

FERNANDA RAUSCH FERNANDES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOLÓGICA DE BEGOMOVÍRUS DE
SOJA (*Glycine max*) E LEITEIRO (*Euphorbia heterophylla*)
E RESISTÊNCIA A VÍRUS MEDIADA POR RNA INTERFERENTE
EM PLANTAS TRANSGÊNICAS DE SOJA**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009**

FERNANDA RAUSCH FERNANDES

Caracterização molecular e biológica de begomovírus de soja (*Glycine max*) e leiteiro (*Euphorbia heterophylla*) e resistência a vírus mediada por RNA interferente em plantas transgênicas de soja

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

APROVADA: 02 de março de 2009

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros

Profa. Claudine Márcia Carvalho

Pesq. Poliane Alfenas Zerbini
(Co-orientadora)

Pesq. Francisco José de Lima Aragão
(Co-orientador)

Prof. Francisco Murilo Zerbini Junior
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar os meus caminhos...

Aos meus pais por todo o amor e por sempre terem respeitado as minhas escolhas.

Aos meus irmãos por acreditarem em mim e pelo carinho sempre!

Ao Grazian por ter compartilhado comigo parte desta trajetória.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do curso.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos membros da banca examinadora pelas valiosas sugestões.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por ter disponibilizado suas instalações para a execução do trabalho.

Com muito respeito e admiração ao Dr. Francisco José de Lima Aragão pela orientação, apoio, confiança, amizade, positivismo contagiante e pelo exemplo de dedicação científica.

Ao professor Dr. Francisco Murilo Zerbini Junior pelo apoio, orientação e, sobretudo, pela confiança.

Aos pesquisadores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, especialmente ao Dr. Giovanni Vianna pelos aconselhamentos e ajuda sempre disponíveis.

À pesquisadora Dra. Alice Nagata pelo apoio, conselhos, ensinamentos e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Transferência de Genes da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, por todas as trocas de experiências e pelos momentos de descontração. Aos técnicos Elsa, Luís e Warley pelo apoio para a realização deste trabalho e à amizade durante este tempo.

À minha amiga Andréia, por toda a amizade e apoio no laboratório, minha gratidão pela ajuda incondicional.

À minha amiga-irmã Sônia, pela amizade maravilhosa que temos.

Aos amigos da Pós-Graduação em Fitopatologia da UFV, por todos os momentos compartilhados durante as disciplinas.

Aos amigos do Laboratório de Genômica do BIOAGRO/UFV, por todos os momentos de cumplicidade, amizade e convivência compartilhados.

Aos colegas estudantes da UFV do Laboratório de Virologia Vegetal Molecular.

Às queridas Aline, Nádia e Angélica, pelos momentos alegres compartilhados na convivência de república em Viçosa.

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

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	ix
Introdução Geral.....	1
Revisão de Literatura	5
1. Gênero <i>Begomovirus</i> : aspectos na cultura da soja e em plantas daninhas	5
1.1. Família <i>Geminiviridae</i>	5
1.2. Infecção por begomovírus na cultura da soja	10
1.3. Infecção por begomovírus em plantas invasoras no Brasil	12
2. Gênero <i>Potyvirus</i> : aspectos na cultura da soja	16
2.1. Família <i>Potyviridae</i>	16
2.2. <i>Soybean mosaic virus</i> (SMV) na cultura da soja.....	18
3. Gênero <i>Carlavirus</i> : aspectos na cultura da soja.....	20
3.1. Família <i>Flexiviridae</i>	20
3.2. <i>Cowpea mild mottle virus</i> (CPMMV) na cultura da soja	22
4. Resistência a vírus mediada por RNA interferente	25
Literatura Citada	35
Capítulo 1. Three distinct begomoviruses associated with soybean in Central Brazil	55
Summary.....	57
References.....	65
Figure legends	72

Capítulo 2. Molecular characterization of a new isolate of Euphorbia mosaic Peru virus (EuMPV) infecting <i>Euphorbia heterophylla</i> in Central Brazil	75
Summary	77
Introduction	78
Materials and Methods	80
Results and Discussion	82
References	84
Figure legends	97
Capítulo 3. Obtenção de plantas transgênicas de soja visando resistência múltipla a vírus	101
Introdução	102
Material e Métodos	106
Resultados	113
Discussão	115
Literatura Citada	118

RESUMO

FERNANDES, Fernanda Rausch, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, março de 2009. **Caracterização molecular e biológica de begomovírus de soja (*Glycine max*) e leiteiro (*Euphorbia heterophylla*) e resistência a vírus mediada por RNA interferente em plantas transgênicas de soja.** Orientador: Francisco Murilo Zerbini Júnior. Co-orientadores: Francisco José de Lima Aragão e Poliane Alfenas Zerbini.

A caracterização molecular de begomovírus é um aspecto de crucial importância para a compreensão dos mecanismos de variabilidade destes fitopatógenos. A análise dos genomas permite a compreensão da contribuição dos mecanismos de mutação e recombinação para a evolução de novas espécies de geminivírus. No Brasil, poucos relatos de ocorrência de begomovírus na cultura da soja foram registrados até o presente. Amostras de folhas de soja com sintomas claros da infecção por vírus foram obtidas em campo de produção de soja em Santo Antônio de Goiás (GO) e analisadas quanto à presença de begomovírus. Após a confirmação da infecção viral via PCR, os genomas completos foram amplificados a partir das amostras infectadas por meio de RCA (*rolling circle-amplification*). Os clones obtidos foram seqüenciados e a análise das seqüências demonstrou a infecção por três vírus distintos: *Bean golden mosaic virus* (BGMV), *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV) e *Okra mottle virus* (OMoV), este último relatado recentemente em plantas de quiabeiro e, pela primeira vez, em soja. Um isolado de begomovírus detectado em leiteiro (*Euphorbia heterophylla*), uma planta daninha comumente associada à cultura da soja, também foi clonado e demonstrou-se tratar de um

isolado de uma possível nova espécie, o Euphorbia mosaic Peru virus. O carlavírus *Cowpea mild mottle virus* (CpMMV) é um fitopatógeno de ocorrência relativamente recente na cultura da soja, se apresentando como um possível risco para a cultura nas condições brasileiras. O silenciamento de RNA é um mecanismo natural de defesa de plantas contra vírus que tem sido largamente empregado na geração de plantas transgênicas resistentes. Neste trabalho, o silenciamento de RNA foi direcionado para uma sequência do gene que codifica a proteína capsidial (*CP*) do CpMMV, a fim de gerar plantas transgênicas de soja resistentes ao vírus. Também foram usadas, em outra construção, sequências dos genes *Rep* do SiMMV e *CP* do potyvírus *Soybean mosaic virus* (SMV) para a geração de plantas transgênicas de soja resistentes aos dois vírus simultaneamente. O vetor pCARLA contém um fragmento de DNA de 493 pares de bases (pb) do gene *CP* do CpMMV, e foi utilizado para a transformação de embriões de soja pela técnica de bombardeamento. O vetor pGEMPOTY contém um fragmento de 303 pb do gene *CP* do SMV e um fragmento de 404 pb do gene *Rep* do SiMMV. Plântulas oriundas do bombardeamento com o vetor pGEMPOTY foram regeneradas em meio seletivo, e aguardam a confirmação da presença do transgene por meio de PCR. Foram obtidas cinco plantas transformantes com o vetor pCARLA, as quais foram desafiadas com o vírus CpMMV. As plantas transformantes, assim como os controles, não demonstraram sintomas visíveis da infecção pelo vírus. A progênie das plantas transformantes oriundas do bombardeamento com o vetor pCARLA será desafiada com o CpMMV a fim de confirmar esses resultados e verificar a herança e expressão do transgene.

ABSTRACT

FERNANDES, Fernanda Rausch, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, March, 2009. **Biological and molecular characterization of begomoviruses in soybean (*Glycine max*) and *Euphorbia heterophylla*, and RNA interference-mediated virus resistance in transgenic soybean plants.** Adviser: Francisco Murilo Zerbini Júnior. Co-Advisers: Francisco José de Lima Aragão and Poliane Alfenas Zerbini.

