Noueiry *et al.*, 1994; Pascal *et al.*, 1994; Sandefoot & Lazarowitz, 1995; Sanderfoot *et al.*, 1996; Sandefoot & Lazarowitz, 1996). Os geminivírus monopartidos, como TYLCV, não codificam homólogos para NSP e MP e conseqüentemente, outra(s) proteína(s) virais (CP e Pré-CP) realizam estas funções (Kunik *et al.*, 1998).

O último estágio do ciclo corresponde à aquisição do vírus pelo vetor. Neste caso, experimentos sugerem que a CP e, provavelmente, a partícula viral são indispensáveis para a transmissão pelo inseto vetor.

1.5. Variabilidade genética dos begomovírus

Novas espécies de geminivírus ou espécies já conhecidas têm causando sérios problemas econômicos em vários sistemas agrícolas em todo o mundo. Alguns fatores, incluindo evolução de novas variantes de vírus, aparecimento de vetores mais eficientes, clima favorável, mudanças no sistema de produção, movimento de material infectado e introdução de variedades susceptíveis, têm individualmente, ou em combinação, contribuído para o aparecimento das geminiviroses como um problema em todo o mundo (Varma & Malathi, 2003).

A variabilidade gênica em geminivírus ocorre por meio de mutação, recombinação e pseudo-recombinação. Mutações são frequentemente relacionadas aos vírus que possuem genoma constituído de RNA, uma vez que a RNA polimerase não possui a capacidade de corrigir erros de leitura durante a replicação (“proof-reading”). Em contraste, essas mutações mostram-se baixas em vírus de DNA devido à atividade “proof-reading” da DNA polimerase (Roossinck, 1997). No entanto, Isnard *et al.* (1998) demonstraram que as mutações em MSV estão distribuídas ao longo do genoma e tem uma taxa de 10^{-4} a 10^{-5} . A recombinação é considerada o principal mecanismo de variabilidade gênica nos geminivírus e, conseqüentemente, maior capacidade de evolução e adaptação a novos hospedeiros (Zhou *et al.*, 1997; Padidam *et al.*, 1999). A recombinação de DNA em geminivírus pode ocorrer não somente entre variantes de um mesmo vírus, mas também entre vírus da mesma espécie e de mesmo gênero, resultando no rápido surgimento de novas formas. A função primária da recombinação pode ser a de reparar ssDNA defectivos que são originados através de mutações, resultando em recombinantes que podem, subsequentemente, sozinho vir a ser prevalente em populações onde a recombinação resultou em vantagem adaptativa (Seal *et al.*, 2006). Estudos de recombinação têm mostrado que, sob condições de campo, a recombinação em begomovírus ocorre entre moléculas de DNA-A de diferentes vírus caracterizados (Zhou *et al.*, 1997; Sanz *et al.*, 2000). Na África, o *East African cassava mosaic virus* (EACMV-UG) é um recombinante natural, onde o gene CP de ACMV aparece inserido no DNA-A de EACMV (Zhou *et al.*, 1997). No sul da Espanha, *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) e *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) são duas espécies distintas de geminivírus que coexistem nos campos e contribuem para o “Tomato yellow leaf curl disease” (TYLCD). Monci *et al.* (2002) demonstraram a existência nesta região de um recombinante natural entre TYLCSV e TYLCV, onde a análise do genoma demonstrou que o sítio de recombinação está localizado na região intergênica e que esse recombinante apresenta características vantajosas sobre o genótipo parental, uma vez que esse recombinante prevalece na região onde foi detectado.

Experimentos envolvendo análises filogenéticas demonstram que entre isolados de TYLCV e *Tomato leaf curl virus* (ToLCV) há evidência de recombinação natural. Os resultados sugerem que os isolados de TYLCV de Israel e Irã são híbridos entre ancestrais

semelhantes a TYLCV e ToLCV, e o fragmento recombinante encontra-se situado entre a metade da ORF C1 e metade da região intergênica. Naturalmente, TYLCV e ToLCV apresentam hospedeiros comuns, como o tomateiro, portanto, infecções mistas podem ocorrer e estes podem replicar simultaneamente na mesma célula, o que caracteriza um pré-requisito para a recombinação (Navas-Castillo *et al.*, 2000).

Três fatores podem contribuir significativamente para o aumento da frequência de ocorrência de recombinação. Primeiro, infecções mistas, um pré-requisito para recombinação, são comuns em geminivírus (Padidam *et al.* 1995a; Umaharan *et al.*, 1998). Segundo, estes vírus replicam via forma replicativa fita dupla produzindo um grande número de cópias (Kanevsk *et al.*, 1992; Accoto *et al.*, 1993). Terceiro, o biótipo B de *B. tabaci* que apresenta um amplo círculo de hospedeiros e um alto grau de adaptação e dispersão (Bedfort *et al.*, 1994). Como resultado desses fatores, têm-se recombinações virais e surgimento de novas hospedeiras sendo infectadas.

A existência de dois componentes genômicos na maioria dos begomovírus possibilita um mecanismo alternativo para obtenção de variabilidade gênica. Este mecanismo é a troca de componentes genômicos entre vírus distintos que é denominado de pseudo-recombinação (“reassortment”). A habilidade dos begomovírus em trocarem componentes foi primeiro demonstrado experimentalmente em 1980 (Stanley *et al.*, 1985). Estudos recentes têm sido feitos a fim de elucidar os fatores que controlam o potencial de formação de pseudo-recombinantes entre dois vírus. Ramos *et al.* (2003) mostraram que *Tomato mottle Taino virus* (ToMoTV) pseudo-recombina com *Potato yellow mosaic virus* (PYMV), mas não com *Tomato mottle virus* (ToMoV), apesar deste último possuir alta similaridade com a Rep e com a REn. Neste caso, a identidade dos iterons foi um fator crítico para possibilitar a pseudo-recombinação, com os dez primeiros aminoácidos da Rep controlando alguns fatores chaves da especificidade da replicação viral.

Hou & Gilbertson (1996) por meio da formação de pseudo-recombinantes com o DNA-A do ToMoV e o DNA-B de *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV) demonstraram que, embora infecciosos, estes apresentavam acúmulo reduzido de DNA-B e sintomas atenuados em *N. benthamiana*. Entretanto, após três passagens mecânicas nesse hospedeiro, os sintomas tornaram-se idênticos aos produzidos pelo ToMoV e o nível do DNA-B tornou-se igual ao do DNA-A. A análise das regiões comuns de ambos os componentes do pseudo-

recombinante comprovou a ocorrência de recombinação intermolecular na RC do DNA-B do BDMV, tornando-a idêntica à RC do ToMoV e permitindo que o DNA-B fosse eficientemente reconhecido pela proteína Rep do ToMoV. Este resultado evidencia a importância da pseudo-recombinação e da recombinação na evolução dos begomovírus e em sua adaptação a novos hospedeiros.

Alguns monopartidos também são capazes de adquirir permanentemente o DNA-B sob algumas condições de campo mudando para um vírus bipartido. Estes vírus têm sido denominados como mono-bipartidos (Sauders *et al.*, 2002; Chakraborty *et al.*, 2003).

No Brasil, Galvão *et al.* (2003) demonstraram que uma variante do *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), nomeado como ToCMV-[MG-Bt] é derivado de um evento de recombinação entre espécies. Assim, esse vírus possui um genoma híbrido, onde a AC1 e a origem de replicação provavelmente é originado do ToCMV-[BA-Se1] e o restante da sequência parece ter origem do *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV). Embora tenha sido reportado que o DNA-A de ToCMV-[MG-Bt] não infecta tomateiro (Galvão *et al.*, 2003), resultados posteriores demonstram claramente que o DNA-A viral move-se sistemicamente através da planta de tomate, induz sintomas e acumula DNA viral na ausência do DNA-B. Isto sugere que esse recombinante natural seja mais patogênico e possua uma maior vantagem seletiva quando comparado aos genótipos parentais (Fontenelle *et al.*, 2007).

Andrade *et al.* (2006) descreveram um novo begomovírus nomeado como Tomato yellow spot virus (ToYSV) originalmente isolado de tomate, mas filogeneticamente mais próximo dos vírus de *Sida* sp. Apesar disso, o ToYSV foi capaz de formar pseudo-recombinantes com vírus de tomate. Pseudo-recombinantes infectivos formados entre o DNA-A de ToYSV e o DNA-B de Tomato crinkle leaf yellows virus (TCrLYV) induziram sintomas severos em *N. benthamiana*. Esse potencial para formar pseudo-recombinante foi, em parte, atribuído ao fato de que a origem de replicação de ambos os componentes possui a sequência do sítio de ligação da Rep idêntica. Contudo, esse não foi o caso para um outro pseudo-recombinante viável formado entre o DNA-A de *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) e o DNA-B de ToYSV, no qual possuem a sequência do sítio de ligação da Rep diferente. Estes resultados reforçam a idéia que a formação de pseudo-recombinantes viáveis não se baseia apenas nas relações filogenéticas e nas sequências conservadas dos iterons.

Outro mecanismo que demonstra a flexibilidade genética dos begomovírus é o sinergismo. A combinação do DNA-A e DNA-B de *Pepper hausteco yellow vein virus* (PHYVV) com o DNA-A de *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) resulta em uma interação de sinergismo, onde há o aumento do acúmulo de DNA viral e severidade de sintomas quando comparado com PHYVV sozinho. A especificidade desse sinergismo foi demonstrada pela ausência de uma resposta similar para PHYVV quando combinado com outro vírus bipartido (Sharp *et al.*, 1999).

1.6. Transmissão de begomovírus por insetos

Os begomovírus, transmitidos por mosca-branca, constituem sérios patógenos de culturas agrônômicas e hortícolas em regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo. Estes vírus não são transmitidos por sementes ou por contato entre plantas infectadas e sadias. Sua dispersão ou introdução no campo dá-se pela ação da mosca-branca a partir de fontes de vírus de áreas próximas, podendo ser de cultivos antigos como também de fontes alternativas no campo (Costa, 1976). A introdução do biótipo B de *Bemisia tabaci* ocorreu entre 1986 e 1991 tornando-se praga importante em diversos países (Costa *et al.*, 1993; Lourenção & Nagai, 1994). No Brasil, o biótipo A de *B. tabaci* era predominante até 1990/91, quando foi relatada a introdução do biótipo B, provavelmente via plantas ornamentais importadas dos EUA (França *et al.*, 1996). Este biótipo quando comparado ao biótipo A, apresenta um círculo de hospedeiros muito mais amplo, incluindo o tomateiro e outras solanáceas, e um grau de adaptação e dispersão muito maior (Bedford *et al.*, 1994).

A transmissão de begomovírus por mosca-branca (*Bemisia* spp.) é do tipo circulativa (Brown, 1997; Rubinstain & Czosnek, 1997; Ghanim *et al.*, 1998; Morin *et al.*, 1999), onde as partículas virais presentes na seiva do floema de plantas infectadas são ingeridas através do estilete e transportadas pelo esôfago e câmara de filtração do inseto. Essas partículas são subsequentemente transportadas através da parede do intestino juntamente com a hemolinfa alcançando as glândulas salivares. O vírus é, então, translocado dentro do ducto salivar e finalmente eliminado juntamente com a saliva durante a alimentação (Ghanim *et al.*, 2001).

Liu *et al.* (1997) demonstraram que a capa protéica é essencial para o processo de aquisição viral, pois não houve transmissão em vírus não encapsidado. A aquisição do vírus não se constitui em um processo passivo, e o caminho percorrido pelo vírion através do sistema digestivo da mosca-branca é um componente crítico para o sucesso da transmissão viral (Zeidan & Czosnek, 1991).

A relação entre os begomovírus e a mosca-branca, incluindo diversas características de transmissão do vírus pelo vetor, tais como período de acesso de aquisição (PAA), período de acesso de inoculação (PAI), período de latência (PL), período de retenção, passagem transovariana, entre outros, foram estudadas em alguns países, envolvendo begomovírus de cucurbitáceas, como *Squash leaf curl virus* (SLCV), onde a transmissão foi determinada por PCR a partir de extratos de *B. tabaci*, saliva e hemolinfa. SLCV foi detectado em extratos do inseto após 30 minutos de PAA em abóbora infectada, após 2 horas detectado na hemolinfa e na saliva após 8 horas (Rosell *et al.*, 1999). Em tomate, principalmente o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), cujo DNA viral, por meio de técnicas de PCR, foi detectado na cabeça da mosca-branca 5 minutos após o PAA em plantas de tomate infectado, no tórax após 10 minutos e no abdômen após 25 minutos (Atzmon *et al.*, 1998). Outros vírus também foram alvos de estudos, como o *Cotton leaf curl virus* (CLCuV) em algodão (*Gossypium hirsutum*) (Nateshan *et al.*, 1996). Os resultados obtidos nesses estudos mencionados foram variáveis e relacionados a estipe viral envolvida, à região geográfica e às condições de cada pesquisa. Nenhuma dessas espécies é relatada no Brasil.

No Brasil, mais recentemente, Santos *et al.* (2003) estudaram a interação de um begomovírus isolado de tomateiro, taxonomicamente relacionado ao *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), com o vetor *Bemisia tabaci* biótipo B e analisaram os parâmetros PAA, PAI, PL, sua retenção e sua transmissão à progênie. Constatou-se um PAA mínimo de 15 minutos com o qual 6% dos tomateiros foram infectados. Este percentual aumentou para 65% quando o PAA foi estendido para 24 horas. O PAI mínimo foi de 30 minutos registrando-se 18% de infecção, o qual foi elevado para 67% com 24 horas de PAI. Observou-se o término do PL de 16 horas após o vetor adquirir o vírus. Na detecção do vírus via PCR o mesmo foi observado em ninfas desenvolvidas em tomateiro infectado, em adultos com diferentes PAAs, mas não em ovos de fêmeas avirulíferas ovopositados em

plantas infectadas. Evidenciou-se a transmissão à progênie pela detecção do vírus em ovos, ninfas e adultos provenientes de fêmeas virulíferas, contudo, a transmissão do vírus pelos adultos não foi observada. Estes resultados indicam que a interação vírus-vetor é estabelecida desde a fase inicial do desenvolvimento do inseto e podem ser considerados relevantes para estudos epidemiológicos, além de reforçarem a importância da *B. tabaci* biótipo B na rápida disseminação do vírus no campo.

1.7. Begomovírus em tomateiro no Brasil

O primeiro relato de begomovírus no Brasil foi feito por Flores *et al.* (1960). Posteriormente, o vírus relatado foi purificado e o agente etiológico foi caracterizado e denominado *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), também transmitido por *Bemisia tabaci* (Matyis *et al.*, 1975) e que era transmitido mecanicamente (Costa *et al.*, 1975). Curiosamente, após esse relato inicial, a incidência de TGMV em tomateiro no Brasil não acompanhou o aumento populacional de *B. tabaci*, ao contrário do que foi observado para o BGMV em feijoeiro, provavelmente porque o biótipo A de *B. tabaci*, o único que ocorria no Brasil até o início da década de 1990, colonizava o tomateiro com baixa eficiência (Bedford *et al.*, 1994). Até a década de 1990, foram escassos os relatos de possíveis begomovírus em tomateiro, sendo que, durante esta época, a única espécie de begomovírus de tomateiro no Brasil caracterizada e a sequência de nucleotídeos do genoma completo determinada e publicada foi a de TGMV em 1984 (Hamilton *et al.*, 1984).

A partir de 1992, observou-se no estado de São Paulo a presença de um novo biótipo (biótipo B) da mosca-branca, possivelmente introduzida da Europa ou EUA pela importação de plantas ornamentais (Melo, 1992). Em alguns países da América Latina e América do Norte, ao longo da década de 1980, perdas substanciais foram relatadas em tomateiros como resultado de infecção por begomovírus. A incidência, em alguns desses países, foi tão severa que chegou ao ponto de inviabilizar o cultivo comercial em algumas regiões como, por exemplo, da República Dominicana com a entrada do TYLCV considerado a maior tragédia provocada por begomovírus em países do Caribe (Polston *et al.*, 1996). Nessas regiões predominava o biótipo B de *B. tabaci* e que a partir de 1992

também foi relatado no Brasil (Melo, 1992). A distinção entre os dois biótipos é feita com base em características morfológicas, padrões de aloenzimas e RFLP (Perring *et al.*, 1993).

Devido as suas características de polifagia, alta taxa de multiplicação e excelente adaptação às condições climáticas brasileiras, o biótipo B de *B. tabaci* disseminou-se rapidamente pelas regiões quentes e secas do Brasil, incluindo as principais regiões produtoras de tomate, durante o início da década de 1990 (Lourenção e Nagai, 1994). Simultaneamente, relatos de sintomas típicos de infecção por begomovírus em tomateiro ocorreram no Distrito Federal, onde até 80% dos plantios comerciais de tomate apresentavam sintomas, que incluíam clorose, nanismo, encrespamento foliar, pouca floração e frutos com áreas descoloridas (Ribeiro *et al.*, 1994), no Triângulo Mineiro (Resende *et al.*, 1996; Zerbini *et al.*, 1996), no Rio de Janeiro (Galvão *et al.*, 1998), na região Nordeste, incluindo o estado da Bahia (Ribeiro *et al.*, 1996) e região do Sub-Médio do São Francisco (Bahia e Pernambuco), até então a principal região produtora de tomate para processamento industrial no Brasil (Bezerra *et al.*, 1997), além do relato em São Paulo feito por Faria *et al.* (1997), que descreveram o Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV), isolado coletado em São Paulo, mas considerado o mesmo vírus causador da doença do mosaico deformante da batata (Daniels & Castro, 1985).

Na região do Triângulo Mineiro, a ocorrência de tomateiros com sintomas típicos de begomovírus tem sido observada desde 1995, onde amostras de tomateiro foram coletadas e identificadas (Resende *et al.*, 1996; Zerbini *et al.*, 1996). A análise da seqüência completa de nucleotídeos dos componentes A e B foi determinada e a comparação com outros begomovírus indicou tratar-se de uma nova espécie, denominada *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) (Fernandes *et al.*, 2000; Ribeiro *et al.*, 2003). Na Zona Metalúrgica de Minas Gerais, outra espécie de begomovírus foi detectada em amostras de tomateiro (Zerbini *et al.*, 1996) e caracterizada molecular e biologicamente por Ambrozevicius *et al.* (1999). Posteriormente, a comparação da seqüência de nucleotídeos completa dos componentes A e B com outros begomovírus demonstrou ser uma nova espécie, denominada *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) (Andrade *et al.* 2002; Ribeiro *et al.*, 2003).

Ribeiro *et al.* (2003) realizaram um trabalho de distribuição e diversidade genética de begomovírus no Brasil através da caracterização molecular parcial do genoma de

diversos isolados coletados entre 1994 e 1999. Estes isolados foram coletados em lavouras tanto para processamento industrial como para consumo *in natura* nos estados do Nordeste e Sudeste. Os resultados revelaram uma grande diversidade genética com a existência de possíveis sete novas espécies no Brasil. Na região Sudeste, Ambrozevicius *et al.* (2002) detectaram três espécies distintas em amostras de tomateiro coletadas nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo. A explicação mais provável para o surgimento repentino dessas novas espécies de begomovírus em tomateiro no Brasil está relacionada à presença do novo biótipo de mosca-branca, que coloniza plantas silvestres e daninhas, transmitindo vírus nativos dessas plantas para o tomateiro e adaptando-se rapidamente ao novo hospedeiro através de recombinações ou pseudo-recombinações (Ribeiro *et al.*, 2003).

Mais recentemente, Fernandes *et al.* (2008) mostram que em um estudo de determinação da sequência genômica parcial realizado com 295 isolados de begomovírus coletados em diferentes regiões do Brasil houve uma predominância de três espécies, *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato golden vein virus* (TGVV) e *Tomato mottle leaf curl virus* (TMoLCV). Curiosamente, estes resultados indicam que nenhuma das sete espécies e/ou espécies propostas identificadas no trabalho de Ribeiro *et al.* (2003) têm mostrado predominância atualmente, indicando que o processo seletivo é favorável à sobrevivência dos begomovírus mais bem adaptados incluindo as três espécies predominantes identificadas no trabalho.

Atualmente, os bancos de dados públicos listam 13 espécies de begomovírus isolados de tomateiro no Brasil: TGMV, ToYVSV, ToRMV, ToSRV, ToCMoV, TMoLCV, TGVV, ToYSV, *Tomato chlorotic vein virus*, *Tomato severe mosaic virus*, *Tomato infections yellow virus*, *Tomato crinkle leaf yellow virus* e *Tomato mild leaf curl virus*. As espécies TGMV, ToCMoV, ToRMV e ToSRV são aceitas como espécies definitivas e as demais esperam por uma definição taxonômica.

1.8. Begomovírus em batateira no Brasil

Daniels & Castro (1985) relataram pela primeira vez no estado do Rio Grande do Sul a incidência de begomovírus em plantas de batata, cujos sintomas observados consistiam de mosaico e deformação foliar, sendo a doença denominada de “mosaico

deformante da batata”. Este isolado até então, mantido em condições de casa de vegetação por propagação vegetativa, teve seu genoma parcialmente clonado e sua sequência de nucleotídeos determinada indicando ser um provável isolado de Tomato yellow vein streak virus (Ribeiro *et al.*, 2006). Souza-Dias *et al.* (2003) registraram a ocorrência de surtos epidêmicos de begomovírus em batateira no estado de São Paulo, no entanto, atualmente com pouca incidência. Em tomateiro, infecções por begomovírus iniciaram-se na forma de picos de ocorrência alternada por safras, até que a partir de 2001 a incidência passou a ser alta sem queda até o momento (A. K. Inoue-Nagata, informação pessoal). Sendo a batata uma cultura de propagação essencialmente vegetativa, a qualidade da batata-semente é de grande importância e as possíveis infecções de plantas de batata por begomovírus precisam ser monitoradas com frequência.

OBJETIVO

O objetivo dessa dissertação foi desenvolver um novo método de clonagem do genoma completo de begomovírus e caracterizar molecular e biologicamente um isolado de begomovírus proveniente de batata provavelmente pertencente à espécie Tomato yellow vein streak virus.

Objetivos específicos do Capítulo 2:

- Amplificar o DNA viral usando a DNA polimerase do bacteriófago ϕ 29.
- Determinar através de digestões enzimáticas e hibridização por Southern blotting a enzima que digere o genoma em apenas um ponto.
- Confirmar a identidade dos clones por seqüenciamento

Objetivos específicos do Capítulo 3:

- Clonar e sequenciar o genoma completo do isolado Ba3 de begomovírus.
- Comparar a seqüência do DNA-A e DNA-B do isolado Ba3 com a seqüência de outros begomovírus.
- Realizar análise filogenética com a seqüência completa de nucleotídeos do DNA-A.
- Comparar a seqüência da região comum (RC) com outros isolados de begomovírus brasileiros.
- Produzir clones infecciosos do isolado Ba3.
- Determinar o círculo de hospedeiros através da inoculação por bombardeamento de partículas.
- Realizar estudos de pseudo-recombinação com clones de outros isolados virais.

CAPÍTULO 2

MÉTODO SIMPLES PARA CLONAGEM DO GENOMA COMPLETO DE BEGOMOVÍRUS USANDO A DNA POLIMERASE DO BACTERIÓFAGO ϕ 29

2.1. Introdução

Begomovírus (família *Geminiviridae*, gênero *Begomovirus*) são vírus que possuem DNA fita simples (ssDNA) podendo ser monopartido ou bipartido e são transmitidos por biótipos de *Bemisia tabaci* (Brown, 1994). Seu ciclo de hospedeiras inclui uma grande variedade de plantas dicotiledôneas em várias regiões do mundo. A replicação do genoma viral ocorre dentro do núcleo da célula infectada através de dois processos básicos: conversão do ssDNA em um intermediário de dsDNA, denominado forma replicativa (FR) e o mecanismo ciclo rolante (Palmer & Rybicki, 1998; Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999; Gutierrez, 1999).

Os begomovírus têm limitado a produção de culturas de grande importância econômica em diversas partes do mundo. Eventos de recombinação como resultado da alta diversidade genética dentro e entre populações virais têm facilitado o surgimento de novas variantes genéticas responsáveis por, em alguns casos, inviabilizar o cultivo de algumas das mais importantes culturas agrícolas.

A biologia molecular é uma ferramenta importante no entendimento da evolução desses vírus e técnicas, como a clonagem molecular, são essenciais para a caracterização molecular e no estudo filogenético e de distribuição geográfica. Estas são informações importantes no entendimento da diversidade genética e dinâmica populacional, cruciais no direcionamento dos programas de melhoramento genético de plantas. Comumente, são utilizados dois métodos para clonagem desses vírus. O primeiro método é através da forma replicativa do DNA, que é isolado do tecido vegetal infectado, seguido de digestão com enzima de restrição e hibridização (“Southern Blot”), e posteriormente clonado em um vetor plasmidial utilizando uma enzima que digere o genoma viral em apenas um ponto (Gilbertson *et al.*, 1991; Srivastava *et al.*, 1995). Este método geralmente tem baixa eficiência devido à baixa concentração do genoma viral no tecido infectado. O segundo é

baseado na reação da polimerase em cadeia (PCR) usando primers universais ou específicos, através da amplificação parcial ou completa do genoma (Patel *et al.*, 1993). Embora muito sensível, a PCR pode introduzir erros durante polimerização pela falta da atividade de correção (“proof-reading”).

Para suprir algumas das limitações que estes métodos tradicionais apresentam, foi desenvolvido neste trabalho um método de clonagem com a utilização de um novo sistema de amplificação de DNA circular usando a DNA polimerase do bacteriófago $\phi 29$ (TempliPhi - Amersham Biosciences, atualmente GE). Esta enzima amplifica isotermicamente o DNA circular via ciclo rolante de modo exponencial gerando moléculas de dsDNA de alto peso molecular.

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Origem do isolado e extração do DNA viral

Plantas de tomate mostrando sintomas típicos de infecção por begomovírus foram encontradas no Distrito federal (Inoue-Nagata *et al.*, 2001). Amostras foliares foram submetidas à extração de DNA total de acordo com o método CTAB (Doyle & Doyle, 1987). Discos foliares (ca. 40mg) foram colocados em microtubos (1,5mL), e triturados juntamente com 600µL do tampão de extração CTAB (2% CTAB, 100mM de Tris-HCl, pH 8,0, 50mM NaCl e 0,2% de 2-β-mercaptoetanol) e incubados a 65°C durante 5 minutos. Foram adicionados aos tubos 600µL de clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico) e agitados (vortex) vigorosamente durante aproximadamente 1 minuto. Em seguida, os tubos foram submetidos à centrifugação a 13000g durante 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para novos tubos contendo 420µL de isopropanol . Os tubos foram invertidos manualmente e a seguir foram centrifugados a 13000g durante 10 minutos. O precipitado obtido foi lavado com etanol 70% e após seco à temperatura ambiente, 300µL de água foram adicionados para ressuspender o DNA total. Os tubos contendo o DNA extraído foram armazenados em freezer (-20°C).

2.2.3. Amplificação do DNA viral via ciclo rolante

A amplificação do DNA circular foi realizada utilizando o TempliPhi Amplification Kit de acordo com as instruções do fabricante (Amersham Biosciences). Foram misturados 5µL do tampão de desnaturação com 5µL do tampão de reação e em seguida adicionados 0,5µL do DNA total extraído. Após isso, 0,5µL da solução contendo a enzima foram adicionados e incubados a 30°C por aproximadamente 20 horas. A etapa de desnaturação do DNA por 3 minutos a 94°C antes da adição do tampão de reação recomendada pelo fabricante não é essencial no caso dos geminivírus.

2.2.4. Digestão com enzimas de restrição e hibridização por Southern blotting

O DNA viral amplificado (1µL) foi digerido com as enzimas de restrição EcoRV, SpeI, BamHI, EcoRI e XhoI em uma reação total de 10µL. A reação de digestão foi mantida por 20 horas a 37°C em banho-maria. Os produtos da digestão foram analisados por meio de eletroforese em géis de agarose (0,6%).

A hibridização foi realizada através de sonda não-radioativa (digoxigenina) gerada a partir da PCR. A reação consistiu de 11,5µL do tampão 10X da enzima Taq polimerase (Tris-HCl 100mM, pH 8,3 e KCl 500mM, Invitrogen), 9,2µL de MgCl₂ (50mM, Invitrogen), 4,6µL de dNTPs (2,5mM, Pharmacia), 1,15µL de cada primer, 1,15µL da enzima Taq Polimerase (Pharmacia), 83,95µL de água estéril e 2,3µL de DNA. Para cada 50µL de reação foram adicionados 0,25µL de DIG-dUTP (1nmol/µL, Roche).

Os primers usados na PCR para obtenção da sonda específica para o DNA-A foram CP1v (5'CCCGTCGACATGYCTAAGMGKGAKGGCCCC3') e CP2 (5'CCCCTGCCAGAACTTCCAAGTCTGGACG 3') e para o DNA-B foram CRC2c (CTAGCTGCAGCATATTTACRARWATGCC3') e B1200v (5'CCCCTGCAGTAYTAYTYTGGATGTC 3') (Santana *et al.*, 2007; Rojas *et al.*, 1993). O DNA utilizado no PCR para obter a sonda foi proveniente de pCP (Santana *et al.*, 2007) e um clone contendo o fragmento correspondente aos primers CRC2 e B1200F ligado em pGEM-T (Promega), para o DNA-A e DNA-B, respectivamente.

Para realizar a hibridização os géis foram tratados por 1 hora sob agitação em tampão de desnaturação (0,5N NaOH e 1,5M NaCl) e igual período em tampão de neutralização (1M Tris-HCl, pH 7,5 e 1,5M NaCl). Em seguida, o DNA foi transferido do gel para membrana por capilaridade usando SSC 20X por 20 horas.

A hibridização consistiu de 1 hora de pré-hibridização com 25mL de tampão de pré-hibridização (5X SSC, 0,1% N-lauroylsarcosine, 0,02% SDS e 1% agente bloqueador, Roche) em tubos de hibridização a 68°C em estufa de hibridização. Após este período, 15mL do tampão foi retirado dos tubos e nos 10mL restantes foram adicionados 50µL da sonda (para o DNA-A ou DNA-B, separadamente) previamente desnaturada (95°C, 5 minutos) para hibridização e os tubos foram mantidos sob movimentação a 68°C por 20 horas. Em seguida, as membranas foram lavadas duas vezes por 5 minutos com tampão

SSC 2X, 0,1% SDS, a temperatura ambiente, e depois duas vezes por 15 minutos em tampão SSC 0,5X, 0,1% SDS, a temperatura de 68°C sob agitação. Logo após, foi adicionado aos tubos 25 mL do tampão de bloqueamento (PBS 1X , 1% agente bloqueador, Roche) e mantidos a temperatura ambiente sob agitação constante por 1 hora. Após o descarte do tampão de bloqueamento, 1µL do anticorpo Anti-Digoxigenin-AP (150µU/µL, Roche) foi adicionado a 10mL do tampão de bloqueamento e mantidos sob agitação por 1 hora. Após esse período, três lavagens com PBS, 1X acrescido de 0,5% Tween-20, foram realizadas e a revelação das membranas foi feita por colorimetria usando 10mL de tampão de revelação (100mM NaCl, 100mM Tris, 5mM MgCl₂(6H₂O), pH 9,5) contendo 30µL de BCIP (50mg/µL em 100% dimetilformamida) e 60µL de NBT (50mg/µL em 70% dimetilformamida) mantidas sob agitação na ausência de luz.

2.2.5 Clonagem do componente viral

Após a digestão, o DNA foi precipitado e 300ng foram usados para reação de ligação com 50ng de pBluescript SK+ (Stratagene), o qual foi previamente digerido e desfosforilado utilizando-se a enzima fosfatase alcalina de acordo com o protocolo padrão (Sambrook *et al.*, 1989). Para a transformação foram utilizadas células competentes de *Escherichia coli* XL-1 blue preparada para choque térmico e plaqueadas em meio LB contendo ampicilina (100mg/mL). Após aproximadamente 20 horas de incubação a 37°C, as colônias recombinantes (brancas) foram identificadas e transferidas para tubos de ensaio contendo LB líquido com ampicilina (100mg/mL) e incubadas a 37°C, sob agitação a 200rpm, por aproximadamente 20 horas. A purificação plasmidial dessas culturas foi realizada (Sambrook *et al.*, 1989) e a clonagem foi confirmada através da digestão enzimática com a mesma enzima utilizada para a clonagem, a fim de verificar se o inserto possuía o tamanho do fragmento de DNA esperado.

2.2.6 Confirmação da identidade dos clones

Os clones selecionados foram purificados por coluna (GFX Micro plasmid prep kit, Amersham-Pharmacia) e o inserto foi seqüenciado em um seqüenciador automático (ABI

3100) usando os primers M13 reverso e forward. As seqüências obtidas foram analisadas pelo algoritmo Blast disponível online (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

2.3. Resultados

Após a amplificação do DNA viral através do método TempliPhi, 1 μ L da reação foi aplicada em gel de agarose (0,6%) usado na eletroforese. O DNA amplificado formou uma única banda de alto peso molecular (linha 1, Figura 1). A digestão enzimática foi feita para selecionar a enzima que digere em um único ponto no genoma do begomovírus gerando moléculas de tamanho único e esperado (ca. 2,6kb). A análise do gel demonstrou que algumas enzimas geraram fragmentos de tamanho esperado (EcoRV e SpeI, Figura 1, linha 2 e 3, respectivamente) e outras produziram fragmentos menores (BamHI e XhoI, Figura 1, linha 4 e 6) ou aparentemente, não digeriram o genoma viral amplificado (EcoRI, Figura 1, linha 5).

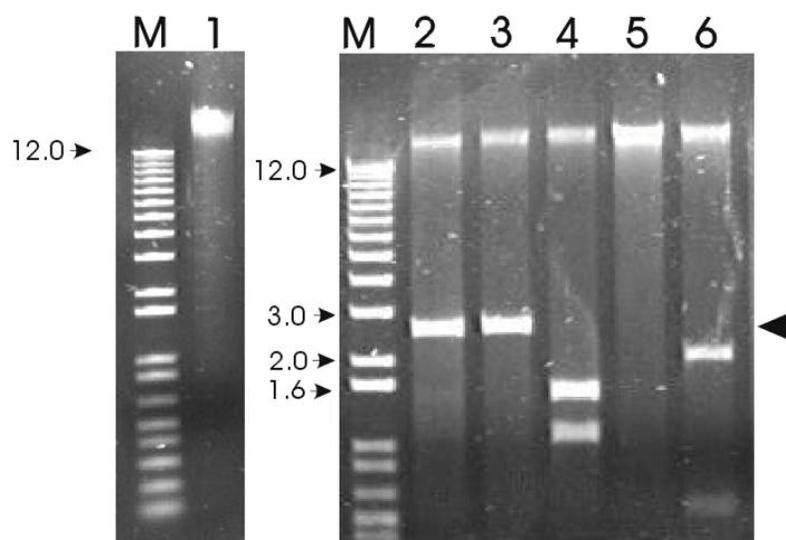


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose (0,6%) do DNA amplificado via ciclo rolante (RCA) digerido com enzimas de restrição. 1 kb ladder (Invitrogen) foi usado como marcador (M). DNA não digerido (1). A digestão foi feita com as seguintes enzimas: EcoRV (2), SpeI (3), BamHI (4), EcoRI (5) e XhoI (6). A seta indica o tamanho do DNA esperado para begomovírus apresentando um sítio único de restrição.

A hibridização não-radioativa (digoxigenina) com sonda específica para o DNA-A (Figura 2B) mostrou que apenas XhoI digere o DNA-A. A hibridização com sonda específica para o DNA-B (Figura 2A) revelou que EcoRV, SpeI e BamHI digerem

completamente o DNA-B, sendo que BamHI digere completamente em dois sítios, enquanto que EcoRV e SpeI muito possivelmente corta em um único sítio.

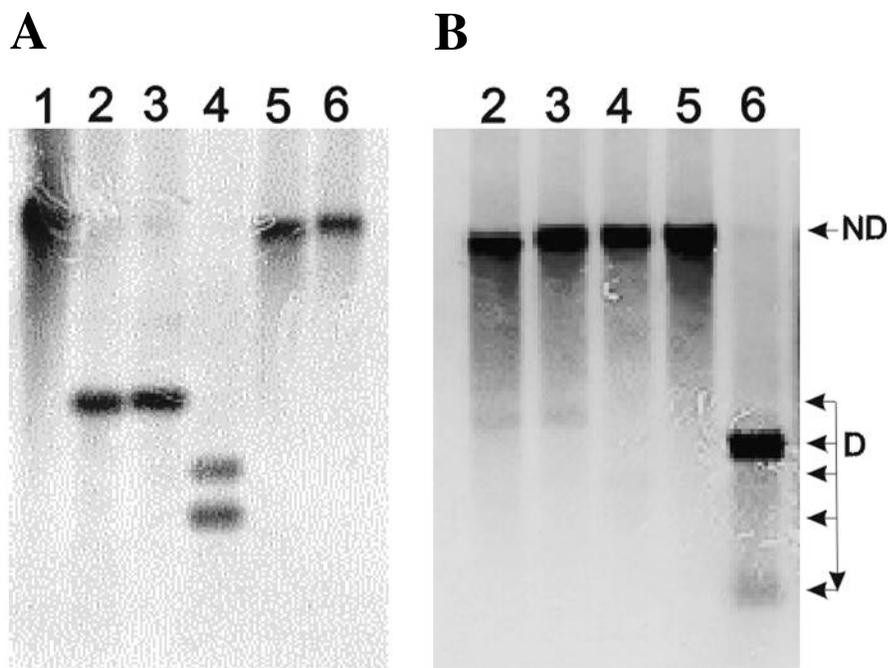


Figura 2. Hibridização com DNA-B (A) e DNA-A (B) provenientes do DNA amplificado via ciclo rolante (RCA) utilizando sondas específicas. DNA não-digerido (1), EcoRV (2), SpeI (3), BamHI (4), EcoRI (5) e XhoI (6). As setas indicam ND (não digerido) e D (DNA digerido).

A enzima SpeI foi selecionada para clonar o DNA-B completo. Para a digestão com SpeI, 10 μ L do DNA amplificado (ca. 3 μ g) foram utilizados. Em seguida, foi feita uma ligação com pBluescript SK+, previamente digerido com SpeI e desfosforilado, e introduzida em *E. coli*. Um total de 23 colônias foram selecionadas e preparadas para a extração plasmidial e digestão com SpeI. Das 23 colônias, 15 apresentaram padrões de bandas esperadas com fragmentos de 3kb e 2,6kb correspondentes ao vetor e ao inserto, respectivamente (Figura 3).

Dos 15 clones que mostraram padrões de bandas esperadas, 2 clones foram selecionados (Clone 1 e 13, Figura 3A e B, respectivamente), purificados e seqüenciados usando primers do vetor (M13 reverso e forward). As seqüências obtidas foram analisadas

pelo algoritmo Blast, o qual demonstrou que o inserto possui uma identidade genética mais próxima do DNA-B de *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV).

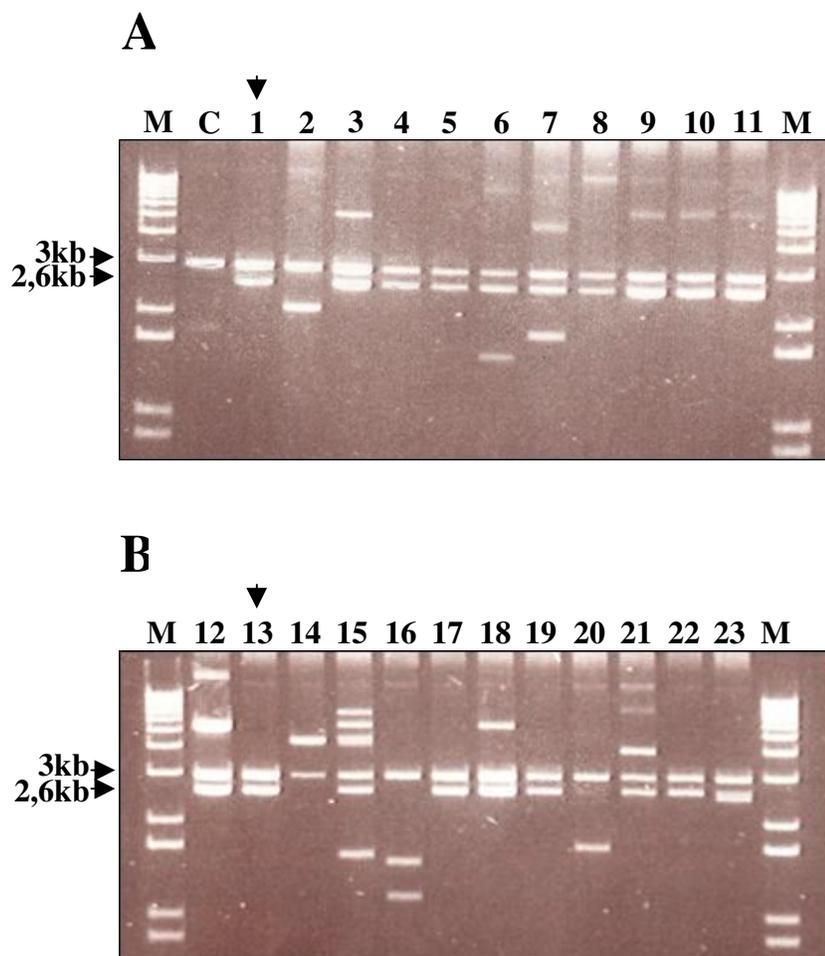


Figura 3. Extração plasmidial dos 23 clones digerido com SpeI. (C) extração de uma colônia azul servindo como controle. Clones indicados com setas (1 e 13) foram os selecionados para purificação e seqüenciamento. As setas laterais indicam o tamanho do DNA esperado para o vetor (3kb) e o vírus (2,6kb).