Molecular characterization of begomoviruses is of fundamental importance to identify the mechanisms of genetic variability of these important plant pathogens. Genome analysis allows for an understanding of mutation and recombination mechanisms which lead to evolution of new viral species. In Brazil, only a few reports of begomovirus infection of soybean have been made to date. Foliar samples of soybean plants with typical symptoms of begomovirus infection were collected in a commercial field at Santo Antônio de Goiás (Goiás state) and analyzed for the presence of a begomovirus. Following confirmation of viral infection by PCR, the entire viral genome was amplified from infected samples by rolling circle amplification, cloned and sequenced. Sequence analysis indicated infection by three distinct begomoviruses: *Bean golden mosaic virus* (BGMV), *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV) and *Okra mottle virus* (OMoV), the latter having been recently described in okra plants in Brazil, and now for the first time in soybean. A begomovirus isolate detected in *Euphorbia heterophylla*, a common weed in soybean fields, was also cloned and shown to comprise an isolate of the recently described novel species, *Euphorbia mosaic Peru virus* (EuMPV). The carlavirus *Cowpea mild mottle virus*

(CpMMV) is a plant pathogen of relatively recent occurrence in soybean, representing a potential threat to the crop under Brazilian conditions. RNA silencing is a natural plant defense against viruses which has been widely employed to generate virus-resistant transgenic plants. In this work, RNA silencing was targeted to a sequence of the CpMMV capsid protein (*CP*) gene in an attempt to generate resistant soybean plants. In another construct, fragments of the SiMMV Rep gene and of the *CP* gene of the potyvirus *Soybean mosaic virus* (SMV) were also used in an attempt to generate transgenic soybean plants displaying resistance to both viruses. The pCARLA vector contains a 493 bp fragment of the CpMMV *CP* gene, and was used to transform soybean embryos by biolistics. The pGEMPOTY vector contains a 303 bp fragment of the SMV *CP* gene and a 404 bp fragment of the SiMMV *Rep* gene. Plants generated from the bombardment with the pGEMPOTY vector were regenerated in selective medium and are currently being tested for the presence of the transgenes. Five transformants were obtained with the pCARLA vector, and were challenged with CpMMV. The transgenic plants did not show any visible symptoms of virus infection. The progeny of the transgenic plants will be challenged with CpMMV to further confirm these results and to verify stable inheritance and expression of the transgene.

INTRODUÇÃO GERAL

A importância econômica da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) nos dias atuais é indiscutível, principalmente em países produtores e exportadores como os Estados Unidos e o Brasil, onde a geração de divisas e a influência na balança comercial são expressivas. A soja é uma cultura de clima temperado que se expandiu no Brasil após anos de melhoramento genético que geraram cultivares adaptados às regiões subtropicais e tropicais (Sediyama *et al.*, 1981).

A sojicultura é um dos segmentos do agronegócio que apresentou crescimento mais expressivo no cultivo e na produtividade na segunda metade do século XX no Brasil (Barbosa & Assumpção, 2001). A cultura da soja ocupa no Brasil atualmente uma área de 21,313 milhões de hectares, com uma produção na safra 2007/2008 em torno de 60 milhões de toneladas e produtividade em torno de 2.816 kg/ha (CONAB, 2009). Trata-se da espécie vegetal com maior extensão de cultivo e relevância econômica no país, e continua em expansão principalmente nas regiões Centro-Oeste e Norte. No mercado de sementes encontram-se disponíveis cultivares de soja adaptados às diversas condições edafo-climáticas e resistentes a diversas pragas e doenças.

Entre os diversos fatores que contribuíram para a expansão da soja no território brasileiro, destaca-se o aproveitamento de área, de máquinas e equipamentos e de mão-de-obra quando cultivada em sucessão ao trigo, além das condições favoráveis de mercado, especialmente para a exportação do produto (Bonato & Bonato, 1987). O binômio soja-trigo foi e tem sido

responsável pelo levante comercial da agricultura brasileira, pela profissionalização de todo o segmento agrícola e maior desempenho dos empresários rurais frente à concorrência internacional. A cadeia agroindustrial da soja brasileira sempre foi considerada um exemplo do sucesso de inserção no mercado mundial. Por outro lado, o segmento da sojicultura nacional enfrenta uma série de obstáculos que interferem diretamente nos ganhos em produção e produtividade, como a própria política agrícola nacional, o preço dos insumos e a incidência de pragas e doenças (Wrather *et al.*, 1997; Barbosa & Assumpção, 2001).

A cultura da soja é infectada naturalmente por diferentes vírus, representantes de diferentes grupos taxonômicos e transmitidos por diferentes insetos vetores. A entomofauna associada à cultura da soja é muito diversa e inclui mais de 100 espécies na América Latina. No Brasil, o número de insetos fitófagos na cultura aumentou de maneira acentuada ao longo dos últimos anos (Kogan & Turnipseed, 1987; Panizzi & Corrêa-Ferreira, 1997; Bento, 1999).

Dentre os vírus que afetam a cultura da soja, o mais prejudicial historicamente tem sido o *Soybean mosaic virus* (SMV), do gênero *Potyvirus* (família *Potyviridae*). O SMV encontra-se distribuído em todas as regiões do mundo onde se cultiva a soja, e é transmitido por sementes de plantas infectadas e por várias espécies de afídeos (Dhingra & Chenulu, 1980; Hill, 1999). No Brasil, o SMV tem importância por contribuir para a redução na produtividade e para o descarte de lotes de sementes, devido à ocorrência de manchas no tegumento da semente. O controle desta virose tem sido realizado por meio da utilização de cultivares resistentes. Entretanto, a variabilidade genética do vírus, evidenciada pelo grande número de estirpes já identificadas, tem promovido a “quebra” da resistência em diversos genótipos e, por isto, cultivares com excelentes características agronômicas têm sido infectados por novas estirpes do SMV (Almeida *et al.*, 1995; Almeida *et al.*, 2001).

Os begomovírus constituem um grupo de vírus pertencentes ao gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) que infectam plantas dicotiledôneas e são transmitidos pela mosca-branca *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) (Stanley *et al.*, 2005). Estes vírus têm emergido como sérios patógenos de culturas agronômicas e hortícolas em regiões tropicais e subtropicais em vários países, sendo responsáveis por perdas severas na produção em todo o mundo,

refletindo nos aspectos sócio-econômicos dos países onde ocorrem epidemias (Morales & Anderson, 2001; Rojas *et al.*, 2005). No território brasileiro constituem sérios fitopatógenos do feijoeiro e do tomateiro, causando prejuízos econômicos nestas culturas em praticamente todas as regiões produtoras (Faria *et al.*, 2000; Ribeiro *et al.*, 2003; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2008).

Embora já tenham sido relatados casos de infecção por begomovírus em soja no Brasil, os begomovírus não são considerados fatores limitantes à produção, devido aos casos isolados de infecção detectados nas áreas de cultivo (Mello *et al.*, 2002). Este cenário se contrasta com aquele observado atualmente na Argentina, onde a incidência de begomovírus em soja é elevada, principalmente na região Noroeste (Sakai *et al.*, 1997; Vizcarret, 1999; Rodríguez-Pardina *et al.*, 2006). A presença de begomovírus em plantas invasoras associadas a espécies vegetais cultivadas tem suscitado a hipótese de que estas possam servir de reservatórios naturais destes vírus nas culturas. A caracterização molecular e biológica das espécies de begomovírus possibilita um conhecimento mais aprofundado acerca dos mecanismos de variabilidade existentes, como a recombinação e pseudo-recombinação, responsáveis em grande parte pela evolução deste grupo de vírus.

Recentemente, foi identificada uma nova doença de etiologia viral em soja no Brasil, causada por um carlavírus (família *Flexiviridae*, gênero *Carlavirus*), cujos principais sintomas são nanismo (redução de crescimento) e necrose da haste (Almeida *et al.*, 2005). Os estudos realizados, os quais consistiram em ensaios de transmissão, microscopia eletrônica, purificação, sorologia e análise molecular, indicaram que a doença é causada por um carlavírus transmitido por mosca-branca, possivelmente relacionado com o *Cowpea mild mottle virus* (CpMMV). Esta espécie viral pode se constituir em uma séria ameaça para a cultura da soja, em função da severidade dos sintomas causados nas plantas infectadas, podendo, inclusive, levar à sua morte.

A possibilidade de utilização do mecanismo de silenciamento de RNA (também conhecido como RNA interferente, ou RNAi) para a obtenção de resistência a infecções virais tem sido largamente estudada (Prins *et al.*, 2008). O silenciamento de RNA é caracterizado por um decréscimo nos níveis de

mRNAs de um gene alvo específico. Acredita-se que tenha evoluído como um mecanismo de defesa contra elementos genéticos exógenos, tais como vírus, viróides e elementos transponíveis (Waterhouse *et al.*, 2001). Esse mecanismo tem sido explorado com o objetivo de obtenção de resistência a doenças em um grande número de espécies, seja para vírus com genoma de RNA (Jan *et al.*, 2000; Bucher *et al.*, 2006) ou de DNA (Noris *et al.*, 2004; Fuentes *et al.*, 2006; Bonfim *et al.*, 2007). A associação da engenharia genética aos programas de melhoramento convencional está se tornando cada vez mais evidente, especialmente no que se refere à resistência a doenças.

Este trabalho teve como objetivo caracterizar isolados de begomovírus presentes na cultura da soja e na planta daninha *Euphorbia heterophylla*, comumente conhecida como “leiteiro”, e obter plantas transgênicas de soja resistentes a begomovírus, potyvírus e carlavírus por meio da estratégia de RNA interferente.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Gênero *Begomovirus*: aspectos na cultura da soja e em plantas daninhas

1.1 Família *Geminiviridae*

A família *Geminiviridae* engloba um grande número de espécies de vírus que infectam plantas, responsáveis por severas perdas econômicas na agricultura, notadamente o *African cassava mosaic virus* (ACMV) em mandioca nos países africanos (Fargette *et al.*, 1988; Fargette *et al.*, 1993), o *Bean golden mosaic virus* (BGMV) e *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) em feijoeiro nas Américas (Morales, 1994), o *Cotton leaf curl Multan virus* (CLCuMV) em algodão na Ásia e África (Hameed *et al.*, 1994, Mansoor *et al.*, 2003) e o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) no Oriente Médio, Mediterrâneo e América do Norte e Central (Polston *et al.*, 1999; Moriones & Navas-Castillo, 2000). As epidemias que causaram maiores prejuízos estão diretamente relacionadas ao aumento e migração de populações de mosca-branca nas culturas (Polston & Anderson, 1997; Morales & Anderson, 2001; Morales & Jones, 2004; Were *et al.*, 2004). Nas Américas, o aumento populacional da mosca-branca ocasionou aumento na incidência de vírus e grandes perdas na produção do feijoeiro e do tomateiro (Brown & Bird, 1992; Morales & Anderson, 2001).

A família *Geminiviridae* é caracterizada pelo genoma constituído de DNA circular de fita simples (ssDNA) com aproximadamente 2.500 a 3.000 nucleotídeos (Lazarowitz, 1992), encapsidado por uma única proteína estrutural

(proteína capsidial) que se arranja na forma de 22 capsômeros formando dois icosaedros incompletos, com cerca de 18 x 30 nm. A disposição dos capsômeros confere o aspecto geminado das partículas virais, característico dos vírus pertencentes à família *Geminiviridae* (Matyis *et al.*, 1975; Zhang *et al.*, 2001). Além destas propriedades básicas, os geminivírus exibem uma considerável diversidade em termos de estrutura genômica, círculo de hospedeiros, tropismo vegetal e insetos vetores.

Os geminivírus estão entre os vírus mais bem caracterizados do ponto de vista molecular. Os atributos que permitiram o progresso nesse tipo de estudo incluem: (a) genoma de DNA de tamanho reduzido; (b) replicação utilizando DNA fita dupla (dsDNA), sendo este facilmente manipulável pelos métodos padrão de clonagem; e (c) desenvolvimento de métodos de inoculação independentes do inseto vetor. Estas características têm feito com que os geminivírus sejam utilizados como uma ferramenta para o estudo da replicação do DNA e a regulação da expressão gênica em plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas. Pelo fato dos geminivírus produzirem um grande número de cópias de replicons extracromossomais, o potencial de utilização destes para a expressão ou silenciamento de genes endógenos das plantas tem gerado interesse considerável (Kjemtrup, 1998; Peele *et al.*, 2001).

A família *Geminiviridae* é constituída dos gêneros *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus* e *Topocuvirus*, e os critérios utilizados para a classificação das espécies nestes gêneros incluem o tipo de inseto vetor, a gama de hospedeiros e a organização e número de componentes genômicos (Stanley *et al.*, 2005). Os vírus pertencentes ao gênero *Mastrevirus* possuem genoma monossegmentado, são transmitidos por cigarrinhas (Homoptera: Cicadellidae) e infectam, em sua maioria, plantas monocotiledôneas. Exemplos de espécies desse gênero incluem o *Wheat dwarf virus* (WDF), o *Digitaria streak virus* (DSV) e o *Maize streak virus* (MSV), este último a espécie-tipo do gênero. Algumas espécies dentro do gênero infectam plantas dicotiledôneas, tais como o *Tobacco yellow dwarf virus* (TYDV) (Morris *et al.*, 1992) e o *Bean yellow dwarf virus* (BeYDV) (Liu *et al.*, 1997). Todas as espécies deste gênero descritas até o presente são encontradas no “Velho Mundo” (África, Ásia e Europa). O gênero *Curtovirus* (espécie-tipo: *Beet curly top virus*, BCTV) possui espécies que apresentam genoma monossegmentado e são transmitidas por

cigarrinhas (Homoptera: Cicadellidae) a plantas dicotiledôneas. As espécies desse gênero apresentam diferenças significativas quanto à organização genômica em relação aos mastrevírus. Os vírus pertencentes a este gênero podem ser encontrados tanto no “Velho” quanto no “Novo Mundo” (Stanley *et al.*, 2005).

O gênero *Topocuvirus* possui apenas uma espécie, o *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV). Este vírus possui genoma monossegmentado e é transmitido por membracídeos (Homoptera: Auchenorrhyncha). As análises do genoma do TPCTV revelam características típicas tanto do gênero *Mastrevirus* quanto do gênero *Begomovirus*, indicando ser um recombinante natural entre espécies ancestrais desses dois gêneros (Briddon *et al.*, 1996).

O gênero *Begomovirus* é constituído de espécies que apresentam um ou dois componentes genômicos, transmitidos pelo aleirodídeo *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae, vulgarmente denominada mosca-branca) a plantas dicotiledôneas. A espécie-tipo é o *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) (Stanley *et al.*, 2005). Os dois componentes genômicos dos begomovírus bissegmentados são denominados DNA-A e DNA-B. O DNA-A é responsável pelas funções de replicação e encapsidação da progênie viral. O DNA-B contém os genes requeridos para o movimento célula-a-célula e a longa distância, além de estarem relacionados com a gama de hospedeiros e o desenvolvimento de sintomas (Timmermans *et al.*, 1994; Palmer & Rybicki, 1998). Muitas espécies de begomovírus presentes no “Velho Mundo” possuem apenas um componente genômico semelhante ao DNA-A.

A transcrição do genoma viral nos begomovírus é bidirecional (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999; Lazarowitz & Beachy, 1999). O DNA-A codifica quatro a seis proteínas: a proteína capsidial (CP, *coat protein*, também denominada AV1); a proteína *precoat* ou AV2, presente apenas nos begomovírus do “Velho Mundo”; a proteína associada à replicação do genoma viral (Rep, *replication-associated protein*, ou AC1); uma proteína transativadora da transcrição dos genes presentes na fita viral (TrAp, *trans-activating protein*, ou AC2); a proteína REn (*replication-enhancer protein*, ou AC3) e a proteína codificada pela ORF AC4. O DNA-B codifica as proteínas MP (*movement protein*, ou BC1) no sentido complementar e a proteína NSP (*nuclear shuttle protein*, ou BV1) no sentido viral (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999).