2.4. Discussão

O tamanho dos fragmentos de DNA gerado por eletroforese em gel de agarose, após digestão com enzima que corta em um único ponto, apresenta o tamanho compatível com o esperado para ambos os componentes dos begomovírus bipartidos (ca. 2,6kb). Os resultados demonstraram que ambos os componentes, DNA-A e DNA-B, foram amplificados simultaneamente, pois parte do DNA digerido permaneceu formando um DNA de alto peso molecular (Figura 1), possivelmente porque os componentes possuem sítios de restrição distintos. A hibridização com sondas específicas para DNA-A e DNA-B confirmaram que ambos os componentes foram amplificados simultaneamente, uma vez que a hibridização com sonda específica para o DNA-A (Figura 3B) mostrou que somente XhoI digeriu o DNA-A e que a ausência de DNA no topo do gel indica que o DNA foi completamente digerido, o que não ocorre quando hibridizado com sonda para DNA-B, onde todo o DNA-B aparece concentrado no topo do gel formando uma banda de alto peso molecular.

Os resultados demonstram que o TempliPhi pode ser uma eficiente ferramenta da biologia molecular para a clonagem do genoma completo de begomovírus. Outros resultados indicam que essa técnica pode ser bem sucedida quando usada na amplificação de DNAs satélites que muitas vezes acompanham algumas espécies de geminivírus do “velho mundo” e que, em alguns casos, são importantes determinantes da patogenicidade (Albert *et al.*, 2005; Briddon *et al.*, 2003; Mansoor *et al.*, 2003). O uso dessa técnica pode ser aplicado similarmente a outros vírus de planta como os membros da família *Nanoviridae* (Gronenborn, 2004; Stanley, 2004) e para vírus que infectam animais como os pertencentes à família *Circoviridae* (Mankertz *et al.* 2004).

O uso deste método de RCA reduz as chances de incorporação de erros, que ocorrem frequentemente no método baseado na PCR onde são usadas enzimas que não possuem atividade de “proof-reading”. Adicionalmente, o uso da PCR pode falhar na amplificação de moléculas que apresentam mutações na região do primer, o que não ocorre quando se usa o método via ciclo rolante com primers randômicos. A grande vantagem deste método é a possibilidade da clonagem de pequenas quantidades de DNA viral, fato que limita a eficiência quando se usa o método baseado na forma replicativa. Outra

aplicação deste método é a possibilidade de seqüenciamento direto do DNA amplificado após precipitação com etanol. Esta técnica mostrou-se útil para clonagem do DNA-B de um isolado de begomovírus. Assim, todos os vírus que possuam ssDNA circular e replique via ciclo rolante são candidatos ideais para a aplicação do método, incluindo não apenas os vírus de plantas, mas também vírus animal.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOLÓGICA DE UM ISOLADO DE TOMATO YELLOW VEIN STREAK VIRUS

3.1. Introdução

A família *Geminiviridae* é caracterizada estruturalmente pela morfologia geminada da partícula viral, e geneticamente, por possuir uma (monopartidos) ou duas (bipartidos) moléculas de DNA circular de fita simples (ssDNA) (Lazarowitz, 1992). Esta família é dividida em quatro gêneros, *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus* e *Topocuvirus*, de acordo com a organização genômica, círculo de hospedeiros e inseto vetor (Fauquet *et al.*, 2000). A grande maioria dos geminivírus encontrados no Brasil pertence ao gênero *Begomovirus*, que são transmitidos por mosca-branca (*Bemisia tabaci*), infectam plantas dicotiledôneas e possuem o genoma bipartido, denominado de DNA-A e DNA-B (Galvão *et al.* 2003; Andrade *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2006).

Após o primeiro relato de begomovírus no Brasil feito por Flores *et al.* (1960), a ocorrência desses vírus foi pouco relatada, provavelmente porque o biótipo A de *B. tabaci*, o único que, até então, ocorria no Brasil, colonizava o tomateiro com baixa eficiência (Bedford *et al.*, 1994). Contudo, no início da década de 1990 surgiu no Brasil uma grande diversidade de begomovírus, coincidindo com o aparecimento do biótipo B de *B. tabaci*. Atualmente, no Brasil, apenas as espécies *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) são aceitas como espécies definitivas e no mínimo outras oito espécies são propostas. A disseminação dessas espécies em diversas partes do país está associada à introdução e dispersão do biótipo B de *B. tabaci*, que atualmente tem destacada importância como vetor de begomovírus, não apenas para o tomateiro, mas também para outras hortaliças e mais recentemente, a batata.

Em batata (*Solanum tuberosum*), o primeiro relato de begomovírus foi feito no início da década de 1980 por Daniels & Castro (1985), que relataram sintomas de mosaico com deformação foliar em plantações de batata no estado do Rio Grande do Sul. Este

isolado foi coletado e mantido através de propagação vegetativa em casa de vegetação. Posteriormente, comparações de seqüências, a partir da clonagem e seqüenciamento de fragmentos amplificados por PCR, correspondendo ao gene da capa protéica, região intergênica e parte do gene AC1, demonstraram alta identidade (97%) com o Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV-U79998), previamente descrito em tomate no Brasil (Faria *et al.*, 1997). A presença do DNA-B também foi confirmada por PCR. Estes resultados indicam que o mosaico deformante da batata e a doença descrita por Faria e colaboradores (1997) são provavelmente causadas por isolados de Tomato yellow vein streak virus, pertencente ao gênero *Begomovirus* (Ribeiro *et al.*, 2006). Na época do primeiro relato em batata, há mais de 20 anos, essa doença tinha pouca relevância econômica (Daniel & Castro, 1985), no entanto, após a introdução do biótipo B de *B. tabaci*, este vírus tem ressurgido e atualmente é o mais importante begomovírus afetando tomate e batata no estado de São Paulo (Souza-Dias *et al.*, 2003).

Considerando a importância, alta incidência, severidade e a limitada caracterização de begomovírus no Brasil, este trabalho tem o objetivo de caracterizar molecular e biologicamente um begomovírus isolado de batata, denominado Ba-3, provavelmente pertencente à espécie proposta Tomato yellow vein streak virus.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Extração do DNA viral e PCR

Folhas de batata apresentando sintomas de deformação foliar foram coletadas em 1983 no estado do Rio Grande do Sul e o isolado original do vírus foi mantido através de propagação vegetativa em casa de vegetação. Posteriormente foi realizado a extração de DNA (Dellaporta *et al.*, 1983) e a identificação preliminar foi realizada com a amplificação via PCR e a determinação da sequência de um fragmento de 1,8kb, correspondendo a AV1, região comum (RC) e parte da AC1 (Ribeiro *et al.*, 2006).

3.2.2. Amplificação do genoma completo do begomovírus

Para amplificação do genoma completo de ambos os componentes (DNA-A e DNA-B) do begomovírus, isolado Ba3, foi utilizado o sistema de amplificação por círculo rolante (RCA) do TempliPhi Amplification Kit (Amersham Biosciences). Para uma reação com volume total de 11µL foram utilizados 5µL de tampão de desnaturação, 5µL de tampão de reação e 0,5µL do DNA total extraído (ca. 40ng). Em seguida, 0,5µL da solução contendo a enzima foram adicionados e incubados a 30°C por aproximadamente 20 horas. Após isso, eletroforese em gel de agarose (0,6%) contendo 1µL da reação foi realizada para confirmação da amplificação.

3.2.3. Digestão com enzimas de restrição do DNA viral amplificado

O DNA amplificado foi digerido com 11 enzimas de restrição: KpnI, HindIII, PstI, XbaI, SacI, SmaI, XhoI, EcoRI, BamHI, SpeI e EcoRV. A digestão foi realizada para seleção de uma enzima capaz de clivar o genoma viral em um único ponto. A reação de digestão consistiu de: 1µL de DNA, 1-2µL do tampão 10X One-Phor-All (Pharmacia Biotech), 0,5µL de enzima (5-10U/µL) e 6,5-7,5µL água estéril. Os microtubos foram incubados em banho-maria a 37°C por 20 horas. Em seguida, 1µL da reação de digestão foi

usado para visualização do padrão de restrição através da eletroforese em gel de agarose (0,6%).

3.2.4. Hibridização - Southern Blot

Para verificar qual componente (DNA-A ou DNA-B) é digerido pela enzima de restrição foi realizada a hibridização transferindo o DNA digerido em gel de agarose (0,6%) para membrana de náilon carregada positivamente (Hybond N+, Amersham Biosciences). A hibridização foi realizada de acordo com o capítulo 2.

3.2.5. Clonagem do DNA viral no vetor pBluescript SK+

O plasmídeo pBluescript SK+ (Stratagene) foi digerido com XbaI e desfosforilado utilizando a enzima fosfatase alcalina (CIAP, Invitrogen). Para reação de desfosforilação o DNA plasmidial (ca. 300ng) após digerido com XbaI foi submetido a uma extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (24:25:1) seguido de mais uma apenas com clorofórmio e precipitação com a adição de 10% de acetato de sódio 3M, pH 5,2, e dois volumes de etanol absoluto, deixado 1 hora a -80°C e ressuspendido em 100µL com água estéril. A reação de desfosforilação foi realizada adicionando-se 100µL do vetor, 20µL do tampão CIAP, 1µL (1U/µL) da enzima fosfatase alcalina (CIAP, Invitrogen) e o volume completado para 200µL. A reação foi mantida a 37°C por 30 minutos. Foi adicionado mais 1µL da enzima e incubado por mais 45 minutos a 55°C. Em seguida, 5mM final de EDTA foi adicionado à reação e mantido por 10 minutos a 75°C. Após isso, foi realizada mais uma extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e clorofórmio, precipitado e ressuspendido em 80µL de Tris-HCl 10mM, pH 8,0.

O inserto constituiu do DNA amplificado por RCA digerido com XbaI e precipitado com a adição de 10% de acetato de sódio 3M, pH 5,2 e dois volumes de etanol absoluto. Em seguida, foi realizada a reação de ligação adicionando-se 6µL de DNA (ca. 50ng/µL), 1µL do vetor plasmidial (ca. 50ng/µL), 2µL do tampão de ligação 2X (Promega) e 1µL de T4 DNA ligase (3U/µL, Promega). A reação foi mantida a 16°C por 20 horas.

3.2.6. Transformação de *Escherichia coli* e purificação plasmidial

Para a transformação, foram utilizadas células competentes de *E. coli* XL-1 blue preparada para choque térmico de acordo com Sambrook *et al.* (1989). Foram adicionados 2µL da reação de ligação em microtubos contendo 50µL de células competentes e mantidos no gelo durante 30 minutos. Após isso, os microtubos foram transferidos imediatamente para banho-maria a 42°C por 2 minutos e depois durante 3 minutos no gelo. Em seguida, foi adicionado 1 mL de meio LB líquido, incubados a 37°C por 1 hora e, logo após, aplicados 300µL da suspensão bacteriana em placas de Petri estéreis contendo 25mL de meio LB sólido com 25µL de ampicilina (100mg/mL), e distribuídos na superfície 40µL de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-inolil-β-D-galactosídeo) (20mg/mL) e 4µL de IPTG (isopropylthio-β-D-galactoside) (200mg/mL). Após aproximadamente 20 horas de incubação a 37°C, as colônias recombinantes (brancas) foram identificadas e transferidas para tubos de ensaio contendo LB líquido com ampicilina (100mg/mL) e incubadas a 37°C, sob agitação a 200rpm, por aproximadamente 20 horas. A purificação plasmidial dessas culturas bacterianas foi realizada de acordo com Sambrook *et al.* (1989).

3.2.7. Digestão com enzimas de restrição

Após a purificação plasmidial, os possíveis clones foram digeridos com a enzima XbaI para confirmação da clonagem. Para reação de digestão foram utilizados 6µL de DNA (ca. 200ng/µl), 2µL de tampão One-Phor-All (Pharmacia), 1µL da enzima XbaI (10U/µL, Invitrogen), e água estéril completando o volume para 20µL. A reação de digestão foi incubada a 37°C por 20 horas. Os produtos da digestão foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose (1%) e corados com brometo de etídeo para verificar a presença do tamanho do fragmento de DNA esperado.

3.2.8. Seqüenciamento completo dos clones e análise das seqüências

As seqüências dos componentes genômicos foram obtidas através de um seqüenciador automático (ABI 3100). A seqüência completa foi determinada em ambas as

orientações usando primers do vetor e internos (Tabela 1). As seqüências obtidas foram editadas através do programa Staden 4.0 (Staden, 1996) para obter a seqüência consenso de cada componente. Clustal W (www.ebi.ac.uk/clustalw) foi utilizado para múltiplos alinhamentos. Para determinar as ORFs, analisar e comparar as seqüências foram usados os algoritmos ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/>) e Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), disponíveis online e DNAMAN (Versão 4.0; Lynnon Biosoft). Árvores filogenéticas foram obtidas usando Mega 3.0 (Kumar *et al.*, 2004) utilizando o método de Neighbor Joining em análise “bootstrap” com 1000 repetições.

3.2.9. Produção de 1,5 cópias do genoma do isolado Ba3

Para a produção de 1,5 cópias do DNA genômico, um clone do DNA-A do isolado Ba3 foi digerido com as enzimas de restrição XbaI e EcoRV e um clone do DNA-B foi digerido com XbaI e SacI para liberar 0,5 cópia de cada componente do DNA. Cada reação de digestão consistiu de: 10µL de DNA (60ng/µL), 20µL de tampão One-Phor-All (Pharmacia), 30U de cada enzima e água estéril completando o volume para 100µL. A digestão foi mantida a 37° C por 20 horas e 5µL de cada reação foram aplicados em gel de agarose (1%) submetido à eletroforese para confirmação do tamanho do fragmento de DNA esperado. O restante de cada reação foi precipitado e o DNA digerido foi ressuspendido em 20µL de Tris-HCl 10mM, pH 8,0, e todo o volume aplicado no gel de agarose (1%) seguido de eletroforese e purificação através do Perfectprep Gel Cleanup (Eppendorf) com eluição em volume final de 30µL.

Para clonagem de 0,5 cópia do DNA-A e DNA-B do isolado Ba3, o plasmídeo vetor pBluescript SK+ (Stratagene) foi digerido com as enzimas XbaI/EcoRV e XbaI/SacI, respectivamente, e desfosforilado utilizando-se a enzima fosfatase alcalina como descrito anteriormente (CIAP, Invitrogen). A reação de ligação foi realizada adicionando-se 5µL do vetor (ca. 50ng), 15µL do inserto (30ng/µL), 15µL do tampão 2X e 2µL da enzima T4 DNA ligase (3U/µL, Promega). A reação foi mantida a 16°C por 20 horas. A transformação de *Escherichia coli*, adicionando-se 5µL da ligação nas células competentes, e a purificação plasmidial foram realizadas de acordo com o item 3.2.6. Em seguida, a clonagem foi constatada por meio da digestão enzimática com as mesmas enzimas utilizadas para a

clonagem, a fim de verificar se os insertos possuíam o tamanho correspondente ao fragmento de DNA esperado.

Os clones possuindo 1 cópia do genoma (DNA-A e DNA-B), foram digeridos no sítio de clonagem com a enzima XbaI e os fragmentos de DNA correspondentes a uma cópia confirmados em gel de agarose (1%) através de eletroforese. Os fragmentos foram purificados através do Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) e inseridos nos clones possuindo 0,5 cópia do genoma previamente digeridos com XbaI e desfosforilados. Cada reação de ligação consistiu de: 5µL do clone possuindo 0,5 cópia (20ng/µL), 15µL do fragmento correspondente a 1 cópia (40ng/µL), 18µL de tampão de ligação 2X (Promega) e 2µL (3U/µL) da enzima T4 DNA ligase (Promega). A reação foi mantida a 16°C por 20 horas. A transformação de *Escherichia coli* e a purificação plasmidial foram realizadas de acordo com o item 3.2.6. Para confirmação da clonagem de 1,5 cópias o clone do DNA-A foi digerido com as enzimas de restrição XbaI e KpnI e o clone do DNA-B foi digerido com SacI e PstI. Para verificar a orientação correta do inserto, os clones contendo 1,5 cópias do DNA-A e DNA-B foram digeridos com XhoI e SacI, respectivamente.

3.2.10. Bombardeamento dos clones contendo 1,5 cópias do DNA-A e DNA-B do isolado de Ba3

Os plasmídeos recombinantes contendo o inserto de 1,5 cópias do DNA-A e DNA-B de ToYVSV-[Ba3] foram precipitados sobre micropartículas de tungstênio e inoculadas através de bombardeamento em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*), batata (*Solanum tuberosum*), *Nicotiana benthamiana*, *Nicandra physaloides.*, *Datura stramonium*, *Nicotiana tabacum* (TNN), *Physalis pubescens*, *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium quinoa*, amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*) e *Sida rhombifolia*. Para a precipitação, 8µL de cada componente genômico foram misturados (ca. 3-5ng) a 50µL da suspensão de micropartículas de tungstênio (60mg/mL), 50µL de CaCl₂ (2,5M) e 20µL de espermidina (0,1M), e mantidos sob agitação lenta por 10 minutos. A solução foi centrifugada por 10 segundos e lavada duas vezes com etanol absoluto. Após as lavagens, as partículas foram ressuspensas em 24µL de etanol absoluto e 3µL foram transferidos

para membranas carreadoras. Em seguida, as plantas foram inoculadas através de bombardeamento. Para o bombardeamento a pressão do gás hélio (He) foi ajustado para 1200psi. Em seguida, 3 membranas de ruptura, previamente imersas em isopropanol, foram posicionadas na extremidade da câmara de alta pressão do He. No cilindro de suporte foi posicionado a tela de retenção e o suporte da membrana carreadora, contendo o DNA. As plantas a serem bombardeadas foram posicionadas dentro da câmara e fechada. Em seguida, a válvula de vácuo e a válvula de He foram abertas. Quando a pressão do vácuo atingiu 27 polegadas de Hg a válvula foi fechada e liberada a onda de choque através do disparador que ativa a válvula solenóide bombardeando a planta com as partículas de tungstênio e o DNA. Após isso, foram liberados o vácuo e os resíduos de He da câmara de alta pressão e as plantas transferidas para casa-de-vegetação.

3.2.11. Estudos preliminares de pseudo-recombinação

Para testar se o ToYVSV-[Ba3] e os vírus relatados *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV, Fernandes *et al.*, 2006) e *Sida micrantha* mosaic virus (SimMV) são capazes de formar pseudo-recombinates viáveis, clones do DNA-A e DNA-B foram misturados e inoculados por bombardeamento em plantas de tomate. Em seguida, os sintomas foram observados e a infecção confirmada por PCR. Os clones de ToSRV e do isolado 3660 de SimMV usados neste estudo de pseudo-recombinação estão sendo caracterizados pelas estudantes Mariana Martins Severo de Almeida e Edmércia Chaves, respectivamente, no Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (Embrapa - CNPH).

3.3. Resultados

3.3.1. Amplificação do genoma completo do begomovírus

Após a amplificação via ciclo rolante (RCA) do genoma completo de ambos os componentes (DNA-A e DNA-B) do isolado Ba3, 1 μ L da reação foi aplicada em gel de agarose (0,6%) e visualizado um DNA de alto peso molecular (Figura 1A).