A proteína capsidial é responsável pela montagem das partículas virais, além de ser essencial para a transmissão do vírus e para a especificidade da transmissão pelo inseto vetor (Mullineaux *et al.*, 1984; Briddon *et al.*, 1990). A ORF AV2 codifica a proteína *precoat*, que está associada à movimentação sistêmica do vírus na planta (Padidam *et al.*, 1996). Trabalhos envolvendo mutagênese *in vitro* e expressão em plantas transgênicas demonstraram que a proteína Rep é a única proteína viral essencial para a replicação (Hayes & Buck, 1989; Hanley-Bowdoin *et al.*, 1990). Entretanto, a proteína Rep não é uma replicase. A associação de Rep à replicação do DNA envolve a ligação específica a DNA de fita simples e dupla (Fontes *et al.*, 1992), a clivagem e ligação do DNA em seqüências específicas (Laufs *et al.*, 1995), hidrólise de ATP (Desbiez *et al.*, 1995) e iniciação do mecanismo de replicação por círculo-rolante (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). Além da sua atividade principal na replicação, a proteína Rep está envolvida na autoregulação de sua expressão, ou seja, a repressão de sua própria síntese ao nível transcricional (Eagle *et al.*, 1994; Sunter *et al.*, 1993). O gene *trap* codifica uma proteína transativadora com aproximadamente 15 kDa, que atua *in trans* nos promotores dos genes *cp* (Sunter & Bisaro, 1991; Gröning *et al.*, 1994) e *nsp* (Sunter & Bisaro, 1992). Esta proteína também está envolvida na supressão do mecanismo de silenciamento gênico do hospedeiro (van Wezel *et al.*, 2001; van Wezel *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2003). O gene *ren* codifica uma proteína com aproximadamente 16 kDa, cuja presença aumenta a eficiência da replicação de maneira inespecífica (Morris *et al.*, 1991). A proteína REn não é essencial para a infectividade, porém estudos envolvendo mutações demonstraram retardamento e atenuação na manifestação dos sintomas na ausência de uma proteína Ren funcional (Elmer *et al.*, 1988; Eteessami *et al.*, 1991).

O DNA-B não tem autonomia de replicação (Davies *et al.*, 1987) e depende dos produtos gênicos codificados pelo DNA-A. As duas proteínas codificadas pelo DNA-B estão relacionadas ao movimento viral. A proteína MP associa-se à parede celular e altera o limite de exclusão dos plasmodesmas, possibilitando o transporte do genoma viral (Noueiry *et al.*, 1994). Como os geminivírus se multiplicam no núcleo da célula infectada, é necessária uma etapa adicional de transporte do núcleo para o citoplasma (Palmer & Rybicki, 1998), que é realizada pela proteína NSP. Esta proteína atua cooperativamente

com MP para movimentar o DNA viral de célula-a-célula através da parede celular (Sanderfoot & Lazarowitz, 1995). As duas proteínas são requeridas para o estabelecimento de uma infecção sistêmica.

Alguns begomovírus apresentam ORFs adicionais no DNA-A, como é o caso da ORF AC4 no *East African cassava mosaic Zanzibar virus* (EACMZV) (Maruthi *et al.*, 2004), *Squash leaf curl Yunnan virus* (SLCYV) (Xie & Zhou, 2003) e *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) (Gröning *et al.*, 1994). A ORF AC4 se encontra inserida completamente dentro do gene *rep*, mas é codificada em uma fase de leitura distinta. O gene AC4 codifica uma proteína supressora do silenciamento gênico (Vanitharani *et al.*, 2004). Outra ORF encontrada em alguns begomovírus é a AC5, verificada no *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) (Barros *et al.*, 2003), *Tomato chlorotic mottle virus* (Fontenelle *et al.*, 2007), entre outros. No ToRMV, a ORF AC5 encontra-se quase totalmente inserida na seqüência do gene *cp*, entretanto está em orientação inversa. A expressão da proteína codificada pela AC5 está sendo avaliada em tecido infectado (Barros *et al.*, 2004).

Os componentes A e B não possuem identidade de seqüência, exceto por uma porção localizada na região intergênica (IR), com aproximadamente 200 nucleotídeos (nt), denominada região comum (RC). A RC é altamente conservada entre os dois componentes de uma determinada espécie viral (acima de 90% de identidade), porém bastante divergente entre as diferentes espécies de begomovírus (Sunter & Bisaro, 1991). A origem de replicação (*ori*) está localizada na RC. A seqüência da *ori* é idêntica entre componentes de um mesmo vírus, porém variável entre espécies, com exceção de uma região de aproximadamente 30 nt, altamente conservada (mas não idêntica) entre todas as espécies (Davies *et al.*, 1987; Lazarowitz, 1992). Nesta região se localiza uma seqüência repetida e invertida composta predominantemente por guanina e citosina, formando uma estrutura conservada em forma de grampo (*structurally-conserved element*, SCE), com uma seqüência invariável (5'-TAATATTAC-3') encontrada em todos os geminivírus, que constitui o domínio funcional da origem de replicação (Heyraud-Nitschke *et al.*, 1995; Orozco & Hanley-Bowdoin, 1998). A clivagem deste nonanucleotídeo é realizada pela proteína Rep, que atua como uma endonuclease sítio-específica com requerimento de estrutura e seqüência (Laufs *et al.*, 1995; Orozco & Hanley-

Bowdoin, 1998). Após a clivagem, o processo de replicação por círculo rolante é iniciado (Fontes *et al.*, 1994a,1994b; Laufs *et al.*, 1995). Outras particularidades da região comum são as sequências específicas para a ligação da proteína Rep (Fontes *et al.*, 1992; Fontes *et al.*, 1994b) e regiões promotoras da RNA polimerase tipo II de plantas, responsável pela transcrição dos genes virais (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). O sítio de ligação de Rep ao DNA viral está localizado entre a caixa TATA do gene *rep* e a SCE (Orozco *et al.*, 1998).

1.2 Infecção por begomovírus na cultura da soja

A cultura da soja é infectada naturalmente por diferentes vírus, representantes de diferentes grupos taxonômicos e transmitidos por diferentes insetos vetores. A mosca-branca *Bemisia tabaci* foi por muito tempo considerada praga ocasional em soja no Brasil. Todavia, o biótipo B de *B. tabaci* introduzido no início da década de 90 vem se tornando mais importante a cada safra. A soja constitui um excelente hospedeiro para a mosca-branca (Menten & Roston, 1980), espécie vetora de begomovírus e de algumas espécies dos gêneros *Carlavirus* (família *Flexiviridae*) (Naidu *et al.*, 1998) e *Ipomovirus* (família *Potyviridae*) (Valverde *et al.*, 2004).

Uma das espécies de begomovírus que infectam a soja é o vírus do mosaico dourado do feijoeiro (*Bean golden mosaic virus*, BGMV), responsável por perdas severas na cultura do feijoeiro (Faria, 1994). Este vírus é considerado fator limitante da cultura do feijoeiro em todas as regiões onde é cultivado. A primeira descrição da doença causada por BGMV se deu a partir de feijoeiros infectados no estado de São Paulo (Costa, 1965). O primeiro relato deste vírus infectando soja em condições de campo ocorreu em 1978 (Costa *et al.*, 1979).

Além do BGMV, há relatos de infecção natural de soja por dois outros begomovírus, o *Euphorbia mosaic virus* (EuMV) e o *Abutilon mosaic virus* (AbMV) (Costa, 1955, 1977). Entretanto, estes relatos foram baseados exclusivamente na observação de sintomas macroscópicos e na transmissão pelo inseto vetor. Apesar da impossibilidade da confirmação da espécie viral em questão, a transmissão por mosca-branca sugere que os vírus pertenciam

ao gênero *Begomovirus*. O AbMV foi um dos primeiros vírus de plantas citados na literatura científica, causando variegação em espécies ornamentais de *Abutilon*. A doença causada por este vírus foi denominada “clorose infecciosa das malváceas” por Baur, o qual formulou a hipótese da enfermidade ser de origem viral (Baur, 1906, citado por Wege *et al.*, 2000). A “clorose infecciosa das malváceas” foi relatada no Brasil pela primeira vez em algodão (Costa, 1937, citado por Morales & Anderson, 2001). A denominação “mosaico do *Abutilon*” foi dada em 1955 (Costa, 1955) e o AbMV foi caracterizado molecularmente em 1990 (Frischmuth *et al.*, 1990).

O EuMV foi descrito inicialmente, no Brasil, como “mosaico de *Euphorbia prunifolia*” (Costa & Bennet, 1950). Posteriormente, outros isolados de “mosaico de *Euphorbia*” foram relatados na América Central (Bird *et al.*, 1975, citados por Costa, 1976) e do Norte (Kim & Fulton, 1984). A análise de características biológicas, citológicas e bioquímicas sugeriu que estes vírus constituem isolados da mesma espécie (Costa, 1976; Kim & Fulton, 1984). Costa (1977) relatou a infecção natural de plantas de soja por EuMV no Brasil.

A infecção por begomovírus em plantas de soja e plantas daninhas associadas provenientes de lavouras comerciais foi confirmada por Mello *et al.* (2000, 2002). A partir da análise da seqüência nucleotídica de produtos de PCR clonados (amplificados utilizando-se oligonucleotídeos universais para o gênero), foram identificadas quatro espécies: *Leonorus mosaic virus* (LeMV), *Sida mottle virus* (SiMoV) e dois possíveis novos begomovírus, denominados “vírus A” e “vírus B”. O LeMV foi descrito originalmente por Faria & Maxwell (1999) infectando a planta daninha *Leonorus sibiricus* e o feijoeiro, entretanto ainda não havia sido relatado em soja. O SiMoV foi primeiramente relatado no Brasil infectando *Sida rhombifolia* em Minas Gerais (Almeida *et al.*, 1997; Fernandes *et al.*, 1998), e o DNA-A foi totalmente sequenciado (número de acesso no GenBank AY090555). Este vírus também infecta o tomateiro e o feijoeiro (Calegario *et al.*, 2004; Rodríguez-Pardina *et al.*, 2006). A análise das seqüências nucleotídicas parciais das duas possíveis novas espécies, “vírus A” e “vírus B”, indicou ausência de identidade nucleotídica significativa com quaisquer outros vírus cujas seqüências encontravam-se disponíveis na época (Mello, 2001). Moreira (2005) obteve a seqüência completa do DNA-B do “vírus A” e uma seqüência parcial do DNA-A do “vírus B”. Comparações de

seqüências e análise filogenética indicaram que a espécie viral mais proximamente relacionada tanto ao DNA-B do “vírus A” como ao DNA-A do “vírus B” era o *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV). Entretanto, os níveis de identidade de seqüência entre o SiMMV, o “vírus A” e o “vírus B” foram baixos, indicando que ambos os vírus devem constituir novas espécies de begomovírus.

A região noroeste da Argentina (províncias de Tucumán, Salta, Jujuy, Santiago del Estero e Catamarca) sofre com elevada incidência de mosca-branca, sendo comum a detecção de begomovírus (Vizcarret, 1999). Esta é a principal região produtora de feijão do país e também importante região produtora de soja. A ocorrência de begomovírus nas lavouras de soja na região noroeste do país foi relatada primeiramente em 1997 (Sakai *et al.*, 1997). A caracterização molecular parcial indicou que um vírus relacionado com o *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) estava envolvido com a doença (Rodríguez-Pardina *et al.*, 1998). Rodríguez-Pardina *et al.* (2006) analisaram a diversidade genética de begomovírus associados à soja, feijão e plantas daninhas associadas na região noroeste da Argentina, e os resultados indicaram a presença de quatro espécies de begomovírus, todas relacionadas às espécies do Novo Mundo. O vírus prevalente, detectado em 94% das amostras de feijoeiro e soja e em duas amostras de plantas daninhas, apresentou identidade de seqüência e relacionamento filogenético com o *Sida mottle virus* (SiMoV). Um vírus com elevada identidade nucleotídica com o *Bean golden mosaic virus* (BGMV) foi detectado em feijoeiro, e a análise dos dois begomovírus restantes sugeriu tratarem-se de novas espécies.

1.3 Infecção por begomovírus em plantas invasoras no Brasil

Epidemias causadas por begomovírus têm ocorrido em várias partes do mundo e frequentemente estão associadas com o surgimento de novas variantes ou espécies (Zhou *et al.*, 1998; Legg & Thresh, 2000; Ribeiro *et al.*, 2003), o que por sua vez é favorecido pela co-infecção de plantas com diferentes begomovírus (Harrison *et al.*, 1997). Além das plantas cultivadas,

muitas espécies de plantas invasoras têm sido relatadas como hospedeiras de begomovírus em vários países, inclusive no Brasil.

Relatos da infecção de plantas daninhas e outras plantas silvestres por begomovírus podem ser encontrados na literatura desde a década de 1950 (Costa & Bennett, 1950; Costa, 1955; Costa, 1976). As espécies mais comumente relatadas como hospedeiras pertencem às famílias Malvaceae, Euphorbiaceae e Fabaceae (Morales & Anderson, 2001). Após a introdução do biótipo B de *B. tabaci* no Brasil, a transferência de begomovírus presentes em hospedeiros naturais não cultivados para as espécies vegetais cultivadas comercialmente tornou-se possível devido ao amplo espectro de hospedeiros deste biótipo. Antes da introdução do biótipo B, espécies de begomovírus provavelmente encontravam-se associadas às plantas daninhas e outras espécies de plantas não cultivadas, e não infectavam muitas espécies vegetais devido à ausência de um vetor eficiente na colonização destas. O elevado grau de diversidade das espécies de begomovírus que emergiram rapidamente na cultura do tomateiro após a introdução do biótipo B corrobora essa hipótese (Ambrozevícius *et al.* 2002; Ribeiro *et al.*, 2003). Os resultados obtidos com a análise de begomovírus que infectam plantas invasoras indicam que, a exemplo do que ocorre com plantas cultivadas, a variabilidade genética é muito grande (Ambrozevícius *et al.*, 2002; Callegario *et al.*, 2004; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008).

Além da identificação de novas espécies de begomovírus que infectam o tomateiro (Ribeiro *et al.*, 2003; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2008), outras espécies de begomovírus presentes em plantas da vegetação espontânea estão sendo caracterizadas no Brasil, como em rubi (*Leonorus sibiricus*) (Faria & Maxwell, 1999), *Physalis angulata* (Boiteux *et al.*, 2003), *Malva parviflora* (Fonseca *et al.*, 2003a), *Euphorbia heterophylla* (Fonseca *et al.*, 2003b), *Nicandra physaloides* (Inoue-Nagata *et al.*, 2003), *Sida rhombifolia* (Almeida *et al.*, 1997; Galvão *et al.*, 1998), *Blainvillea rhomboidea* (Castillo-Urquiza *et al.*, 2008) e em plantas cultivadas, como o feijão-de-lima (Faria & Maxwell, 1999). No Brasil, estudos realizados com coletas de plantas daninhas com sintomas típicos de begomovírus, realização de testes de detecção, identificação da espécie presente e a inoculação de begomovírus provenientes de espécies vegetais cultivadas em plantas daninhas selecionadas

demonstraram que estas podem se constituir em fonte importante de vírus durante a entressafra (Boiteux *et al.*, 2003; Fonseca *et al.*, 2003a; Fonseca *et al.*, 2003b; Rocha *et al.*, 2003; Inoue-Nagata *et al.*, 2003; Inoue-Nagata *et al.*, 2004a).

Alguns trabalhos realizados evidenciam a preocupação com a presença de begomovírus infectando espécies invasoras associadas a lavouras de tomateiro, em função da importância desse grupo de vírus para esta cultura nas condições brasileiras. Costa & Carvalho (1960) relataram a transmissão para o tomateiro das espécies *Abutilon mosaic virus* (AbMV, frequente em malváceas) e *Euphorbia mosaic virus* (EuMV, obtido de *Euphorbia prunifolia*) via inseto-vetor. Calegario *et al.* (2004), em Minas Gerais, verificaram infecção natural do tomateiro com um isolado do *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV). Fernandes & Zerbini (2000) verificaram a presença dos componentes genômicos do ToRMV em *Nicandra physaloides* e feijoeiro, porém estes encontravam-se em associação com componentes distintos. O componente A do ToRMV foi detectado em *Nicandra physaloides* em associação com um novo componente B, e o componente B do ToRMV foi detectado em *Phaseolus vulgaris* em associação com um novo componente A.

Assunção *et al.* (2006) relataram a infecção por begomovírus (não caracterizados molecularmente) em 10 espécies de plantas invasoras, distribuídas em cinco famílias botânicas (Malvaceae, Sterculiaceae, Capparaceae, Fabaceae e Euphorbiaceae). *Herissantia crispa*, *Waltheria indica*, *Triumfetta semitriloba* e *Demodium* sp. ainda não haviam sido relatadas como hospedeiras desses vírus no Brasil e no mundo. Já em *Macroptilium latyroides*, *S. rhombifolia*, *E. heterophylla*, *Cleome* spp., *B. rhomboidea* e *C. urens* (sinonímia *Jatropha urens*), a infecção por begomovírus havia sido relatada anteriormente.