3.3.2. Digestão com enzimas de restrição do DNA viral amplificado

O DNA amplificado foi digerido com 11 enzimas de restrição e submetido à eletroforese em gel de agarose (0,6%). Das enzimas de restrição utilizadas apenas KpnI, XbaI, XhoI e EcoRV (Figura 1B, linhas 1, 4, 7 e 11, respectivamente) clivaram o DNA viral em apenas um ponto gerando fragmentos de DNA de tamanho único e esperado (ca. 2,6kb) e as enzimas SacI e EcoRI digeriram em mais de um ponto no genoma, resultando em fragmentos menores que o tamanho do genoma viral (Figura 1B, linhas 5 e 8, respectivamente). As demais enzimas, com exceção SmaI (Figura 1B, linha 6), aparentemente não digeriram o genoma viral (HindIII, PstI, BamHI e SpeI), apresentando fragmentos de DNA com baixa taxa de migração (Figura 1B, linha 2, 3, 9 e 10, respectivamente)

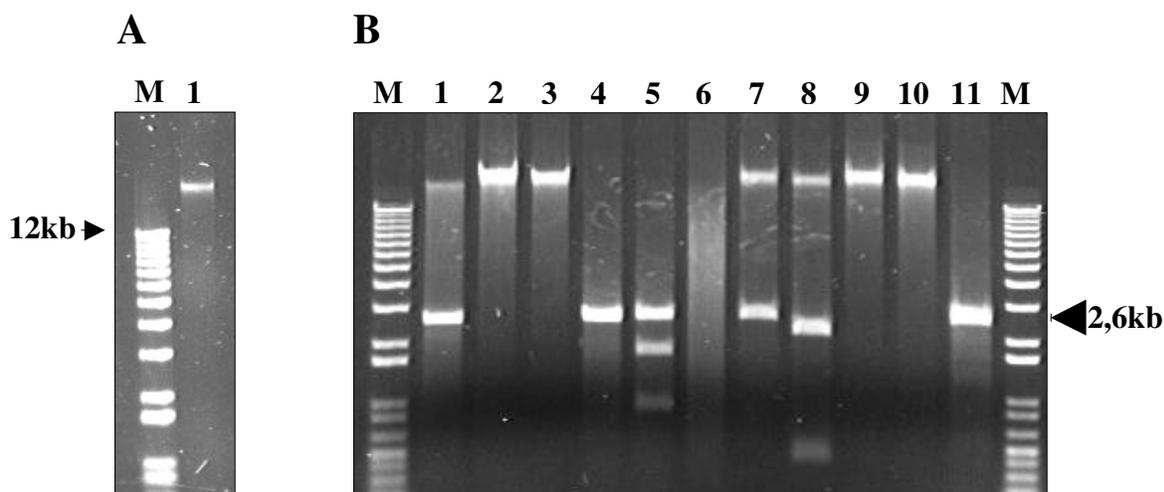


Figura 1. Análise do perfil de restrição do DNA amplificado via ciclo rolante (RCA) da amostra infectada com o begomovírus isolado Ba3 em gel de agarose (0,6%) digerido com enzimas de restrição. (A) 1 kb ladder (Invitrogen) foi usado como marcador (M). DNA não digerido (1). (B) Digestão com as seguintes enzimas: KpnI (1), HindIII (2), PstI (3), XbaI (4), SacI (5), SmaI (6) XhoI (7), EcoRI (8), BamHI (9), SpeI (10) e EcoRV (11).

3.3.3. Hibridização - Southern Blot

A partir da hibridização com sondas específicas foi possível verificar qual componente é digerido pelas enzimas utilizadas. Para o DNA-A, verificou-se que as enzimas EcoRV, XhoI e XbaI (Figura 2A) digeriram o DNA-A provavelmente em apenas um ponto. Enquanto, o fragmento gerado pela enzima SacI (Figura 2A, linha 7), apesar de hibridizar especificamente, não apresentou o tamanho esperado, sendo o fragmento de DNA menor que o esperado. Para as demais enzimas o DNA foi hibridizado com o fragmento único de alto peso molecular, mostrando que o DNA-A não foi digerido (Figura 2A). Para o DNA-B, os resultados demonstram que as enzimas de restrição EcoRV, XhoI, XbaI e KpnI (Figura 2B) digeriram o DNA-B provavelmente em apenas um ponto. Para a enzima SacI (Figura 2B, linha 7), a digestão gerou dois fragmentos especificamente hibridizados indicando que esta enzima digeriu, provavelmente, o DNA-B de dois vírus diferentes, onde um componente possui apenas um sítio para a enzima (fragmento de 2,6kb) e outro com mais de um sítio de restrição produzindo um fragmento de DNA menor.

No caso de EcoRI (Figura 2B, linha 4), apesar da sonda hibridizar o DNA-B, o fragmento gerado é menor e a visualização em gel de agarose indica que o DNA é digerido em pelo menos dois pontos.

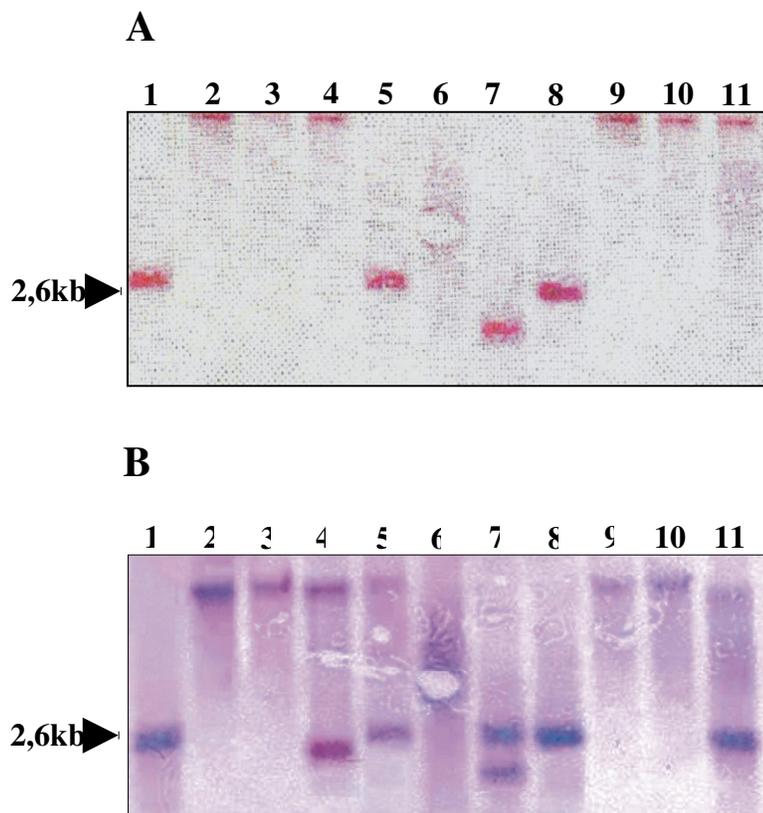


Figura 2. Padrão da eletroforese em membrana de náilon após hibridização com sondas específicas. **(A)** Hibridização com sonda específica para o DNA-A após digestão com as enzimas de restrição EcoRV (1), SpeI (2), BamHI (3), EcoRI (4) XhoI (5), SmaI (6), SacI (7), XbaI (8), PstI (9), HindIII (10) e KpnI (11). **(B)** Hibridização com sonda específica para o DNA-B após digestão com as enzimas de restrição EcoRV (1), SpeI (2), BamHI (3), EcoRI (4) XhoI (5), SmaI (6), SacI (7), XbaI (8), PstI (9), HindIII (10) e KpnI (11). A seta indica o tamanho do fragmento de DNA esperado (2,6kb).

3.3.4. Clonagem do DNA viral no vetor pBluescript SK+

As hibridizações demonstraram que a enzima de restrição XbaI foi capaz de digerir ambos os componentes (DNA-A e DNA-B) em apenas um ponto, assim sendo esta foi selecionada para clonagem completa de ambos os componentes. O DNA amplificado do isolado Ba3 foi digerido com a enzima XbaI e ligado no vetor pBluescript SK+

(Stratagene) previamente digerido com a mesma enzima e desfosforilado. Após a transformação utilizando células competentes de *E. coli*, um total de 16 colônias brancas (recombinantes) foram selecionadas para a extração plasmidial seguida de digestão enzimática com XbaI. Das 16 colônias, 13 apresentaram os fragmentos de DNA esperados, 3kb e 2,6kb, correspondentes ao vetor e ao inserto, respectivamente (Figura 3A).

Em razão da enzima XbaI digerir ambos os componentes, foi realizado uma hibridização de Southern Blot utilizando a sonda específica para o DNA-B (Figura 3B). Assim, foi possível determinar quais clones provavelmente continham o DNA-A e quais o DNA-B. A hibridização com a sonda para o DNA-B mostrou que os clones 3, 4, 5, 12, 13, 15 e 16 apresentaram precipitação do substrato no ponto esperado para o fragmento de 2,6kb (Figura 3B). Os clones 3 e 4 foram selecionados para purificação e posterior seqüenciamento para confirmação do componente. Os demais clones (1, 2, 6, 8, 9 e 14) não hibridizados, provavelmente continham o DNA-A. O clone 1 foi selecionado, purificado e a seqüência do inserto determinada (Figura 3B).

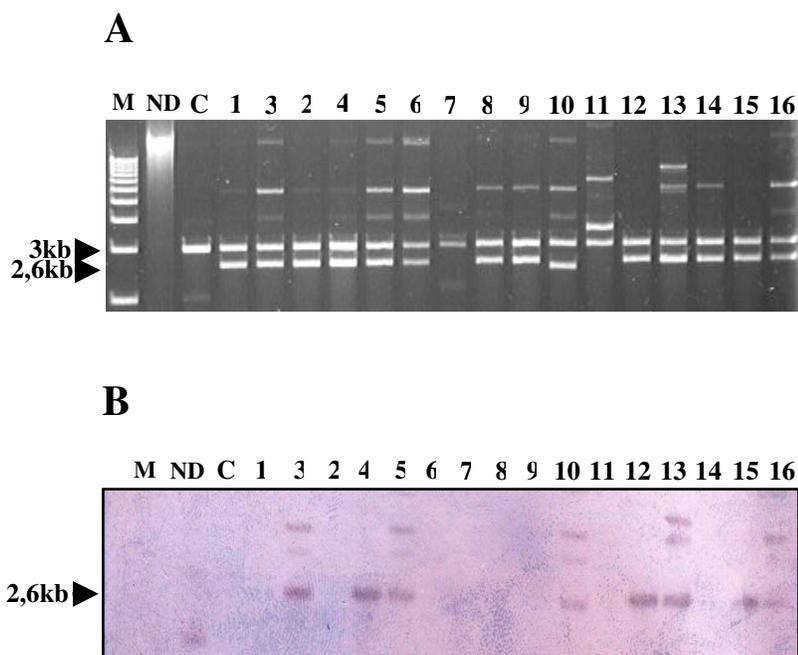


Figura 3. Clonagem do DNA-A e DNA-B do isolado de begomovírus Ba3. (A) Digestão dos clones usando a enzima XbaI. Os clones 1 – 6, 8, 9 e 12 – 16 apresentaram tamanhos de fragmentos de DNA esperados, 3kb (vetor) e 2,6kb (inserto) indicados pelas setas. (B) Southern blot utilizando sonda específica para o DNA-B. No DNA dos clones 3, 4, 5, 12, 13, 15 e 16 o sinal positivo de hibridização na posição correspondente a 2,6kb

indicado pela seta pode ser visualizado. Os demais clones com sinal negativo de hibridização representam o DNA-A.

3.3.5. Seqüenciamento completo dos clones e análise das seqüências

Para o seqüenciamento completo do DNA-A e DNA-B foram utilizados primers do vetor e internos em ambas as orientações (Tabela 1). O isolado Ba3 possui o DNA-A e DNA-B com 2561 e 2569 nucleotídeos, respectivamente. A organização genômica dos componentes é típica dos begomovírus do “novo mundo”. O DNA-A possui uma ORF no sentido viral (AV1) e quatro no sentido complementar (AC1, AC2, AC3 e AC4). O DNA-B possui duas ORFs, uma no sentido viral (BV1) e outra no sentido complementar (BC1) característico de todos os begomovírus bipartidos (Figura 4). Ambos os componentes possuem a região intergênica (RI). Dentro dessa região, o DNA-A e DNA-B apresentam a região comum (RC, Figura 4) com aproximadamente 145 nucleotídeos e com 100% de identidade, sugerindo que este clone de DNA-B é possivelmente cognato do clone de DNA-A. A RC de ambos os componentes contém a seqüência TAATATT↓AC característica de todos os geminivírus e considerada a origem da replicação viral. A seqüência completa do DNA-A tem <88% de identidade com qualquer outra seqüência de begomovirus registrada até o momento. Portanto, de acordo com os critérios taxonômicos para a família *Geminiviridae* (Fauquet *et al.*, 2003; 2008), o Tomato yellow vein streak virus, isolado Ba3 (ToYVSV-[Ba3]) pode ser considerada uma nova espécie de begomovírus.

Tabela 1: Primers utilizados no seqüenciamento completo dos componentes genômicos.

Primer	Seqüência (5' - 3') ¹	Posição no genoma
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG	VETOR
T7	CGGGATATCACTCAGCATAATG	VETOR
PAL1v1978	GCATCTGCAGGCCACATYGTCTTYCCNGT	ORF AC1 e AC4
PAL1c715	GATTTCTGCAGTTDATRTTYTCRTCCATCCA	ORF AV1
496R	GGCTTYCTRACATRGG	ORF AV1
CP1F	CCCGTCGACATGYCTAAGMGKGAAGCCCC	ORF AV1
CP2R	CCCCTGCAGAACTTCCAAGTCTGGACG	ORF AC2
A1630R	CGAGGGGGCCAGCTATAAA	ORF AC1
B1330R	CCTTCACAGCCCAAATC	ORF BC1
CRC2R	CTAGCTGCAGCATATTTACRARWATGCC	RC
CRC2F	GGCATWYTYGTAATATG	RC
B2200F	CCCCTGCAGTAYTAYTYGTYGGATGTC	ORF BC1
BV1-50R	GCTGWRRTATGGMCCA	ORF BV1
800R	CTC CAC TGA CAA GAC AC	ORF BV1
500F	AAC TCT GCT TTC GTG TGG GT	ORF BV1

¹Nucleotídeos nas posições degeneradas são representadas por uma única letra do código de ambigüidade da IUPAC como segue: **Y**= C ou T; **N**= A,C,T ou G; **R**= A ou G; **D**= A,T ou G; **K**= G ou T; **M**= A ou C; **W**= A ou T. Os nucleotídeos destacados em sublinhado indicam o sítio de restrição da enzima PstI (CTGCAG) e Sall (GTCGAC).

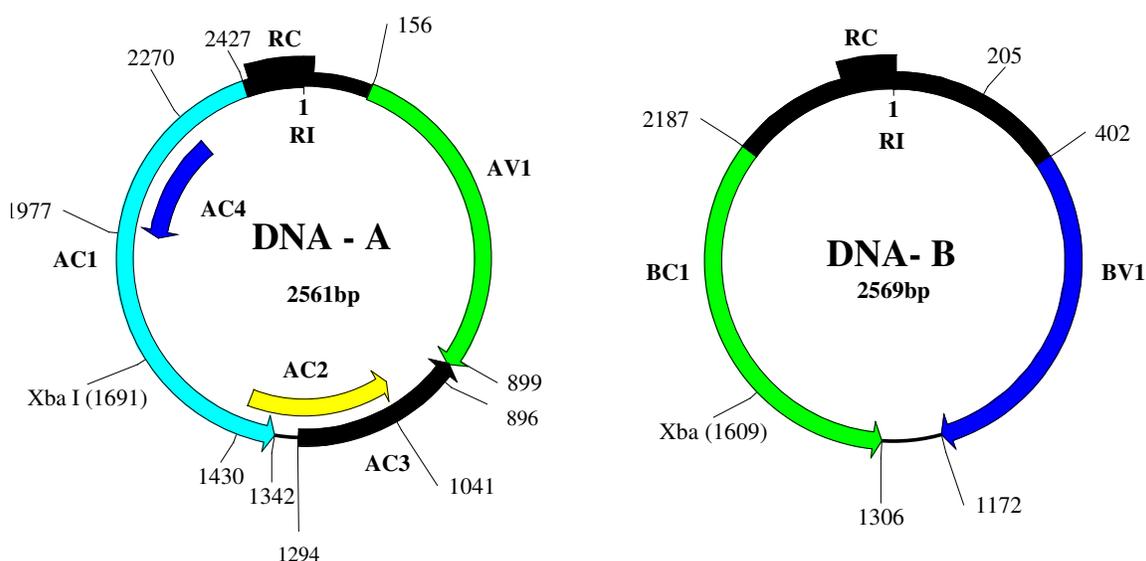


Figura 4. Organização genômica de Tomato yellow vein streak virus, isolado Ba3 (ToYVSV-[Ba3]). As setas indicam a posição das ORFs no sentido viral (V) e complementar (C). As posições numeradas indicam o códon iniciador e o códon de parada de cada ORF. O nucleotídeo número 1 localizado dentro da região intergênica representa o sítio de clivagem (↓) na seqüência TAATATT↓AC.

Comparou-se a seqüência de nucleotídeos do DNA-A e DNA-B entre o ToYVSV-[Ba3] e outros 12 begomovírus do Brasil (Tabela 2), com exceção do *Tomato leaf curl Thailand virus* (TYLCTV) que é um begomovírus encontrado na Ásia. As seqüências que apresentaram maior identidade de seqüência completa com o DNA-A de ToYVSV-[Ba3] foram a de ToYVSV-[G22] com 89,7% e TGMV com 77,3%. Para o DNA-B a maior identidade de seqüência foi com a seqüência de ToRMV e ToSRV, ambos com 66,3% (Tabela 2). Na comparação da seqüência de nucleotídeos das ORFs do DNA-A, a mais conservada entre os begomovírus brasileiros foi a ORF AV1, com identidade de seqüência variando entre 80% (ToCMoV-[BA]) e 92% (ToYVSV-[G22]). A segunda ORF mais conservada foi a AC3 mostrando menor identidade com *Sida micrantha* mosaic virus (SimMV), isolado A2 (80,2%), e maior identidade com ToYVSV-[G22] (90,8%). Apesar do ToYVSV-[G22] apresentar identidade acima de 90% nas ORFs mais conservadas, a seqüência completa apresentou identidade de 89,7% com ToYVSV-[Ba3], o mais próximo entre os begomovírus brasileiros (Tabela 2). A ORF AC4 do ToYVSV-[Ba3] possui identidade de seqüência mais próxima com o ToCMoV-[Ba] (83,3%), enquanto que para o ToYVSV-[G22], isolado com maior identidade de seqüência com DNA-A do ToYVSV-[Ba3], essa ORF não é determinada.

Tabela 2. Porcentagem de identidade de nucleotídeos do DNA-A (completo e ORFs individuais) e DNA-B do ToYVSV-[Ba3] com outros begomovirus.

Vírus-[isolado] ¹	DNA-A	DNA-B	ORF individual				
			AV1	AC1	AC2	AC3	AC4 ²
ToYVSV-[G22]	89,7	ND	92,0	87,8	72,2	90,8	ND
BGMV	72,6	65,0	80,4	70,5	77,1	82,6	ND
TGMV	77,3	63,3	85,4	73,8	83,3	83,7	67,3
ToRMV	73,3	66,3	80,9	71,4	78,2	82,4	16,7
ToSRV-[GO]	75,6	66,3	82,4	71,6	76,6	84,4	64,3
ToCMoV-[BA]	75,4	63,8	80,0	76,3	77,1	82,4	83,3
SimMV-[A1]	72,2	63,0	81,6	73,4	80,0	81,4	62,0
SimMV-[A2]	71,4	59,4	80,8	73,3	72,8	80,2	67,3
ToYSV	72,5	62,3	80,9	74,3	78,9	80,9	ND
SiMoV	71,7	ND	82,0	71,9	83,0	81,4	32,3
SiYMV	74,8	ND	82,1	79,0	82,9	81,5	72,7
TYLCTV	60,5	41,3	65,1	62,1	55,6	63,8	78,0

¹Numero de acesso no banco de dados: ToYVSV-[G22] [Tomato yellow vein streak virus - EF459696 (DNA-A)], BGMV [*Bean golden mosaic virus* – NC_001439 (DNA-A) e NC_004043 (DNA-B)], TGMV [*Tomato golden mosaic virus* – NC_001507 (DNA-A) e NC_001508 (DNA-B)], ToRMV [*Tomato rugose mosaic virus* – NC_002555 (DNA-A) e NC_002556 (DNA-B)] , ToSRV-[GO] [*Tomato severe rugose virus* - DQ207749 (DNA-A) e NC_009612 (DNA-B)], ToCMoV-[BA] [*Tomato chlorotic mottle virus* - AF491306 (DNA-A) e AF491306 (DNA-B)] , SimMV-[A1] [*Sida micrantha* mosaic virus - AJ557450 (DNA-A) e AJ557454 (DNA-B)], SimMV-[A2] [AJ557451 (DNA-A) e AJ557453 (DNA-B)], ToYSV [Tomato yellow spot virus - NC_007726 (DNA-A) e NC_007727 (DNA-B)], SiMoV [*Sida mottle virus* - NC_004637 (DNA-A)], SiYMV [*Sida yellow mosaic virus* - AY090558 (DNA-A)], TYLCTV [*Tomato yellow leaf curl Thailand virus* - NC_00869 (DNA-A) e NC_000870 (DNA-B)].