Arnaud *et al.* (2007) coletaram plantas daninhas associadas a lavouras de tomateiro da Serra do Ibiapaba (estado do Ceará), pertencentes a 18 espécies vegetais de sete famílias botânicas (Amaranthaceae, Asteraceae, Commelinaceae, Convolvulaceae, Fabaceae, Portulacaceae, Rubiaceae e Solanaceae). Detectou-se, por ELISA e PCR, a presença de begomovírus em *Amaranthus spinosus*, *A. viridis*, *Ageratum conyzoides* e *Bidens pilosa*. Dessas quatro espécies de plantas daninhas, *A. conyzoides* e *A. viridis* não haviam

sido relatadas anteriormente como hospedeiras de begomovírus na região Nordeste.

Castillo-Urquiza *et al.* (2008) analisaram a presença de begomovírus em tomateiros e plantas daninhas associadas à cultura (*Blainvillea rhomboidea*, *Sida rhombifolia* e *Sida micrantha*) e identificaram seis novas espécies, três provenientes de tomateiro (*Tomato mild mosaic virus*, *Tomato common mosaic virus* e *Tomato leaf distortion virus*) e três provenientes das espécies invasoras (*Blainvillea yellow spot virus*, *Sida yellow leaf curl virus* e *Sida common mosaic virus*).

O leiteiro (*Euphorbia heterophylla*) é considerado uma espécie invasora em um grande número de culturas de importância econômica. O *Euphorbia mosaic virus* (EuMV) foi descrito como um vírus distinto há algumas décadas (Costa & Bennet, 1950) por meio da comparação de suas propriedades biológicas com os outros geminivírus descritos na época. Costa (1955) verificou que este vírus possuía uma menor gama de hospedeiros (restrita aos gêneros *Euphorbia* e *Datura*) em relação ao *Abutilon mosaic virus*, o qual infectava diversas espécies das famílias Malvaceae e Fabaceae. Ademais, Costa (1965) observou que o AbMV era mais facilmente transmitido para o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) em relação ao EuMV. O EuMV foi definitivamente caracterizado como um geminivírus por Jaramillo & Lastra (1986), que purificaram as partículas virais e estudaram propriedades físico-químicas e sorológicas.

A presença de begomovírus infectando plantas daninhas no campo sugere que estas atuam como fonte de inóculo primário para plantas de soja, além de contribuir para o aumento da diversidade genética viral mediante troca de material genético (recombinação e pseudo-recombinação) no caso de infecções mistas, culminando no surgimento de novas espécies. A detecção de begomovírus em plantas invasoras é de especial importância para a epidemiologia das doenças causadas por estes vírus, uma vez que estas plantas, muitas de natureza perene, podem atuar como reservatórios naturais de reposição do vírus a cada início de safra da cultura em questão. Caso estas plantas sirvam de reservatórios naturais destes vírus, a frequência de eventos que conduzem à ampliação da diversidade genética viral torna-se incrementada. Este fato é considerado de grande relevância do ponto de vista

da evolução e surgimento de novas espécies, as quais podem se apresentar mais adaptadas aos hospedeiros cultivados. A caracterização de begomovírus que infectam plantas invasoras é a etapa inicial para se obter informações sobre aspectos ecológicos e evolutivos a respeito desses vírus. Além disso, permite também contribuir para elucidar se esses isolados podem infectar plantas cultivadas de importância econômica.

2. Gênero *Potyvirus*: aspectos na cultura da soja

2.1 Família *Potyviridae*

A família *Potyviridae* é do ponto de vista econômico, a mais importante dentre as famílias de vírus que infectam plantas. Os vírus classificados nessa família causam doenças em diversas culturas de clima temperado e tropical, anuais e perenes, hortaliças, fruteiras e grandes culturas, mono- e dicotiledôneas. Atualmente, de acordo com o último relatório do ICTV, a família *Potyviridae* é constituída por aproximadamente 220 espécies, divididas em seis gêneros (*Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Potyvirus*, *Rymovirus* e *Tritimovirus*) cuja classificação é baseada no vetor de transmissão, gama de hospedeiros e organização genômica (Berger *et al.*, 2005). As plantas infectadas por membros da família *Potyviridae* apresentam sintomas que incluem desde mosqueado, mosaico, clorose, necrose, deformações foliares e de frutos (Shukla *et al.*, 1994). Estes vírus são facilmente transmitidos experimentalmente de plantas infectadas para plantas saudias, pela inoculação via extrato vegetal proveniente de plantas infectadas ou de preparações virais purificadas (Berger *et al.*, 2005).

Os vírus pertencentes ao gênero *Ipomovirus* (espécie-tipo: *Sweet potato mild mottle virus*, SPMMV) possuem um único componente genômico de RNA de fita simples, sentido positivo, e são transmitidos pela mosca-branca *Bemisia tabaci*. O gênero *Macluravirus* (espécie-tipo: *Maclura mosaic virus*, MacMV) inclui espécies que apresentam um componente genômico, partículas menores que 700 nm de comprimento, e transmissão por afídeos. O gênero *Rymovirus* (espécie-tipo: *Ryegrass mosaic virus*, RGMV) caracteriza-se pela presença de um único componente genômico e transmissão por ácaros do gênero *Abacarus*

a espécies da família *Gramineae*. O gênero *Tritimovirus* (espécie-tipo: *Wheat streak mosaic virus*, WSMV) engloba espécies que apresentam um componente genômico transmitidas por ácaros do gênero *Aceria* a espécies da família *Gramineae*. O gênero *Bymovirus* (espécie-tipo: *Barley yellow mosaic virus*, BaYMV) inclui vírus com genoma bissegmentado, cuja transmissão é feita por fungos a gramíneas (Adams *et al.*, 2005).

O gênero *Potyvirus* é o mais numeroso da família. Os vírus classificados nesse gênero infectam uma ampla variedade de plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas. As partículas virais são alongadas, flexuosas, com 680-900 nm de comprimento e 11-13 nm de diâmetro. O genoma viral é constituído por uma única molécula de RNA de fita simples, sentido positivo, com aproximadamente 9.700 nucleotídeos, possuindo uma única fase de leitura (ORF) localizada entre as extremidades 5' e 3' não-traduzidas (5'UTR e 3'UTR), cuja tradução gera uma poliproteína de 340 a 370 kDa. A organização genômica e a estratégia de expressão aparentam ser uniformes entre todas as espécies do gênero. A extremidade 5' do RNA dos potyvírus é covalentemente ligada a uma proteína de origem viral (VPg), e a extremidade 3' possui uma cauda poliadenilada (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). A VPg e a proteína capsidial (CP) são os únicos produtos gênicos que fazem parte da partícula viral (Hollings & Brunt, 1981a).

A poliproteína é processada por três proteases virais, NIa, P1 e Hc-Pro, em 10 proteínas: a proteína N-terminal (P1), o componente auxiliar-protease (Hc-Pro), a proteína P3, a proteína da inclusão citoplasmática (CI), duas proteínas de inclusão nuclear (NIa, [VPg-Pro] e NIb), duas proteínas pequenas (6K1 e 6K2) e a proteína capsidial (CP) (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001; Adams *et al.*, 2005). Uma característica das proteínas sintetizadas pelos potyvírus é o seu caráter multifuncional. Cada proteína é geralmente responsável por várias funções durante o ciclo de infecção (revisado por Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001).

O RNA genômico é envolto por um capsídeo formado por cerca de 2.000 cópias da proteína capsidial (CP), com massa molecular de aproximadamente 34 kDa. A análise da proteína capsidial dos potyvírus indica que esta apresenta uma região amino-terminal variável em tamanho e seqüência, uma região central altamente conservada contendo de 215 a 227 aminoácidos, e uma região carboxi-terminal de 18-20 aminoácidos. As extremidades amino e carboxi estão voltadas para o exterior da partícula viral, e são responsáveis

pelas suas propriedades antigênicas (Shukla *et al.*, 1994). A sequência de nucleotídeos da região 5'UTR é essencial para a tradução do RNA viral por conter um sítio de entrada interna de ribossomos (Basso *et al.*, 1994). A região 3'UTR coopera com a região 5'UTR para uma tradução eficiente (Gallie *et al.*, 1995). Os potyvírus são transmitidos de maneira não-circulativa por afídeos, por intermédio de uma proteína auxiliar (HC-Pro) codificada pelo vírus (Hull, 2002).