² ND= não determinado

Análises de múltiplos alinhamentos da RC do DNA-A de begomovirus brasileiros demonstram que o ToYVSV-[Ba3], ToYVSV-[G22], Sida yellow mosaic virus (SiYMV) e ToCMoV-[BA] compartilharam a mesma sequência provável de iteron GGGGA (Figura 5). Para o DNA-B, estas análises demonstram que este mesmo iteron (GGGGA) está presente no ToYVSV-[Ba3] e é compartilhado pelo ToCMoV-[Ba3] entre aqueles que possuem sequência disponível (Tabela 2).

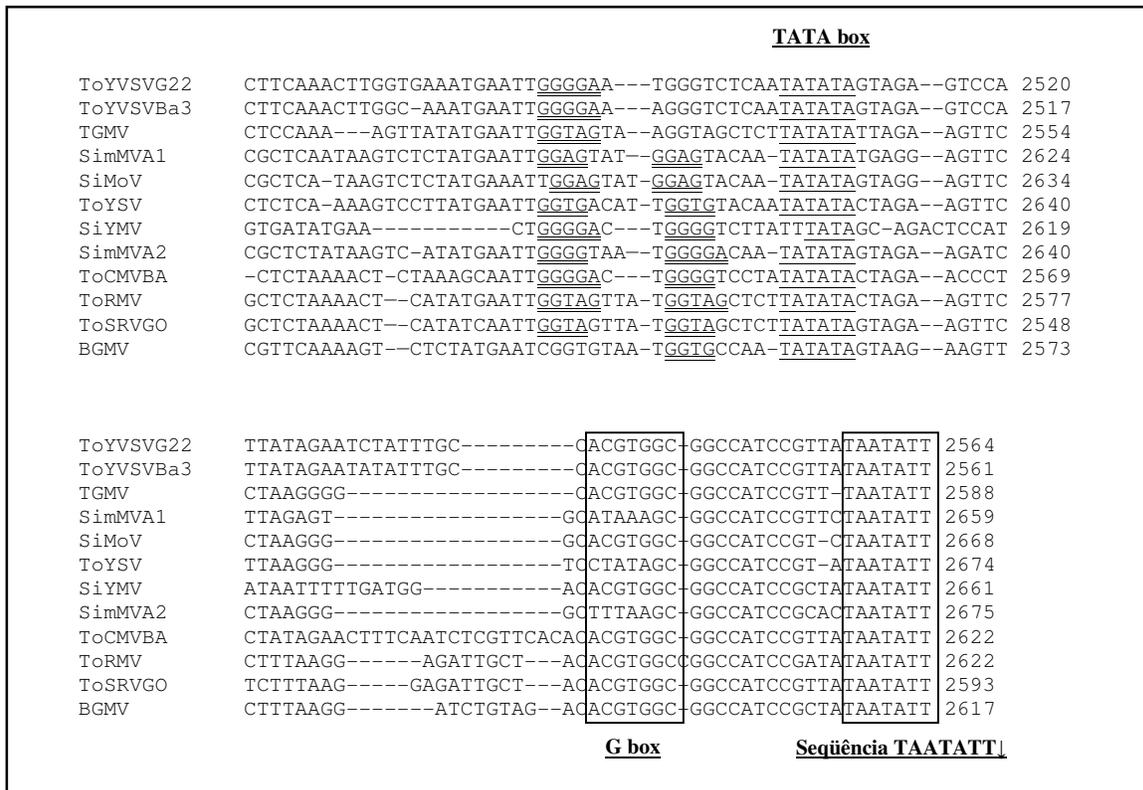


Figura 5. Alinhamento da seqüência de parte da RC do DNA-A de ToYVSV-[Ba3] com outros begomovírus. O TATA box é sublinhado e destacadas as seqüências TAATATT↓ e G box. As seqüências com sublinhados duplos correspondem a seqüências específicas, denominadas iterons, de acordo com Arguello-Astorga & Ruiz-Medrano (2001).

Uma análise filogenética foi realizada com a seqüência completa de nucleotídeos do DNA-A de Ba3 e dos 12 begomovírus brasileiros possuindo seqüência completa do DNA-A (Figura 6). A seqüência do DNA-A de TYLCTV foi utilizada como “outgroup”. Os begomovírus usados na análise são claramente separados em três grupos. Um grupo (SimMV-A1, SiMoV, SiYMV e SimMV-A2) inclui os begomovírus detectados em plantas daninhas ou com uma relação filogenética próxima, como no caso de ToYSV (Andrade *et al.*, 2006) e outro (BGMV, ToCMV-BA, ToRMV e ToSRV-GO) inclui os vírus detectados em plantas cultivadas (tomate e feijão). Curiosamente, um terceiro grupo formado por vírus também detectado em plantas cultivadas (batata e tomate) são separados dos demais, sendo que ToYVSV-[Ba3] e ToYVSV, isolado G22, são muito mais próximos entre si do que com o TGMV.

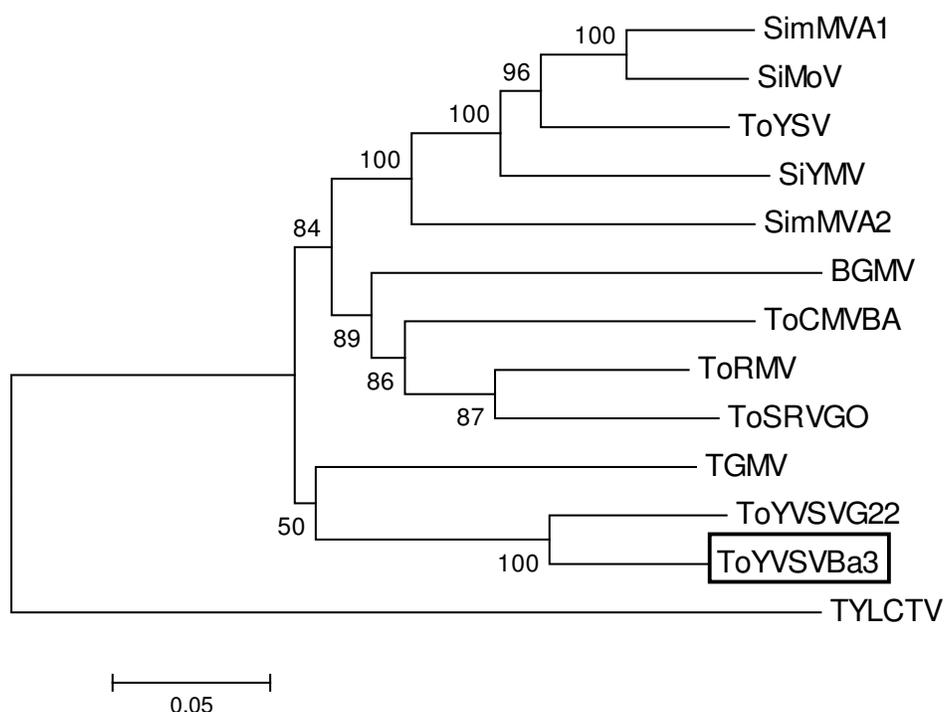


Figura 6. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento das seqüências completas de nucleotídeos do DNA-A dos vírus relacionados na Tabela 2. A árvore foi obtida pelo programa Mega 3 utilizando o método de Nighbour Joining em análise “bootstrap” com 1000 repetições. A barra horizontal indica o valor de substituições por sítio.

3.3.6. Produção de clones infectivos com 1,5 cópias do genoma de ToYVSV-[Ba3]

Para obter clones infectivos, contendo duas origens de replicação (1,5 cópias), os clones contendo uma cópia (2,6kb) do DNA-A e DNA-B foram digeridos com as enzimas de restrição XbaI/EcoRV e XbaI/SacI, respectivamente (Figura 7). O clone do DNA-A depois de digerido com XbaI e EcoRV produziu um fragmento de DNA de aproximadamente 1,3kb (Figura 7A) que foi eluído do gel (Figura 7B). O DNA-B digerido com XbaI e SacI produziu um fragmento de DNA de 1,7kb e outra de aproximadamente 800 bp (Figura 7C). O DNA de 1,7kb, onde se encontra a origem de replicação, foi purificado do gel de agarose (1%) e novamente submetido a eletroforese para confirmação (Figura 7D).

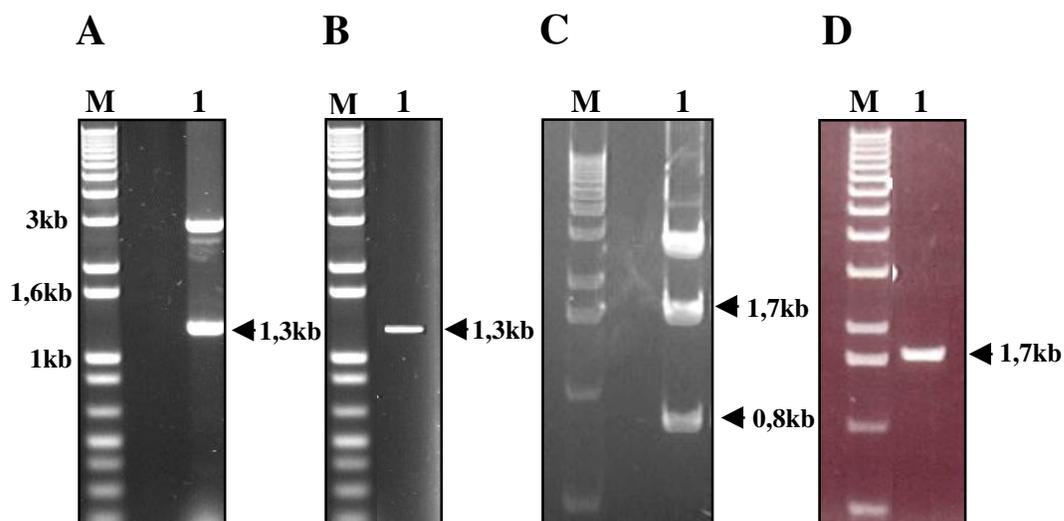


Figura 7. Digestão e purificação dos fragmentos correspondentes a 0,5 cópia de DNA-A e DNA-B de ToYVSV, isolado Ba3. (A) Digestão do clone contendo uma cópia do DNA-A com XbaI e EcoRV gerando fragmento de 1,3kb. (B) Purificação do fragmento de 1,3kb a partir do gel de agarose (1%). (C) Digestão do clone contendo uma cópia do DNA-B gerando fragmentos de 1,7kb e 0,8kb. (D) Purificação do fragmento de 1,7kb a partir do gel de agarose (1%).

Após a ligação do fragmento de 1,3kb (DNA-A) e 1,7kb (DNA-B) no vetor pBluescript SK+ e transformação da célula competente, os possíveis clones foram submetidos a extração plasmidial seguida da digestão com as mesmas enzimas utilizadas na clonagem para confirmar o inserto. Para o DNA-A, um total de 18 colônias foram selecionadas e após a digestão 11 clones apresentaram fragmentos de DNA de tamanho esperado, 1,3kb do inserto e 3kb do vetor (Figura 8A). A digestão foi parcial e o gel demonstrou a presença de grande quantidade de DNA não digerido. Para o DNA-B, 17 colônias foram selecionadas e após a digestão todos os clones apresentaram fragmentos de DNA de tamanho esperado, 1,7kb e 3kb do inserto e vetor, respectivamente (Figura 8B).

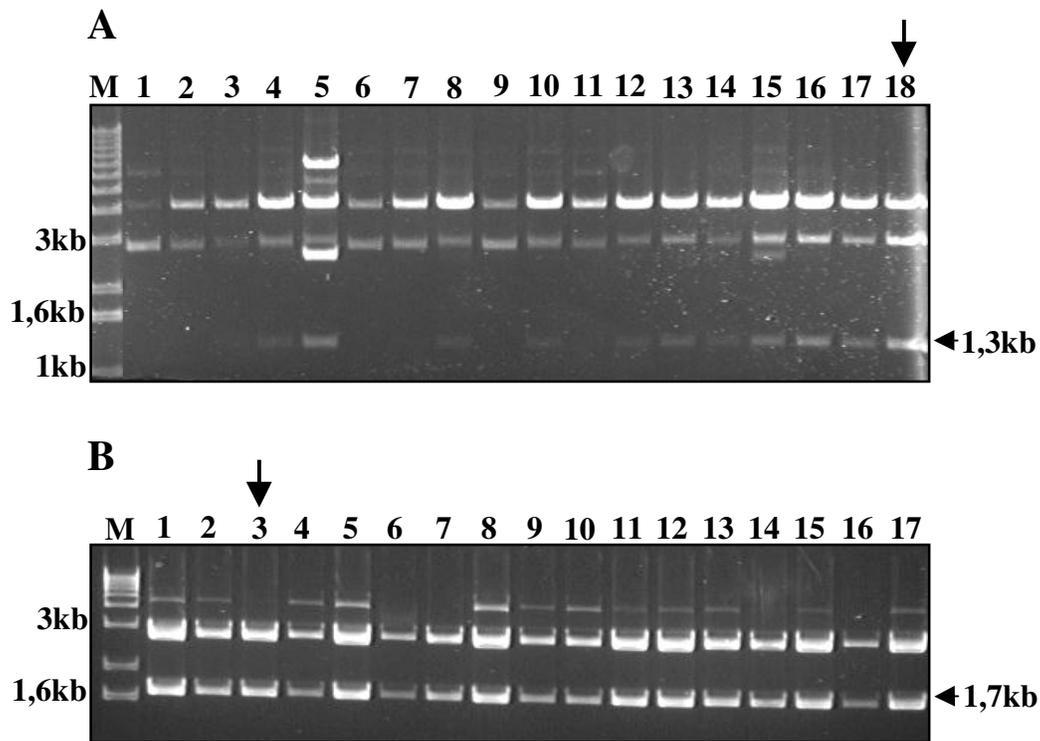


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose (1%). (A) Clones do DNA-A digeridos com XbaI e EcoRV. Os clones 4, 5, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18 apresentaram fragmentos de tamanho esperado (1,3kb, seta). O clone 18 indicado pela seta acima foi selecionado. (B) Clones do DNA-B digeridos com XbaI e SacI mostrando todos os clones com fragmento de DNA esperado (1,7kb, seta). O clone 3 escolhido está indicado pela seta acima.

Para a produção do clone de 1,5 cópias de ambos os genomas, os clones possuindo o genoma completo de ambos os componentes (DNA- e DNA-B) foram digeridos com XbaI e os fragmentos de DNA correspondentes ao genoma viral completo foram purificados. Os clones selecionados 18 e 3 contendo o fragmento de 1,3kb (DNA-A) e 1,7kb (DNA-B), respectivamente, previamente digeridos e desfosforilados receberam o genoma completo dos respectivos componentes. Após a transformação das células competentes foi realizado a extração plasmidial seguido de digestão com XbaI para a confirmação da inserção do monômero de cada componente. Para o clone contendo 1,5 cópias do DNA-A (representação esquemática na Figura 9B) foi realizada a digestão com a enzima de restrição KpnI, onde seu sítio de restrição ocorre apenas no vetor vetor pBluescript SK+ (Stratagene) e a digestão parcial com a enzima XbaI variando sua concentração para

confirmar a inserção correta (Figura 9A). Para confirmar a orientação correta do inserto o clone contendo 1,5 cópias do DNA-A foi digerido com XhoI produzindo fragmentos de DNA com tamanho de 2,6kb, 1,1kb e 3,2kb e o clone DNA-B digerido com SacI produzindo fragmentos de DNA com tamanho de 4,7kb e 2,6kb, indicando que a orientação correta de ambos os clones.

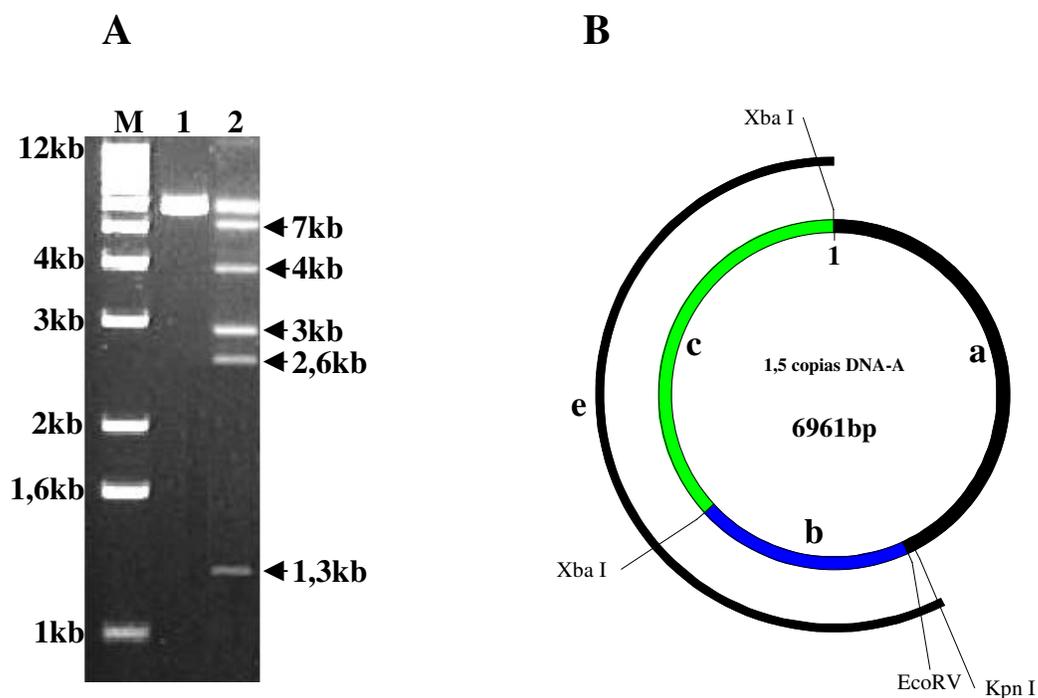


Figura 9. Digestão total do KpnI e parcial com XbaI. (A) fragmentos de DNA gerados após a digestão de 1,5 cópias do DNA-A. (M) 1 kb ladder (Invitrogen) usado como marcador (1) DNA não digerido e (2) Digestão parcial (B) Ilustração dos possíveis fragmentos de DNA gerados a partir da digestão parcial de XbaI. (a) fragmento correspondente ao vetor, (b) fragmento de 1,3kb, (c) genoma completo (2,6kb), (d) vetor + fragmento de 1,3kb, (e) fragmento de 1,3 + genoma completo (2,6kb) e fragmento correspondente a todo clone (ca. 7kb).

3.3.7. Bombardeamento dos clones contendo 1,5 cópias do DNA-A e DNA-B do ToYVSV-[Ba3]

Os clones de 1,5 cópias de ambos o DNA-A e DNA-B de ToYVSV-[Ba3] foram capazes de infectar algumas espécies de plantas cultivadas quando inoculadas por bombardeamento de partículas (Tabela 3, Figura 10). Das 6 plantas de batata inoculadas 4

plantas desenvolveram os sintomas originais de deformação foliar e manchas cloróticas (Figura 10a e 10b). Plantas de *N. benthamiana* infectadas desenvolveram sintomas de mosqueado, enrolamento foliar e leve deformação foliar em 9 das 10 plantas inoculadas (Figura 10c e 10d). Em tomate, das 10 plantas inoculadas apenas 2 plantas mostraram sintomas de clorose entre as nervuras, deformação foliar e mosaico amarelo (Figura 10e). Contudo, em nenhuma dessas plantas foram observados sintomas quando bombardeadas apenas com o 1,5 cópias do DNA-A de ToYVSV-[Ba3], sugerindo que para causar infecção sistêmica o vírus depende do DNA-B. Para as 7 plantas de *Nicandra physaloides* que foram bombardeadas, 2 plantas desenvolveram sintomas de deformação foliar, pontos necróticos e clareamento de nervura (figura 10f). As demais 7 espécies de plantas inoculadas com os clones de Ba3 não se mostraram susceptíveis. Todas as plantas usadas no teste de bombardeamento foram submetidas à extração de DNA e PCR. Enquanto o vírus foi detectado em todas as plantas que apresentaram sintomas, as plantas sem sintomas e aquelas usadas como controle (bombardeadas com partículas sem DNA) apresentaram resultado negativo na detecção.

Tabela 3. Círculo de hospedeiros e sintomas produzidos em plantas teste inoculadas através de bombardeamento dos clones de 1,5 cópias de ToYVSV-[Ba3].

Planta hospedeira	Infectividade*	Sintomas†
<i>Solanum lycopersicum</i> 'Viradoró'	2/20	CN, DF, MA
<i>Nicotiana benthamiana</i>	9/10	Mo, EF, LDF
<i>Euphorbia heterophylla</i>	0/6	-
<i>Nicandra physaloides</i>	2/7	DF, PN, CN
<i>Datura stramonium</i>	0/7	-
<i>Nicotiana tabacum</i>	0/7	-
<i>Physalis pubescens</i>	0/7	-
<i>Solanum tuberosum</i>	4/6	DF, M
<i>Sida rhombifolia</i>	0/6	-
<i>Chenopodium quinoa</i>	0/7	-
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	0/9	-

* Número de planta com sintomas e detecção positiva por PCR/número de plantas bombardeadas.