A análise das seqüências genômicas de espécies de potyvírus indica que o nível de identidade entre espécies do gênero é relativamente baixo. O nível de identidade para demarcação de espécies foi proposto em 76% para seqüências de nucleotídeos e 82% para seqüências de aminoácidos. A análise de cada região codificadora isoladamente indicou níveis de identidade nucleotídica para demarcação de espécies de 58% (P1) ou de 74-78% (demais genes). Uma comparação realizada ao nível de aminoácidos revelou uma identidade média inferior a 70% para a proteína capsidial, refletindo uma elevada flexibilidade evolutiva do grupo e sugerindo que os potyvírus continuam a se adaptar às condições ambientais (Callaway *et al.*, 2001). A análise com base em 1.220 seqüências de proteínas capsidiais indicou um valor de 76-77% de identidade de nucleotídeos para a demarcação de espécies, o mesmo valor encontrado para as comparações baseadas no genoma completo (Adams *et al.*, 2005).

2.2 Soybean mosaic virus (SMV) na cultura da soja

Dentre os vírus que afetam a cultura da soja, o potyvírus *Soybean mosaic virus* (SMV) causa uma das doenças de etiologia viral de incidência mais frequente, e se encontra amplamente distribuído em todas as regiões produtoras do mundo (Cho *et al.*, 1977; Dhingra & Chenulu, 1980; Hill, 1999). O SMV é facilmente transmitido por sementes de plantas infectadas e por várias espécies de afídeos (Gardner & Kendrick, 1921; Almeida & Miranda, 1979; Lima Neto & Costa, 1979). A transmissibilidade deste vírus por intermédio da semente, descrita pela primeira vez por Gardner & Kendrick (1921), chega a provocar reduções apreciáveis na germinação (Costa, 1977).

O SMV pode causar perdas superiores a 90%, e reduz a fixação de nitrogênio, o tamanho da semente e seu conteúdo de óleo (Ross, 1969; Demski & Jellum, 1975; Cho *et al.*, 1977; Dhingra & Chenulu, 1980; El-Amrety *et al.*, 1985). A infecção pelo SMV pode causar também aborto de flores, redução do pegamento das vagens, e redução no número e peso das sementes (Jayaram *et al.*, 1992; Ross, 1969). A infecção precoce da planta frequentemente resulta em perdas mais severas (Ross, 1969; Halbert & Irwin, 1981; Bryant *et al.*, 1982). No Brasil, o SMV tem importância por contribuir para o descarte de lotes de sementes e para a redução na produtividade (Almeida *et al.*, 1994). A redução da qualidade dos grãos, como um resultado da descoloração da semente (frequentemente descrita como sangramento do hilo, “mancha-café” ou mosqueado da casca da semente) também pode ocorrer e resultar em grandes prejuízos. Nas principais regiões produtoras de soja do norte dos EUA, a fonte primária de inóculo consiste nas sementes infectadas (Hill *et al.*, 1980). A propagação secundária ocorre por meio da atividade de pelo menos 30 espécies de afídeos (Irwin & Goodman, 1981).

Os sintomas da infecção pelo SMV em soja incluem mosaico e necrose. Sintomas associados com o mosaico incluem áreas verdes claras e escuras de mosqueado suave ou mosaico severo, clorose, rugosidade e enrolamento foliar. Existem três tipos de reação necrótica: necrose local, necrose sistêmica e necrose da ponta da haste. A necrose local é uma reação de hipersensibilidade, e lesões necróticas são restritas aos sítios de infecção iniciais nas folhas inoculadas. O sintoma de necrose sistêmica inclui lesões necróticas tanto nos folíolos, pecíolos e ramos, inoculados ou não. Sintomas associados com a necrose da ponta da haste incluem a necrose local, necrose sistêmica, queima do broto, enfezamento severo da planta e desfolhamento e, ocasionalmente, a morte da planta (Zheng *et al.*, 2006). Os sintomas podem ser mascarados sob temperaturas acima de 27°C, apesar de muitos cultivares de soja nunca expressarem sintomas severos, independentemente da temperatura (Conover, 1948; Walters, 1963; Irwin & Schultz, 1981).

Baseado na reação de cultivares diferenciadoras de soja, isolados de SMV têm sido classificados em numerosas estirpes (Cho & Goodman, 1979; Buzzel & Tu, 1984; Lim, 1985). Cho & Goodman (1979) classificaram 98 isolados de SMV obtidos a partir de sementes da coleção de germoplasma do

USDA em sete estirpes (G1-G7), com base na virulência em um conjunto de 8 cultivares diferenciadores. G1, a estirpe menos virulenta, não infecta nenhuma das cultivares. G7, a estirpe mais virulenta, infecta todas as cultivares e causa necrose em ‘Marshall’, ‘Ogden’, ‘Kwanggyo’ e ‘Buffalo’, e sintomas de mosaico em ‘Davis’ e ‘York’. Esse sistema de classificação tem sido utilizado na identificação das estirpes de SMV e na diferenciação dos alelos de resistência ao vírus (Chen *et al.*, 1991, 1993, 1994, 2001, 2002; Ma *et al.*, 1995, 2003; Gunduz *et al.*, 2001, 2002, 2004). Segundo Almeida *et al.* (2001), o grupo G1 é o mais comumente encontrado nas diferentes regiões produtoras de soja do Brasil. Entretanto, uma estirpe denominada SMV 95-1, pertencente ao grupo G5 (Almeida *et al.*, 1995), encontra-se atualmente disseminada no Brasil Central (Almeida *et al.*, 2001), causando nanismo e necrose sistêmica de cultivares anteriormente considerados resistentes.

O controle do mosaico comum da soja tem sido realizado por meio da utilização de cultivares resistentes (Kiihl & Hartwig, 1979), e vários genes de resistência à infecção pelo SMV já foram identificados (Cho & Goodman, 1979; Buzzell & Tu, 1984; Lim, 1985; Chen *et al.*, 1991; Jayaram *et al.*, 1992; Hill, 1999). Entretanto, a variabilidade genética do vírus tem promovido a “quebra” da resistência em diversos genótipos e, dessa forma, cultivares com excelentes qualidades agronômicas têm sido infectadas por novas estirpes do SMV. As estirpes que suplantam a resistência podem emergir devido à forte pressão de seleção que é criada quando os genes de resistência são empregados isoladamente (Cho & Chung, 1976; Cho *et al.*, 1977; Cho & Goodman, 1982). Uma forma de minimizar esse problema é empregar estratégias de controle baseadas na redução da taxa de progresso da doença, normalmente eficazes contra todas as estirpes de SMV. Essas estratégias permitem alguma infecção dentro de uma população de plantas, contudo a redução na taxa de disseminação do patógeno planta-a-planta minimiza os efeitos na produtividade e qualidade dos grãos (Parlevliet, 1979; Padgett *et al.*, 1990).

3. Gênero *Carlavirus*: aspectos na cultura da soja

3.1 Família *Flexiviridae*

As espécies do gênero *Carlavirus* (espécie-tipo: *Carnation latent virus*, CLV) fazem parte da família *Flexiviridae* (Brunt & Kenten, 1973). A família *Flexiviridae*, assim denominada porque seus membros apresentam vírions flexuosos, inclui os gêneros *Allexivirus*, *Capillovirus*, *Carlavirus*, *Foveavirus*, *Potexvirus*, *Trichovirus*, *Vitivirus* e *Mandarivirus*, assim como alguns vírus relacionados que não são classificados em qualquer um destes gêneros. As características gerais dos membros desta família incluem: (a) vírions de morfologia flexuosa; (b) genoma constituído por uma única molécula de RNA fita simples (ssRNA), sentido positivo, com uma cauda poliadenilada na extremidade 3'; (c) tradução de algumas ORFs a partir de RNAs subgenômicos (Galiakparov *et al.*, 2003); (d) número variável de ORFs, sempre incluindo uma RNA polimerase dependente de RNA (150-250 kDa) contendo os motivos metiltransferase, helicase e RdRp (Koonin & Dolja, 1993); (e) uma ou mais proteínas de movimento (MP); (f) uma única proteína capsidial (CP) (22-44 kDa); (g) uma sexta ORF em alguns vírus, a qual pode sobrepor parcialmente a extremidade 3' do gene *cp* e possui propriedade de ligação a nucleotídeos.