† CN=Clareamento de nervura, DF=Deformação foliar, MA=mosaico amarelo, Mo=mosqueado, EF=enrolamento foliar, LDF= leve deformação foliar, PN=pontos necróticos, M= mosaico.

3.3.7. Estudo preliminar de pseudo-recombinação

A frequência com que os componentes genômicos se arranjam na natureza e formam pseudo-recombinantes não é conhecida, no entanto, em condições experimentais, algumas vezes, é possível formar pseudo-recombinantes viáveis sendo um indicativo de relacionamento taxonômico entre dois begomovírus distintos. Para o estudo preliminar de pseudo-recombinação os vírus *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Sida micrantha* mosaic virus (SimMV) e *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) foram utilizados. Os resultados indicam que o DNA-A de ToYVSV-[Ba3] e o DNA-B de ToSRV foram capazes de formar pseudo-recombinantes viáveis (4/8 plantas inoculadas), enquanto que entre o DNA-A de ToSRV e o DNA-B de ToYVSV-[Ba3] a pseudo-recombinação mostrou-se menos eficiente (1/8 plantas inoculadas). Entre o DNA-A de ToRMV e o DNA-B de ToYVSV-[Ba3] possivelmente houve a ocorrência de pseudo-recombinação (2/8 plantas inoculadas), mas entre o DNA-A de ToYVSV-[Ba3] e o DNA-B de ToRMV não foi verificada infecção. Interessantemente, esses vírus não possuem sítios de ligação da Rep (iterons) idênticos. A infecção foi confirmada através de PCR. Os componentes genômicos de SimMV e ToYVSV-[Ba3] aparentemente não foram capazes de formar pseudo-recombinantes viáveis (0/8 para cada combinação).

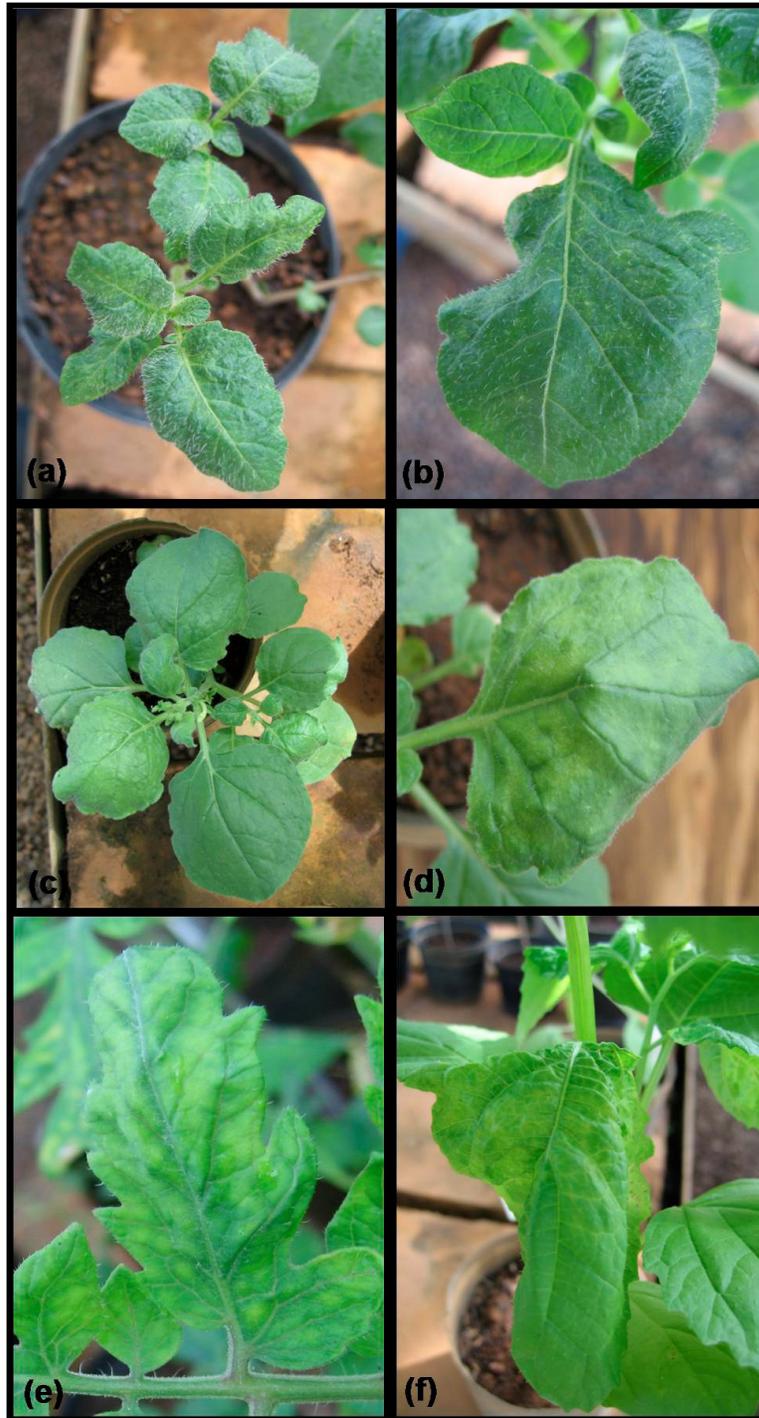


Figura 10. Sintomas induzidos por Tomato yellow vein streak virus – [Ba3]. (a) e (b) Folha de batata mostrando sintomas de deformação foliar e manchas cloróticas (c) e (d) *N. benthamiana* com sintomas de mosqueado, enrolamento foliar e leve deformação foliar (e) Tomate com sintomas de clorose entre nervuras, deformação foliar e mosaico amarelo e (f) *N. physaloides* apresentando deformação foliar, pontos necróticos e clareamento de nervura.

3.4. Discussão

Este estudo compreende na caracterização molecular e biológica de um isolado de begomovírus (fam. *Geminiviridae*), denominado aqui de ToYVSV-[Ba3], causando doença em batata e tomate nas regiões sul e sudeste do Brasil. A doença foi primeiramente conhecida como mosaico deformante da batata descrita nos anos 80 na região sul do Brasil, no estado do Rio Grande do Sul (Daniels & Castro, 1985) e posteriormente no estado de São Paulo (Faria *et al.*, 1997; Souza-Dias *et al.*, 2003). Ribeiro *et al.* (2006), estudando a seqüência parcial do isolado do Rio Grande do Sul, confirmou alta identidade de nucleotídeos (97,3%) com a seqüência parcial disponível de Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV-U79998), um vírus previamente descrito em tomate no Brasil (Faria *et al.*, 1997). Este estudo é o primeiro a apresentar a seqüência completa dos clones do isolado capazes de induzir infecção sistêmica tanto em plantas de batata e tomate como também em plantas daninhas através do método utilizando o bombardeamento de partículas.

A análise das seqüências de ambos os componentes, ToYVSV-[Ba3] DNA-A e DNA-B, mostrou que sua organização genômica é típica dos geminivírus do hemisfério ocidental, pertencendo ao gênero *Begomovirus* com genoma bipatido. A identidade de seqüências do ToYVSV-[Ba3] DNA-A foi menor que 88% quando comparado com qualquer outro begomovírus com seqüência registrada até o momento. Assim, baseado nos critérios taxonômicos atuais (Fauquet *et al.*, 2003; 2008), estes clones do isolado muito provavelmente representam uma nova espécie do gênero, nomeado como Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV). A região comum (RC) do DNA-A e DNA-B possui identidade de 100% e os iterons são idênticos, de acordo com Arguello-Astorga & Ruiz-Medrano (2001) que descrevem para o ToYVSV o iteron GGGGA.

O círculo de hospedeiros é um importante pré-requisito para entender a epidemiologia do vírus e pode ser útil para a elaboração de práticas de controle adequadas (Polston & Anderson, 1997). O estudo do círculo de hospedeiros do ToYVSV-[Ba3] foi realizado através da inoculação por bombardeamento e incluiu plantas cultivadas e daninhas. Os clones contendo 1,5 cópias do genoma do ToYVSV-[Ba3] DNA-A e DNA-B foram infecciosos quando inoculados em batata, tomate, *N. benthamiana* e *N. physaloides*. Os clones bombardeados em batata e *N. benthamiana* mostraram que o número de plantas

infectadas por número de plantas bombardeadas foi muito superior quando comparados com tomate e *N. physaloides* que também foram infectadas. Isso sugere que ToYVSV-[Ba3] é mais adaptado a batateiras e tem uma baixa eficiência de infecção em tomateiro. Provavelmente, o potencial do ToYVSV, original de batata, em infectar tomate deve-se em parte ao fato da constante associação dessas duas culturas em uma mesma propriedade ou entre propriedades vizinhas aumentando as chances de seleção de isolado que infecta ambas as espécies. Os resultados ainda sugerem que *N. physaloides* que está constantemente associada aos campos de plantações de tomate possa atuar como reservatório e fonte de inoculo. A baixa infectividade dos clones em *N. physaloides* pode ser devido à baixa adaptabilidade do vírus a esse hospedeiro. As demais plantas que não foram infectadas, *E. heterophylla*, *D. stramonium*, *N. tabacum*, *P. pubescens*, *S. rhombifolia*, *C. quinoa* e *C. amaranticolor*, indicam que o ToYVSV-[Ba3] apresenta um limitado círculo de hospedeiros, demonstrando uma relativa especificidade a determinadas hospedeiras. Recentemente, o ToYVSV foi considerado o mais importante begomovírus infectando batata e tomate no estado de São Paulo (Souza-Dias *et al.*, 2003), o que confirma a boa adaptabilidade em plantas de batata.

Somente o DNA-A de ToYVSV foi incapaz de infectar sistemicamente e induzir sintomas em plantas de batata, tomate e *N. benthamiana* na ausência do DNA-B. A habilidade que alguns begomovírus bipartidos possuem em infectar sistemicamente algumas hospedeiras, especialmente *N. benthamiana*, tem sido demonstrado. No Brasil, Galvão *et al.* (2003) e Fontenelle *et al.* (2007) demonstraram que o DNA-A de ToCMoV-[MG-Bt1] pode infectar sistemicamente e induzir sintomas em *N. benthamiana* e tomateiro na ausência do DNA-B. No entanto, o ToCMoV-[Ba-Se1] que apresenta 92% de identidade de sequência com o ToCMoV-[MG-Bt1], curiosamente apresenta diferença na infectividade necessitando de ambos os componentes para causar infecção (Ribeiro *et al.*, 2007). Porém, a importância biológica do DNA-A em infectar sistemicamente a hospedeira na ausência do DNA-B ainda não é conhecida, pois na natureza todos os vírus que apresentam esta característica, incluindo o ToCMoV-[MG-Bt1], foram encontrados acompanhados pelo seu cognato DNA-B.

A emergência de novos begomovírus se baseia na hipótese de que os vírus que infectam plantas daninhas e espécies nativas tenham se transferido para novos hospedeiros,

gerando novas espécies de vírus após eventos principalmente de recombinação e/ou pseudo-recombinação (Monci *et al.*, 2002; Padidam *et al.*, 1999; Saunders *et al.*, 2002). A formação de pseudo-recombinantes viáveis é uma maneira fácil e confiável para detectar a relação evolutiva entre begomovírus bipartidos (Gilbertson *et al.*, 1993; Pita *et al.*, 2001). Os testes preliminares de pseudo-recombinação envolvendo o ToYVSV-[Ba3] e outros begomovírus brasileiros indicam que este isolado pode pseudo-recombinar com outros vírus. Quando o DNA-A de ToYVSV-[Ba3] é bombardeado em plantas de tomate juntamente com o DNA-B de ToSRV metade das plantas desenvolvem sintomas (4/8), quando este mesmo DNA-A é bombardeado juntamente com o DNA-B de ToRMV nenhuma das oito plantas de tomate desenvolveram sintomas. Porém, quando o DNA-B de ToYVSV-[Ba3] é combinado e bombardeado com o DNA-A de ToSRV a infectividade foi reduzida (1/8 plantas) e quando este DNA-B é bombardeado juntamente com o DNA-A de ToRMV esta combinação tornou-se viável (2/8 plantas). Em princípio, a pseudo-recombinação envolve a proteína viral Rep e seqüências na região comum (RC) denominadas de iterons. No entanto, o DNA-A de ToYVSV-[Ba3] não apresenta nenhum tipo de iteron relacionado ao DNA-B de ToSRV e nem o seu cognato com o DNA-A de ToRMV (Fernandes *et al.*, 2006). A capacidade do ToYVSV-[Ba3] em formar pseudo-recombinantes com estes vírus pode ser explicada com base nas recentes publicações, que demonstram que o sitio de ligação da Rep pode não ser tão específico como previamente descrito (Garrido-Ramirez *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2003). Andrade *et al.* (2006) demonstraram que componentes genômicos apresentando iterons diferentes foram capazes de formar pseudo-recombinante infeccioso entre do DNA-A de TGMV e o DNA-B de ToYSV, sugerindo que a formação de pseudo-recombinantes viáveis pode não ser explicada apenas com base nas seqüências de iterons. Assim, a proteína Rep de ToYVSV-[Ba3] pode ser versátil e reconhece diferentes sítios de ligação na RC, permitindo que dois componentes (DNA-A e DNA-B) heterólogos sejam capazes de interagir eficientemente e produzir infecção sistêmica e sintomas. As análises dos múltiplos alinhamentos de seqüência da RC do DNA-A e DNA-B de begomovírus brasileiros demonstraram que muito provavelmente o ToCMoV-[BA] seja um candidato em potencial para formar um pseudo-recombinante viável com ToYVSV-[Ba3], pois foi o único a apresentar a provável seqüência de iteron (GGGGA) descrita para o ToYVSV na RC de ambos os componentes.

A seqüência da RC de SiYMV também apresentou a mesma seqüência de iteron, mas a seqüência de nucleotídeos do DNA-B ainda não foi determinada. Estudos mais detalhados de pseudo-recombinação envolvendo estes vírus deverão ser realizados.

A análise filogenética baseada nas seqüências do DNA-A dos begomovírus do “novo mundo” (Rojas *et al.*, 2005) indica que os begomovírus brasileiros formam um grupo monofilético. Dentro deste grupo os vírus são aparentemente separados em dois grupos, um formado por aqueles que infectam plantas daninhas e outro por aqueles que infectam plantas cultivadas. Neste trabalho, a árvore filogenética (Figura 6) agrupou os vírus de modo semelhante, porém, com a formação de mais um grupo onde se encontram muito próximos os isolados ToYVSV-[Ba3] e ToYVSV-G22 indicando ser possivelmente o mesmo vírus de acordo com os critérios recentemente propostos de classificação de geminivírus (Fauquet *et al.*, 2008). Uma espécie proposta denominada de Tomato golden vein virus (TGVV- AY751742) também compartilha de alta identidade de nucleotídeos com o isolado Ba3 e com o ToYVSV-G22. Estudos adicionais são necessários para esclarecer a relação entre TGVV e ToYVSV. Um outro vírus presente no mesmo grupo é o TGMV indicando ser um candidato para formar pseudo-recombinante com ToYVSV-[Ba3] em experimentos futuros.

Pesquisas recentes indicam alta incidência do ToYVSV causando infecção em plantas de batata e tomate, principalmente no estado de São Paulo (Souza-Dias *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2008). Contudo, outros begomovírus estão também presentes com alta incidência, particularmente o *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) e Tomato golden vein virus (TGVV). Medidas de controle baseadas nos programas de melhoramento visando resistência podem ser concentradas nessas espécies que têm prevalecido nos últimos anos.

A caracterização continua em andamento e é possível que os próximos resultados colaborem para uma completa e definitiva conclusão sobre a validade do Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV) como uma espécie definitiva.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os begomovírus são geminivírus que infectam plantas dicotiledôneas e são transmitidas por mosca-branca (*B. tabaci*). Estes vírus têm emergido como sérios patógenos de culturas agronômicas em regiões tropicais e subtropicais em vários países, sendo responsáveis por severas perdas na produção mundial, refletindo nos aspectos sócio-econômicos em países onde ocorrem epidemias. No Brasil, os begomovírus têm causado grandes prejuízos não apenas na produção de feijão e tomate como também na produção de batata.

Este estudo é o primeiro a apresentar a seqüência completa de um begomovírus isolado de batata capaz de induzir infecção sistêmica tanto em plantas de batata e tomate como também em plantas daninhas (via bombardeamento de partículas). Os resultados obtidos podem confirmar que este isolado de batata (isolado Ba3), baseado nos critérios taxonômicos atuais (Fauquet *et al.*, 2003; 2008), provavelmente representa uma nova espécie do gênero *Begomovirus*, nomeado como Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV). Um estudo recente realizado por Fernandes *et al.* (2008) demonstra que em tomateiro o ToYVSV prevalece na região sudeste do país, no estado de São Paulo. Essa informação é coerente com os resultados obtidos nessa dissertação que indica que o ToYVSV é mais adaptado a batateira do que ao tomateiro, uma vez que a produção de batata se concentra na região sudeste e sul (local do primeiro relato de begomovírus em batata). O ToYVSV não foi relatado em tomateiro em regiões como o nordeste, onde as condições climáticas não favorecem o cultivo da batata, sugerindo que esse vírus seja, provavelmente original de batata e que as características de polifagia do inseto vetor têm favorecido na adaptação desse vírus ao tomateiro.

Um método simples para amplificação de DNA circular usando a DNA polimerase do bacteriófago $\phi 29$, denominado de TempliPhi (Amersham Biosciences, atualmente GE), baseado na amplificação via ciclo rolante foi usado no presente trabalho como uma alternativa eficiente para clonagem do genoma completo de begomovírus. Os resultados obtidos nesse estudo comprovam que este método possibilita a clonagem a partir de pequenas quantidades de DNA viral. Uma outra vantagem é a eliminação da possibilidade de incorporação de erros encontrada em enzimas que não possuem o sistema “proof-

reading”, onde mutações são incorporadas durante a reação em métodos baseados na PCR com enzimas sem atividade de correção. Este método foi utilizado com eficiência na clonagem e caracterização do isolado Ba3. A determinação da seqüência do genoma completo de ambos os componentes (DNA-A e DNA-B) comprovou que este é tipicamente um begomovírus bipartido. A identidade de seqüências do DNA-A é menor que 88% quando comparada com qualquer outro begomovírus caracterizado até o momento, sugerindo ser uma nova espécie do gênero *Begomovirus*, nomeado como Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV). Clones infecciosos contendo 1,5 cópias do genoma foram produzidos e usados no bombardeamento de plantas cultivadas e daninhas. Os resultados demonstram que o círculo de hospedeiros desse isolado é restrito e novos testes devem ser feitos para comprovação definitiva sobre sua capacidade de infecção em determinadas hospedeiras. O estudo de pseudo-recombinação foi bastante preliminar e novos testes utilizando componentes genômicos de diferentes isolados, como TGMV, TGVV e outros, e também outras hospedeiras como *N. benthamiana* e batata são necessários para o entendimento desse mecanismo que atua como uma ferramenta importante na evolução dos begomovírus. Estudos adicionais também são necessários para esclarecer a relação entre TGVV e ToYVSV. Os resultados obtidos nessa dissertação representam informações importantes sobre as características moleculares e biológicas do ToYVSV-[Ba3] e juntamente com os próximos experimentos que continuam em andamento fornecerão subsídios para uma completa e definitiva conclusão sobre validade do Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV) como uma espécie definitiva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCOTTO, G. P., MULLINEAUX, P. M., BROWN, S. C. & MARIE, D. Digitaria streak geminivirus replicative forms are abundant in S-phase nuclei of infected cells. *Virology*. 195: 257-259. 1993.
- ACCOTTO, G.P., CASTILLO, J.N., NORIS, E., MORIONES, E. & LOURO, D. Typing of tomato yellow leaf curl viruses in Europe. *European Journal of Plant Pathology*. 106: 179-186. 2000.
- ALBERTER, B., REZAIAN, A.M. & JESKE, H. Replicative intermediates of ToLCV and its satellite DNAs. *Virology*. 331: 441-448. 2005.
- AMBROZEVICIUS, L.P., ANDRADE, E.C., ZAMBOLIM, E.M., FONTES, E.P.B. & ZERBINI, F.M. Incidence and host range of TGV-Ig, a bipartite *Begomovirus* from the "Zona Metalúrgica" of Minas Gerais, Brazil. *Virus Reviews na Research*. 4: 155. 1999.
- AMBROZEVICIUS, L.P., CALEGARIO, R.F., FONTES, E.P.B., CARVALHO, M.G. & ZERBINI, F.M. Genetic diversity of begomovirus infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira*. 27: 372-377. 2002.
- ANDRADE, E.C., AMBROZEVICIUS, L.P., CALEGARIO, R.F., FONTES, E.P.B. & ZERBINI, F.M. Molecular cloning and characterization of Tomato chlorotic mottle virus (TCMV), a new tomato-infecting begomovirus. *Virus Research*. 7:153. 2002.
- ANDRADE, E.C., MANHANI, G.G., ALFENAS, P.F., CALEGARIO, R.F., FONTES, E.P.B. & ZERBINI, F.M. Tomato Yellow spot virus, a tomato-infecting begomovirus from Brazil with a closer relationship to viruses from *Sida* sp., forms pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from *Sida*. *Journal of General Virology*. 87: 3687-3696. 2006.
- ARGUELLO-ASTORGA, GR. & RUIZ-MEDRANO, R. An iteron-related domain is associated to Motif 1 in the replication proteins of geminiviruses: identification of potential interacting amino acid-base pairs by a comparative approach. *Archives of Virology*. 146: 1465-1485. 2001.
- BALJI, S., BLACK, M.C., FRENCH, R., STENGER, D.C. & SUNTER, G. Spinach curly top virus: A newly described *Curtovirus* species from southwest Texas with incongruent gene phylogenies. *Phytopathology*. 94: 772-779. 2004.
- BEDFORD, I. D., BRIDDON, R. W., BROWN, J. K., ROSELL, R. C. & MARKHAM, P. G. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographical regions. *Annals of Applied Biology*. 125: 311:325. 1994.
- BEZERRA, I.C., LIMA, M.F., RIBEIRO, S.G., GIORDANO, L.B., ZERBINI, F.M., ÁVILA, A.C. Occurrence of geminivirus in tomato-producing areas in Submédio São Francisco. *Fitopatologia Brasileira*. 22. 331. 1997.
- BRIDDON, R.W. & STANLEY, J. Subviral agents associated with plant single-stranded DNA viruses. *Virology*. 344: 198-210. 2006.
- BRIDDON, R.W. & MARKHAM, P.G. Cotton leaf curl virus disease. *Virus Research*. 71: 151-159. 2000.
- BRIDDON, R.W. Cotton leaf curl disease, a multicomponent Begomovirus complex. *Molecular Plant Pathology*. 4: 427-434. 2003.

- BRIDDON, R.W., BEDFORD, I.D., TSAI, J.H. & MARKHAM, P.G. Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, Tomato pseudo-curly top virus, suggest a recombinant origin. *Virology* 219: 387-394. 1996.
- BRIDDON, R.W., BULL, S.E., AMIN, I., IDRIS, A.M., MANSOOR, S., BEDFORD, I.D., DHAWAN, P., RISHI, N., SIWATCH, S.S., ABDEL-SALAM, A.M., BROWN, J.K., ZAFAR, Y. & MARKHAM, P.G. Diversity of DNA- β , a satellite molecule associated with some monopartite begomoviruses. *Virology*. 312: 106-121. 2003.
- BRIDDON, R.W., BULL, S.E., AMIN, I., IDRIS, A.M., MANSOOR, S., BEDFORD, I.D., DHAWAN, P., RISHI, N., SIWATCH, S.S., ABDEL-SALAM, A.M., BROWN, J.K., ZAFAR, Y. & MARKHAM, P.G. Diversity of DNA beta, a satellite molecule associated with some monopartite begomoviruses. *Virology*. 312: 106–121. 2003.
- BRIDDON, R.W., BULL, S.E., AMIN, I., MANSOOR, S., BEDFORD, I.D., RISHI, N., SIWATCH, S.S., ZAFAR, Y., ABDEL-SALAM, A.M. & MARKHAM, P.G. Diversity of DNA 1: a satellite molecule associated with monopartite begomovirus-DNA β complexes. *Virology*. 324: 462-474. 2004.
- BRIDDON, R.W., MANSOOR, S., BEDFORD, I.D., PINNER, M.S. & MARKHAM, P.G. Clones of cotton leaf curl geminivirus induce symptoms atypical of cotton leaf curl disease. *Virus Genes*. 20: 17-24. 2000.
- BRIDDON, R.W., MANSOOR, S., BEDFORD, I.D., PINNER, M.S., SAUNDERS, K., STANLEY, J., ZAFAR, Y., MALIK, K.A. & MARKHAM, P.G. Identification of DNA components required for induction of cotton leaf curl disease. *Virology*. 285: 234-243. 2001.
- BRIDDON, R.W., PINNER, M.S., STANLEY, J. & MARKHAM, P.G. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology*. 177: 85-94. 1990.
- BROWN, J. K. The status of *Bemisia tabaci* (Genn.) as a pest and vector in world agroecosystems. *Food Agric. Plant Prot. Bull.* 42:3-32. 1994.
- BROWN, J.K. The biology and molecular epidemiology of the Geminiviridae subgroup III. In: Stancy, G.E & Keen, N.T. (Eds). *Plant-microbe interactions*. New York. ITP. pp125-196. 1997.
- CASTILLO, A.G., COLLINET, D., DERET, S., KASHOGGI, A. & BEJARANO, E.R. Dual interact of plant PCNA with geminivirus replication accessory protein (REn) ando viral replication protein (Rep). *Virology*. 312: 381-394. 2003.
- CHAKRABORTY, S., PANDEL, P. K., BANERJEE, M. K., KALLOO, G., & FAUQUET, C. M. *Tomato leaf curl Gujarat virus*, a new begomovirus species causing a severe leaf curl disease of tomato in Varanasi, India. *Virology*. 93: 1485 - 1495. 2003.
- COHEN, S. & ANTIGNUS, Y. Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), a whitefly-borne geminivirus of tomatoes. *Advances in Disease Vector Research*, New York: Springer-Verlag. 10: 259-288. 1994.
- COSTA, A.S. Whitefly-transmitted plant disease. *Annual Review of Phytopathology* . 14: 429-440. 1976.
- COSTA, A.S., OLIVEIRA, A.R. & SILVA, D.M. Transmissão mecânica do mosaico dourado do tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*. 6: 147. 1975.
- CZOSNEK, H. & LATERROT, H. A worldwide survey of tomato yellow leaf curl viruses. *Archives of Virology*. 142: 1391-1406. 1997.
- CZOSNEK, H., BER, R., NAVOT, N., ZAMIR, D., ANTIGNUS, Y. & COHEN, S. Detection of tomato yellow leaf curl virus in lysates of plant and insects by hybridization with viral DNA probes. *Plant Disease*. 72: 949-951. 1988.

- DANIELS, J., CASTRO, L.A.S. Ocorrência do vírus do mosaico deformante da batata no Rio Grande do Sul. *Fitopatologia Brasileira*. 10: 36. 1985.
- DANIELS, J.; CASTRO, L.A.S. Ocorrência do vírus do mosaico deformante da batata no Rio Grande do Sul. *Fitopatologia Brasileira*. 10: 306. 1985.
- DELLAPORTA, S.L., WOOD, J. & HICKS, J.B. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Molecular Biology reporter*. 1: 19-21. 1983.
- DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11–15. 1987.
- DRY, I.B., KRAKE, L.R., RIGDEN, J.E. & REZAIAN, M.A. A novel subviral agent associated with a geminivirus: The first report of a DNA satellite. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 7088–7093. 1997.
- ELMER J. S., SUNTER G., GARDINER W. E., BRAND L., BROWNING C. K., BISARO D. M. & ROGERS, S.G. *Agrobacterium*-mediated inoculation of plants with tomato golden mosaic virus DNAs. *Plant Molecular Biology*. 10: 225–234. 1988.
- ETESSAMI P., SAUNDERS K., WATTS J. & STANLEY J. Mutational analysis of complementary-sense genes of African cassava mosaic virus DNA A. *Journal General Virology*. 72: 1005–1012. 1991.
- FARIA, J.C., SOUZA-DIAS, J.A.C., SLACK, S. & MAXWELL, D.P. A new geminivirus associated with tomato in the state of São Paulo, Brazil. *Plant Disease*. 81: 423. 1997.
- FAUQUET, C.M., BISARO, D.M., BRIDDON, R.W., BROWN, J.K., HARRISON, B.D., RYBICKI, E.P., STENGER, D.C. & STALEY, J. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family *Geminiviridae*, and an updated list begomovirus species. *Archives of Virology*. 148: 405-421. 2003.
- FAUQUET, C.M., BRIDDON, R.W., BROWN, J.K., MORIONES, E., STANLEY, J., ZERBINI, F.M. & ZHOU, X. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. DOI 10.1007/s00705-008-0035-6
- FAUQUET, C.M., MAXWELL, D.P., GRONENBORN, B. & STANLEY, J. Revised proposal for naming geminiviruses. *Archives of Virology*. 145: 1743-1761. 2000.
- FERNADES, J.J., CARVALHO, M.G., ANDRADE, E.C., BROMMONSCHENKEL, S.H., FONTES, E.P.B. & ZERBINI, F.M. Biological and molecular properties of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brasil. *Plant Pathology*. 55(4): 513–522. 2006.
- FERNANDES, F.R., ALBUQUERQUE, L.C., GIORDANO, L.B., BOITEUX, L.S., ÁVILA, A.C. & INOUE-NAGATA, A.K. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Gene*. 36: 251-258. 2008.
- FLORES, E., SILBERSCHMIDT, K. & KRAMER, M. Observações de “clorose infecciosa” das malváceas em tomateiros do campo. *O Biológico*. 26: 65-69. 1960.
- FONTENELLE, M.R., LUZ, D.F., GOMES, A.P.S., FLORENTINO, J.H., ZERBINI, F.M. & FONTES, E.P.B. Functional analysis of the naturally recombinant DNA-A of the bipartite begomovirus Tomato Chlorotic mottle virus. *Virus Research*. 126: 262-267. 2007.
- FRANÇA, F.H., VILLAS-BOAS, G.L. & BRANCO, M.C. Ocorrência de Bemisia argentifolii Bellows & Perring (Homóptera: Aleyrodidae) no Distrito Federal. *Annal of the Society of Entomology of Brasil*. 25: 369-372. 1996.

- FRISCHMUTH, T., ZIMMAT, G. & JESKE, H. The nucleotide sequence of *Abutilon mosaic virus* reveals prokaryotic as well as eukaryotic features. *Virology*. 178: 461-468. 1990.
- GAFNI, Y. & B. L. EPEL. The role of host and viral proteins in intra- and intercellular trafficking of geminiviruses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 60: 231-241. 2002.
- GALLITELLI, D., LUISONI, E., MARTINELLI, G.P., CACIAGLI, P., MILNE, R.G., ACCOTTO, G.P. & ANTIGNUS, Y. Tomato yellow leaf curl disease in Sardinia. *Informatore Fitopatologico* 41 (7-8): 42-46. 1991.
- GALVÃO, R.M., MARIANO, A.C., LUZ, D.F., ALFENAS, P.F., ANDRADE, E.C., ZERBINI, F.M., ALMEIDA, M.R. & FONTES, E.P.B. A naturally occurring recombinant DNA-A of a typical bipartite begomovirus does not require the cognate DNA-B to infect *Nicotiana benthamiana* systemically. 84: 715-726. 2003.
- GALVÃO, R.M., FERNANDES, A.V., ALMEIDA, J.D., ALFENAS, P.F., ANDRADE, E.C. & FONTES, E.P.B. Molecular characterization of two new tomato-infecting geminiviruses and the Sida-infecting geminiviruses complex from Brazil. Abstract of the 2nd International Workshop on Bemisia and Geminiviral Disease. Abstract L-93, San Juan-Puerto Rico, 7-12 de junho de 1998.
- GARDINER, W.E., SUNTER, G., BRAND, L. ELMER, J.S., ROGERS, S.G. & BISARO, D.M. Genetic analysis of Tomato golden mosaic virus: the coat protein is not required for systemic spread or symptom development. *The EMBO Journal*. 7(4): 899-904. 1988.
- GARRIDO-RAMIREZ, E.R., SUDARSHANA, M. & GILBERTSON, R.L. *Bean golden mosaic virus* from chiapas, Mexico: characterization, pseudorecombination with other bean-infecting geminiviruses and germ plasm screening. *Phytopathology*. 90: 1224-1232. 2000.
- GHANIM, M., MORIN, S. & CZOSNEK, H. Rate of *Tomato yellow leaf curl virus* translocation in the circulative transmission pathway of its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Phytopathology*. 91: 188-196. 2001.
- GHANIM, M., MORIN, S., ZEIDAN, M & CZOSNEK, H. Evidence for transovarial transmission of Tomato yellow leaf curl virus by its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Virology*. 240: 295-303. 1998.
- GILBERTSON, R.L., FARIA, J.C., HANSON, S.F., MORALES, F.J., AHLQUIST, P., MAXWELL, D.P. & RUSSEL, D.R. Cloning of the complete DNA genomes of four bean-infecting geminiviruses and determining their infectivity by electric discharge particle acceleration. *Phytopathology*. 81: 980-985. 1991.
- GILBERTSON, R.L., HIDAYAT, S.H., PAPLOMATAS, E.J., ROJAS, M.R., HOU, Y.M. & MAXWELL, D.P. Pseudorecombination between infectious cloned DNA component of tomato mottle and bean dwarf mosaic geminiviruses. *Journal of General Virology*. 74: 23-31. 1993.
- GONZALES, A.G. & VALDÉS, R.S. Virus del encrespamiento amarillo de las rojas del tomate (TYLCV) en Cuba. *CEIBA* 36: 103. 1995.
- GOU, X. & ZHOU, X. Molecular characterization of a new begomovirus infecting *Sida cardifolia* and its associated satellite DNA molecules. *Virus Gene*. 33: 279-285. 2006.
- GRONENBORN, B. Nanoviruses: genome organisation and protein function. *Veterinary Microbiology*. 98: 103-109. 2004.

- GRONENBORN, B. Nanoviruses: genome organisation and protein function. *Vet. Microbiol.* 98: 103–109. 2004
- GUTIERREZ, C. Geminivirus DNA replication. *Cell. Mol. Life Sci.* 56: 313–329. 1999.
- GUTIERREZ, C. Geminivirus DNA replication. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 56: 313–329. 1999.
- GUTIERREZ, C. Geminiviruses and the plant cell cycle. *Plant Molecular Biology.* 43: 763–772. 2000.
- GUTIERREZ, C. Strategies for geminivirus DNA replication and cell cycle interference. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 60: 219–230. 2002.
- GUTIERREZ, C., RAMIREZ-PARRA, E., CASTELLANO, M.M., SANZ-BURGO, A.P., LUQUE, A. & MISSICH, R. Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. *Veterinary Microbiology.* 98: 111–119. 2004.
- HAMILTON, W.D.O., STEIN, V.E., COUTTS, R.H.A. & BUCK, K.W. Complete nucleotide sequence of the infections cloned DNA components of tomato golden mosaic virus: potential coding regions and regulatory sequence. *The EMBO Journal.* 3: 2197–2205. 1984.
- HANLEY-BOWDOIN, L., SETTLAGE, S.B., OROZCO, B.M., NAGAR, S. & ROBERTSON, D. Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 35: 105–140. 1999.
- HANLEY-BOWDOIN, L., SETTLAGE, S.B., OROZCO, B.M., NAGAR, S. & ROBERTSON, D. Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription and cell cycle regulation. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18: 71–106. 1999.
- HOU, YU-MING. & GILBERTSON, R. L. Increased pathogenicity in a pseudorecombinant bipartite geminivirus correlates with intermolecular recombination. *Journal of Virology.* 70 (8) 5430–5436. 1996.
- IDRIS, A.M. & BROWN, J.K. Molecular analysis of cotton leaf curl virus Sudan reveals an evolutionary history of recombination. *Virus Genes* 24: 249–256. 2002.
- INOUE-NAGATA, A.K., NAGATA, T., MIRANDA, J.D.R., BEZERRA, I.C., RIBEIRO, S.G. & DE ÁVILA, A.C. Expression of the coat protein of tomato infecting geminivirus in *Escherichia coli* for serological studies. *Virus Rev. Res.* 4: 151. 1999.
- INOUE-NAGATA, A.K., NAGATA, T., RIBEIRO, S.G., BEZERRA, I.C., GIORDANO, L.B. & DE ÁVILA, A.C. Comparison of the coat protein cistron of geminiviruses from distinct hosts. *Fitopatologia Brasileira.* 26: 527. 2001.
- ISNARD, M., GRANIER, M., FRUTOS, R., REYNAUD, B. & PETERSCHMITT, M. Quasispecies nature of three maize streak virus isolates obtained through different modes of selection from a population used to assess response to infection of maize cultivars. *Journal of General Virology.* 79: 3091–3099. 1998.
- JEBBOUR, F. Situation du TYLCV au Maroc et les methods du diagnostics utilises. Abstract of the EPPO Workshop on TYLCV, Faro, Portugal. P. 3. 2001.
- JUPIN, I., DE KOUCHKOVSKY, F., JOUANNEAU, F. & GRONENBORN, B. Movement of tomato yellowleaf curl geminivirus (TYLCV): involvement of the protein encoded by ORF C4. *Virology.* 204: 82–90. 1994.
- KANEVSKI, I. F., THAKUR, S., COSOWSKY, L., SUNTER, G., BROUGH, C., BISARO, D. & MALIGA, Tobacco lines with high copy number of replicating recombinant geminivirus vectors after biolistic DNA delivery. *Plant Journal.* 2: 457–463. 1992.

- KIRTHI, N., PRIYADARSHINI, C.G.P., SHARMA, P., MAIYA, S.P., HEMALATHA, V., SIVARAMAN, P., HAWAN, P., RISHI, N. & SAVITHRI, H.S. Genetic variability of begomoviruses associated with cotton leaf curl disease originating from India. *Archives of Virology*. 149: 2047-2057. 2004.
- KUMAR, S., TAMURA, K. & NEI, M. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*. 5: 150-153. 2004.
- KUNIK, T., K. PALANICHELVAM, H., CZOSNEK, V., CITOVSKY & GAFNI, Y. Nuclear import of the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in plant and insect cells. *Plant Journal*. 13(3): 393-9. 1998.
- LAZAROWITZ, S.G. Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 11: 327-349. 1992.
- LIN, B., BEHJATNIA, S.A.A., DRY, I.B., RANDLES, J.W. & REZAIAN, M.A. High-affinity Rep-binding is not required for the replication of a geminivirus DNA and its satellite. *Virology*. 305: 353-363. 2003.
- LIU, H., BOULTON, M.I., THOMAS, C.L., PRIOR, D.A.M., OPARKA, K.J. & DAVIES, J.W. Maize streak virus coat protein is kariophyllic and facilitates nuclear transport of viral DNA. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 12 (10): 894-900. 1999.
- LIU, L., VAN TONDER, T., PIETERSEN, G., DAVIES, J.W. & STANLEY, J. Molecular characterization of a subgroup I geminivirus from a legume in South Africa. *Journal of General Virology*. 78: 2113-2117. 1997.
- LIU, Y., ROBINSON, D.J. & HARRISON, B.D. Defective forms of cotton leaf curl virus DNA-A that have different combinations of sequence deletion, duplication, inversion and rearrangement. *Journal of General Virology*. 79: 1501-1508. 1998.
- LOURENÇÃO, A.L. & NAGAI, H. Surtos populacionais de Bemisia tabaci no estado de São Paulo. *Bragantia*. 53: 53-59. 1994.
- MANKERTZ, A., CALISKAN, R., HATTERMANN, K., HILLENBRAND, B., KURZENDOERFER, P., MUELLER, B., SCHMITT, C., STEINFELDT, T. & FINSTERBUSCH, T. Molecular biology of Porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication. *Vet. Microbiol*. 98: 81-88. 2004.
- MANSOOR, S., BRIDDON, R.W., BULL, S.E., BEDFORD, I.D., BASHIR, A., HUSSAIN, M., ZAFAR, M.Y., MALIK, K.A., FAUQUET, C. & MARKHAM, P.G. Cotton leaf curl disease is associated with multiple monopartite begomoviruses supported by single DNA β . *Archives of Virology*. 148: 1969-1986. 2003.
- MANSOOR, S., BRIDDON, R.W., ZAFAR, Y. & STANLEY, J. Geminivirus disease complexes: an emerging threat. *Trends Plant Sci*. 8: 128-134. 2003.
- MANSOOR, S., KHAN, S.H., BASHIR, A., SAEED, M., ZAFAR, Y., MALIK, K.A., BRIDDON, R.W., STANLEY, J. & MARKHAM, P.G. Identification of a novel circular single-stranded DNA associated with cotton leaf curl disease in Pakistan. *Virology*. 259: 190-199. 1999.
- MARTIN, D.P., WILLMENT, J.A. & RYBICKI, E.P. Evaluation of maize streak virus pathogenicity in differentially resistant *Zea mays* genotypes. *Phytopathology* 89: 695-700. 1999.
- MATYIS, J.C., SILVA, D.M., OLIVEIRA, A.R. & COSTA, A.S. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. *Summa Phytopathologica*. 1: 267-275. 1975.

- MAYO, M.A., LEIBOWITZ, M.J., PALUKAITIS, P., SCHOLTHOF, K.-B.G., SIMON, A.E., STANLEY, J. & TALIANSKY, M. Satellites. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.), VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy. Elsevier/Academic Press, London, 2005. pp. 1163–1169.
- McGLASHAN, D., POLSTON, J. E. & BOIS, D. Tomato leaf curl virus in Jamaica. *Plant Disease*. 78: 1219. 1994.
- MELO, P.C.T. Mosca branca ameaça produção de hortaliças. Campinas: Asgrow Sementes. Informe Técnico. 1992.
- MOFFAT, A.S. Geminiviruses emerge as serious crop threat. *Science*. 286: 1835. 1999.
- MONCI, F., SANCHEZ-CAMPOS, S., NAVAS-CASTILLO, J. & MORIONES, E. A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish population. *Virology* 303: 317–326. 2002.
- MORALES, F.G. & JONES, P.G. The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. *Virus Research*. 100: 57-65. 2004.
- MORALES, F.J. & ANDERSON, P.K. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology*. 146: 415-441. 2001.
- MORIN, S., GHANIM, M., ZEIDAN, M., CZOSNEK, H., VERBEEK, M. & VAN DEN HEUVELT, F.J.M. A GroEL homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl. *Virology*. 256: 75-85. 1999.
- MORRIS, B.A., RICHARDSON, K.A., HALEY, A., ZHAN, Z. & THOMAS, J.E. The nucleotide sequence of the infectious cloned DNA component of Tobacco yellow dwarf virus reveals features of geminiviruses infecting monocotyledonous plant. *Virology*. 187: 663-642. 1992.
- NAGAR, S., PEDERSEN, T.J., CARRICK, K.M., HANLEY-BAWDOIN, L. A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. *The Plant Cell*. 7: 705-719. 1995.
- NATESHAN, H. M., MUNIYAPPA, V., SWANSON, M.M. & HARRISON, B.D. Host range, vector and serological relationships of cotton leaf curl virus from southern India. *Annual Applied Biology*. 128: 233-244. 1996.
- NAVAS-CASTILLO, J., SANCHEZ-CAMPOS, S., NORIS, E., LOURO, D., ACCOTTO, G. P. & MORIONES, E. Natural recombination between *Tomato yellow leaf curl virus*-Is and *Tomato leaf curl virus*. *J. Gen. Virol.* 81: 2797–2801. 2000.
- NOUEIRY, A. O., LUCAS, W. J. & GILBERTSON, R. L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell* 76(5): 925-32. 1994.
- PADIDAM, M., BEACHY, R.N. & FAUQUET, C.M. The role of AV2 (“precoat”) and coat protein in viral replication and movement in tomato leaf curl geminivirus. *Virology*. 224: 390-404. 1996.
- PADIDAM, M., BEACHY, R. N. & FAUQUET, C. M. Tomato leaf curl geminivirus from India has a bipartite genome and coat protein is not essential for infectivity. *Journal of General Virology*. 76: 25-35. 1995a.
- PADIDAM, M., BEACHY, R.N. & FAUQUET, C.M. Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. *Journal of General Virology*. 76: 249-263. 1995b.

- PADIDAM, M., SAWYER, S. & FAUQUET, C.M. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology*. 265: 218-225. 1999.
- PALMER, K.E. & RYBICKI, E.P. The molecular biology of mastreviruses. *Adv. Virus Res.* 50: 183-234. 1998.
- PASCAL, E., SANDERFOOT, A. A., WARD, B. M., MEDVILLE, R., TURGEON, R. & LAZAROWITZ, S. G. The geminivirus BR1 movement protein binds single-stranded DNA and localizes to the cell nucleus. *Plant Cell*. 6(7): 995-1006. 1994.
- PATEL, V.P., ROJAS, M.R., PAPLOMATAS, E.J. & GILBERTSON, R.L. Cloning biologically active geminivirus DNA using PCR and overlapping primers. *Nucleic Acids Res.* 11, 1325-1326. 1993.
- PEDERSEN, T.J. & HANLEY-BOWDOIN, L. Molecular characterization of the AL3 protein encoded by a bipartite geminivirus. *Virology*. 202: 1070-1075. 1994.
- PERRING, TM., COOPER, A.D., RODRIGUEZ, R.J. FARRAR, C.A. & BELLOWS, T.S. Identification of a whitefly species by genomic and behavioral studies. *Science*. 259: 74-77. 1993.
- PILARTZ, M. & H. JESKE. Abutilon mosaic geminivirus double-stranded DNA is packed into minichromosomes. *Virology*. 189(2): 800-2. 1992.
- PITA, J.S., FONDONG, V.N., SANGARÉ, A., OTIM-NAPE, G.W., OGWAL, S. & FAUQUET, C.M. Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. *Journal General of Virology*. 85: 655-665. 2001.
- POLIZZI, G. & AREDDIA, R. Yellow leaf curl of tomato in Calabria. *Informatore Fitopatologico*. 42 (10): 47- 49 (in Italian). 1992.
- POLSTON, J.E. & ANDERSON, P.K. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the Western Hemisphere. *Plant Disease*. 81: 1358-1369. 1997.
- POLSTON, J.E., MACGOVERN, R.J. & BROWN, L.G. Introduction of tomato yellow leaf curl virus in Florida and implications for the spread of this and other geminiviruses in tomato. *Plant Disease* . 83: 984-988. 1999.
- POOMA, W., GILLETTE, W.K., JEFFREY, J.L. & PETTY, I.T.D. Host and viral factors determine the dispensability of coat protein for bipartite geminivirus systemic movement. *Virology*. 218: 264-268. 1996.
- POSTON, J.E., CHELLEMI, D.O., SCHUSTER, D.R., McGOVERN, R.J. & STANSLY, P.A. Spacial and temporal dynamics of tomato mottle geminivirus and *Bemisia tabaci* (Genn.) in Florida tomato fields. *Plant disease*. 80: 1022-1028. 1996.
- RAMOS, P. L., GUEVARA-GONZ´ALEZ, R. G., PERAL, R., ASCENCIO-IBANEZ, J. T., POLSTON, J. E., ARGUELLO-ASTORGA, G. R., VEGA-ARREGUÍN, J. C., & RIVERA-BUSTAMANTE, R. F. *Tomato mottle Taino virus* pseudorecombines with PYMV but not with ToMoV: Implications for the delimitation of *cis*- and *trans*-acting replication specificity determinants. *Archives Virology*. 148: 1697-1712. 2003.
- RESENDE, E.A., FILGUEIRA, R.A.R., ZERBINI, F.M., ZAMBOLIM, E.M. & FERNANDES, J.J. Tomato infected with geminivirus under greenhouse conditions at Uberlândia-MG, Brasil. *Fitopatologia Brasileira*. 21 (Supl.): 424. 1996.
- RIBEIRO, S.G., AMBROZEVICIUS, L.P., ÁVILA, A.C., BEZERRA, I.C., CALAGARIO, R.F., FERNANDES, J.J., LIMA, M.F., MELLO, R.N., ROCHA, H. & ZERBINI, F.M. Distribution and genetic diversity of tomato-infcting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology*. 148: 281-295. 2003.

- RIBEIRO, S.G., AMBROZEVIĆIUS, L.P., ÁVILA, A.C., BEZERRA, I.C., CALEGARIO, R.F., FERNANDES, J.J., LIMA, M.F., MELLO, R.N., ROCHA, H. & ZERBINI, F.M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brasil. *Archives of Virology*. 148: 281-295. 2002.
- RIBEIRO, S.G., BEZERRA, I.C., LIMA, L.F., ÁVILA, A.C. & GIORDANO, L.B. Occurrence of geminivirus in tomato plants in Bahia. VIII Encontro Nacional de Virologia, São Lourenço, MG. p290. 1996.
- RIBEIRO, S.G., INOUE-NAGATA, A.K., DANIELS, J. & ÁVILA, A.C. Potato deforming mosaic disease is caused by an isolate of Tomato yellow vein streak virus. *Plant Pathology*. 55:569. 2006.
- RIBEIRO, S.G., MARTIN, D.P., LACORTE, C., SIMÕES, I.C., ORLANDINI, D.R.S. & INOUE-NAGATA, A.K. Molecular characterization of Tomato chlorotic mottle virus suggests that recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses. *Virology*. 97(6) 702-711. 2007.
- RIBEIRO, S.G., MELLO, L.V., BOITEUX, L.S., KITAJIMA, E.W., FARIA, J.C. Tomato infection by a geminivirus in the Federal District, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*. 19: 330. 1994.
- RIBEIRO, S.G.; INOUE-NAGATA, A.K.; DANIELS, J.; AVILA, A.C. Potato deforming mosaic disease is caused by an isolate of Tomato yellow vein streak virus. *Plant Pathology*. 55: 569. 2006.
- RIGDEN, J.E., KRAKE, L.R., REZAIAN, M.A. & DRY, I.B. ORF C4 of tomato leaf curl geminivirus is a determinant of symptom severity. *Virology*. 204: 847-850. 1994.
- ROJAS, M.R., GILBERTSON, R.L., RUSSEL, D.R. & MAXWELL, D.P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease*. 77: 340-347. 1993.
- ROJAS, M.R., HAGEN, C., LUCAS, W.J. & GILBERTSON, R.L. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology*. 43: 16.1-16.39. 2005.
- ROJAS, M.R., NOUEIRY, A.O., LUCAS, W.J. & GILBERTSON, R.L. Bean dwarf mosaic geminivirus movement proteins recognize DNA in form- and Size-specific manner. *Cell*. 95: 105-113. 1998.
- ROOSSINCK, M. J. Mechanisms of plant virus evolution. *Annual review of phytopathology*. 35: 191-209. 1997.
- ROSSEL, R.C., TORREZ-JEREZ, I. & BROWN, J.K. Tracing the geminivirus-whitefly transmission pathway by polymerase chain reaction in whitefly extracts, saliva, hemolymph and honeydew. *Phytopathology*. 89: 239-246.1999.
- RUBINSTEIN, G. & CZOSNESK, H. Long-term association of Tomato yellow leaf curl virus with its whitefly vector *Bemisia tabaci*: Effects on insects transmission, capacity, longevity and fecundity. *Journal of General Virology*. 78: 2683-2689. 1997.
- RYBICKI, E.P. A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of *Geminiviridae*. *Archives of Virology*. 134: 49-77. 1994.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, (2nd Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- SANDERFOOT, A. A. & LAZAROWITZ, S. G. Cooperation in Viral Movement: The Geminivirus BL1 Movement Protein Interacts with BR1 and Redirects It from the Nucleus to the Cell Periphery. *Plant Cell* 7(8): 1185-1194. 1995.

- SANDERFOOT, A. A. & LAZAROWITZ, S. G. Getting it together in plant virus movement: cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. *Trends Cell Biol* 6(9): 353-8. 1996.
- SANDERFOOT, A. A., INGHAM, D. J. & LAZAROWITZ, S. G. (1996). A viral movement protein as a nuclear shuttle. The geminivirus BR1 movement protein contains domains essential for interaction with BL1 and nuclear localization. *Plant Physiology*. 110(1): 23-33. 1996.
- SANTANA, F.M., INOUE-NAGATA, A.K., NAGATA, T., RIBEIRO, S.G., ÁVILA, A.C. & GIORDANO, L.B. Detecção de begomovírus em amostras foliares de tomateiro com sondas não radioativas. *Ciência Rural*. 37: 269-272. 2007.
- SANTOS, C.D.G., ÁVILA, A.C. & RESENDE, R.O. Estudo da interação de um begomovírus isolado de tomateiro com mosca branca. *Fitopatologia Brasileira*. 28: 664-673. 2003.
- SANZ, A. I., FRAILE, A., GARCÍA-ARENAL, F., ZHOU, X., ROBINSON, D. J., KHALID, S., BUTT, T. & HARRISON, B. Multiple infection, recombination and genome relationships among begomovirus isolates found in cotton and other plants in Pakistan. *Journal General Virology*. 81: 1839-1849. 2000.
- SAUNDERS, K. & STANLEY, J. A nanovirus-like component associated with yellow vein disease of *Ageratum* yellow vein disease of *Ageratum conyzoides*: evidence for interfamilial recombination between plant disease plant DNA viruses. *Virology*. 264: 142-152. 1999.
- SAUNDERS, K. & STANLEY, J. A Nanovirus-like DNA component associated with Yellow vein disease of *Ageratum conyzoides*: Evidence of interfamilial recombination between plant DNA viruses. *Virology*. 264: 142-152. 1999.
- SAUNDERS, K., BEDFORD, I.D., BRIDDON, R.W., MARKHAM, P.G., WONG, S.M. & STANLEY, J. A novel virus complex causes *Ageratum* yellow vein disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: 6890-6895. 2000.
- SAUNDERS, K., NORMAN, A., GUCCIARDO, S. & STANLEY, J. The DNA β satellite component associated with *ageratum* yellow vein disease encodes an essential pathogenicity protein (β C1). *Virology*. 324: 37-47. 2004.
- SAUNDERS, K., SALIM, N., MALI, V. R., MALATHI, V. G., BRIDDON, R., MARKHAM, P. G., & STANLEY, J. Characterization of *Sri Lankan cassava mosaic virus* and *Indian cassava mosaic virus*: Evidence for acquisition of a DNA B component by a monopartite begomovirus. *Virology*. 293: 63 - 74. 2002.
- SEAL, S. E., VANDERBOSCH, F. & JEGER, M. J. Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: implications for sustainable control. *Critical Reviews in Plant Science*. 25: 23-46. 2006.
- SELTH, L.A., RANGLES, J.W. & REZAIAN, M.A. *Agrobacterium tumefaciens* supports DNA replication of diverse geminivirus types. *FEBS Lett*. 516: 179-182. 2002.
- SETTLAGE, S., MILLER, A. & HANLEY-BOWDOIN, L. Interactions between geminivirus replication proteins. *Journal Virology*. 70: 6790-6795. 1996.
- SETTLAGE, S.B., MILLER, A.B., GRUISSEM, W. & HANLEY-BOWDOIN, L. Dual interaction of a geminivirus replication accessory factor with a viral replication protein and a plant cell cycle regulator. *Virology*. 279: 570-576. 2001.
- SHARP, L. P., HOU, Y.M., GARRIDO-RAMIREZ, E. R., GUZMAN, P. & GILBERTSON, R. L. A synergistic interaction between geminivirus DNA component

- results in increased symptom severity and viral DNA levels in plants. (Abstract) *Phytopathology*. 89:S71. 1999.
- SOUZA-DIAS, J.A.C., SAWASAKI, H.E. & SANTINI, A. Plantios sucessivo de batata e tomate na região de Sumaré, SP favorece a presença do Tomato yellow vein streak geminivirus (ToYVSV) e da mosca branca vetora. *Fitopatologia Brasileira*. 28: 372. 2003.
- SOUZA-DIAS, J.A.C.; SAWASAKI, H.E.; SANTINI, A. Plantio sucessivo de batata e tomate na região de Sumaré, SP favorece a presença do Tomato yellow vein streak geminivirus (ToYVSV) e da mosca branca vetora. *Fitopatologia Brasileira*. 28: 372. 2003
- SRIVASTAVA, K.M., HALLAN, V., RAIZADA, R.K., CHANDRA, G., SINGH, B.P. & SANE, P.V. Molecular cloning of Indian tomato leaf curl virus genome following a simple method of concentrating the supercoiled replicative form of viral DNA. *Journal Virological Methods*. 51: 297–304. 1995.
- STADEN, R. The Staden Sequence Analysis Package. *Molecular Biotechnology*. 5: 233-241. 1996
- STANLEY, J. Subviral DNAs associated with geminivirus disease complexes. *Vet. Microbiol*. 98: 121–129. 2004.
- STANLEY, J. Subviral DNAs associated with geminivirus disease complexes. *Veterinary Microbiology*. 98: 121-129. 2004.
- STANLEY, J., SAUNDERS, K., PINNER, M.S. & WONG, S.M. Novel defective interfering DNAs associated with ageratum yellow vein geminivirus infection of *Ageratum conyzoides*. *Virology*. 239: 87– 96. 1997.
- STANLEY, J., TOWNSEND, R., & CURSON, S. J. Pseudorecombinants between cloned DNAs of two isolates of cassava latent virus. *Journal General Virology*. 66: 1055 - 1061. 1985.
- SUNTER, G. & BISARO, D.M. Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. *The Plant Cell*. 4: 1321-1333. 1992.
- SUNTER, G., SUNTER, J. & BISARO, D.M. Plants expressing Tomato golden mosaic virus *AL2* or Beet curly top virus *L2* transgenes show enhanced susceptibility to infection by DNA and RNA viruses. *Virology*. 285: 59-70. 2001.
- TAN, P.H.N., WONG, S.M., WU, M., BEDFORD, I.D., SAUNDERS, K. & STANLEY, J. Genome organization of *Ageratum* yellow vein virus, a monopartite whitefly-transmitted geminivirus isolated from a common weed. *Journal of General Virology*. 76: 2915–2922. 1995.
- TAO, X.R., QING, L. & ZHOU, X.P. Function of A-Rich region in DNA associated with *Tomato yellow leaf curl China virus*. *Chinese Science Bulletin*. 49 (14): 1490-1493. 2004.
- TIMCHENKO, T., KATUL, L., SANO, Y., KOUCHKOVSKY, F., VETTEN, H.J. & GRONENBORN, B. The master Rep concept in nanovirus replication: identification of missing genome components and potential for natural genetic reassortment. *Virology*. 274: 189-195. 2000.
- TIMMERMANS, M. C. P., DAS, O. P. & MESSING, J. Geminiviruses and their uses as extrachromosomal replicons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 79-112. 1994.

- UMAHARAN, P., PADIDAM, M., PHELPS, R. H., BEACHY, R. N. & FAUQUET, C. M. Distribution and diversity of geminiviruses in Trinidad and Tobago. *Phytopathology*. 88: 1262-1268. 1998.
- UNSELD, S., FRISCHMUTH, T. & JESKE, H. Short deletions in nuclear targeting sequences of African cassava mosaic virus coat protein prevent geminivirus twinned particle formation. *Virology*. 318: 90-101. 2004.
- VANITHARANI, R., CHELLAPPAN, P., PITA, J.S. & FAUQUET, C. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *Journal Virology*. 78: 9487-9498. 2004.
- VARMA, A. & MALATHI, V.G. Emerging geminivirus problems: A serious threat to crop production. *Ann. appl. Biol.* 142: 145-164. 2003.
- VARMA, A., DHAR, A. K. & MANDAL, B. 1992. MYMV transmission and control in india. Mungbean yellow mosaic disease: Proceedings of an International Workshop, Asian Vegetable Research and Development Center, Taipei. pp. 8-27. 1992.
- WANG, H., HAO, L., SHUANG, C., SUNTER, G. & BISARO, D.M. Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. *The Plant Cell*. 15: 3020-3032. 2003.
- WEZEL, R.V., DONG, X., BLAKE, P., STANLEY, J. & HONG, Y. Differential roles of geminivirus Rep and AC4 (C4) in the induction of necrosis in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant Pathology*. 3: 461-471. 2002.
- ZEIDAN, M & CZOSNEK, H. Acquisition of tomato yellow leaf curl virus by the whitefly *Bemisia tabaci*. *Journal of General Virology*. 72: 2607-2614. 1991.
- ZERBINI, F.M., ZAMBOLIM, E.M., FERNANDES, J.J., GILBERTSON, R.L. & CARRIJO, I.V. Geminivírus isolado de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* L.) em Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira*. 21 (Supl.): 430. 1996.
- ZHOU, X., LIU, Y., CALVERT, L., MUNOZ, D., OTIM-NAPE, G. W., ROBINSON, D. J. & HARRISON, B. D. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *Journal of General Virology*. 78: 2101-2111. 1997.
- ZHOU, X., LIU, Y., ROBINSON, D.J. & HARRISON, B.D. Four DNA-A variants among Pakistani isolates of cotton leaf curl virus and their affinities to DNAA of geminivirus isolates from okra. *Journal of General Virology*. 79: 915-923. 1998.
- ZHOU, X., XIAORONG, Y.X., ZHANG, Z., LI, Z. & FAUQUET, C.M. Characterization of DNA β associated with begomovirus in China and evidence for co-evolution with their cognate viral DNA-A. *Journal of General Virology*. 84: 237-247. 2003.