O gênero *Carlavirus* é caracterizado por vírions com morfologia flexuosa com aproximadamente 610-700 nm de comprimento e simetria helicoidal. O genoma é composto de ssRNA (7,4-8,5 kb) e compreende seis ORFs, codificando, em ordem, duas proteínas relacionadas à replicação, três MPs, a CP e uma proteína regulatória com propriedade de ligação a ácidos nucleicos. A gama de hospedeiros de espécies individuais é restrita a uma ou poucas espécies de plantas. A maioria das espécies são transmitidas por afídeos de modo não-circulativo. Entretanto, o *Cowpea mild mottle virus* (CpMMV) é transmitido pela mosca-branca *Bemisia tabaci*. Os vírus que infectam hospedeiros propagados vegetativamente persistem no material propagativo. Três dos vírus que infectam leguminosas (*Pea streak virus*, *Red clover vein mosaic virus* e CpMMV) são transmitidos pela semente. A maioria das espécies são transmitidas mecanicamente a um grande número de hospedeiros. Grande parte das espécies de carlavírus apresenta distribuição geográfica restrita, entretanto aqueles que infectam hospedeiros propagados vegetativamente são mais amplamente distribuídos (Adams *et al.*, 2004).

O principal critério para a demarcação de espécies no gênero *Carlavirus* é a análise da região central da CP (excluindo-se as extremidades amino e

carboxi). As CPs de diferentes espécies devem apresentar menos de 68% de identidade de sequência com outras espécies. Já as estirpes de uma mesma espécie viral apresentam 75-90% de identidade (Adams *et al.*, 2004).

3.2 *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV) na cultura da soja

Um novo vírus infectando feijoeiro (cv. Jalo) foi identificado em 1979, causando sintomas que se iniciavam como uma clorose nas nervuras de trifólios novos, seguindo-se um mosaico em manchas angulares em folhas mais velhas (Costa *et al.*, 1980). Este vírus era transmitido pela mosca branca *Bemisia tabaci*, provavelmente o biótipo A, já que o biótipo B ainda não havia sido relatado naquela época. Os sintomas sistêmicos na cv. Jalo se iniciavam aos dez dias após a inoculação, seja mecanicamente ou pelo inseto vetor (Costa *et al.*, 1980; Costa *et al.*, 1983). Plantas de soja inoculadas com o vírus apresentavam sintoma de mosqueado fraco e, em algumas cultivares, mosaico forte seguido de acronecrose, o que, na época, podia ser confundido com outra doença - o vírus causador da queima-do-broto; também se acreditava em efeito sinérgico desse vírus com outros vírus (Costa *et al.*, 1981). Isolados desse vírus foram coletados nos municípios de Assis, Campinas e Capão Bonito, no estado de São Paulo, e de Londrina, no estado do Paraná. Pelo sintoma característico na cv. Jalo foi-lhe conferido o nome de vírus do mosaico angular do feijoeiro Jalo (*Bean angular mosaic virus* - BAMV). Este vírus foi considerado proximamente relacionado, se não idêntico, ao *Cowpea mild mottle virus* (CpMMV) (Costa *et al.*, 1983). Posteriormente, Gaspar *et al.* (1985), realizando estudos sorológicos com anti-soros do CpMMV e do BAMV, demonstraram reação praticamente similar do antígeno do BAMV contra os dois anti-soros. Os resultados dos testes de microscopia eletrônica sorológico-específica (SSEM) confirmaram o relacionamento sorológico entre os dois vírus. Os autores concluíram que o BAMV era antigenicamente idêntico ao CpMMV, e deveria ser considerado como uma estirpe dessa espécie.

O CpMMV foi descrito pela primeira vez em caupi (*Vigna unguiculata* Walp.) (Brunt & Kenten, 1973). Posteriormente esse vírus foi detectado na Costa do Marfim, durante o verão de 1978, causando sintomas de mosaico e enrugamento nas folhas (Thouvenel *et al.*, 1982). Um isolado de CpMMV foi

descrito em tomateiro na Nigéria (Brunt & Phillips, 1981), com manifestação de sintomas denominados “*fuzzy vein*” e, em Israel, associado a sintomas de clorose pálida (Antignus & Cohen, 1987). Na Índia constatou-se infecção do CpMMV em amendoim, causando sintomas de clareamento de nervuras seguidos de curvatura, necrose de folhas e redução drástica de desenvolvimento (Iizuka *et al.*, 1984). O vírus já foi relatado em várias regiões tropicais da África e Ásia em uma grande variedade de espécies vegetais que incluem leguminosas e solanáceas (Iwaki *et al.*, 1982; Suryawanshi *et al.*, 1989; revisado por Jeyanandarajah & Brunt, 1993). Naidu *et al.* (1998) demonstraram, com base na análise da seqüência nucleotídica parcial e na comparação de seqüências de aminoácidos deduzidas com outros carlavírus, que o CpMMV é uma espécie do gênero *Carlavirus*. Os autores analisaram duas estirpes do CpMMV, as quais causavam sintomas severos (denominada CpMMV-S, de *severe*) e brandos (denominada CpMMV-M, de *mild*). A análise da região 3' do genoma viral revelou que ambos os isolados apresentavam 5 ORFs (P25, P12, P7, CP, e P11) na mesma organização. As ORFs P25, P12 e P7 formam um característico triplo bloco gênico (TGB, *triple gene block*) similar ao TGB presente no genoma de espécie dos gêneros *Carlavirus*, *Potexvirus*, *Hordeivirus* e *Furovirus*. Gaspar *et al.* (2008) relataram o uso de um oligonucleotídeo universal utilizado em conjunto com oligo-dT para a detecção de três espécies do gênero *Carlavirus*, entre elas o CpMMV.

Costa *et al.* (1983) inocularam mecanicamente plantas de feijão da cv. Carioca com o CpMMV, as quais não apresentaram redução na produtividade em grãos. Entretanto, plantas das cultivares Manteiga e Jalo apresentaram reduções de 25% e 31%, respectivamente. Na cultura da soja, quando se realizaram experimentos com oito variedades, foi verificada redução média de 16% na produtividade, com menor produção de vagens em relação às testemunhas não inoculadas. Apesar desse potencial para causar perdas elevadas, naquela época o dano econômico causado pelo CpMMV era muito pequeno, devido à baixa incidência de ocorrência desse vírus no campo (Costa *et al.*, 1983).

Na Argentina, o CpMMV já foi identificado em feijoeiro-comum na província de Salta (Rodríguez-Pardina *et al.*, 2004), onde grandes populações de *Bemisia tabaci* podem ser responsáveis pela transmissão do patógeno a

outras culturas. Partículas de carlavírus foram analisadas utilizando-se microscopia eletrônica e DAS-ELISA, comprovando-se a infecção pelo CpMMV (Rodríguez-Pardina *et al.*, 2004). Recentemente, foi relatada a ocorrência natural de plantas de soja infectadas pelo CpMMV na Argentina (Laguna *et al.*, 2006).

Bemisia tabaci foi relatada como espécie vetora do CpMMV por Iwaki *et al.* (1982) e Costa *et al.* (1983). Posteriormente, Thouvenel *et al.* (1982) demonstraram que o vírus é transmitido de modo não-circulativo. Brunt & Kenten (1973) verificaram a disseminação pelas sementes de caupi, feijoeiro e soja na região leste de Gana, África. Por outro lado, a partir de sementes de soja e feijão provenientes de plantas infectadas, foram produzidas plantas normais, demonstrando-se a não transmissão desse vírus pelas sementes (Costa *et al.*, 1983). Na época em que esses trabalhos de transmissão foram realizados, somente o biótipo A de *B. tabaci* estava presente no Brasil. Em 1991, Horn *et al.* (1991) já alertavam para um possível futuro aumento da incidência do CpMMV em soja, motivado pelo aumento de populações de *B. tabaci*.

Na safra 2000/2001, plantas de soja apresentando sintomas de nanismo (redução de crescimento) e necrose da haste foram observadas em grandes áreas na região Centro-Oeste brasileira (municípios de Goiatuba e Morrinhos, estado de Goiás). Devido à necrose da haste severa e à morte das plantas, acreditou-se inicialmente que os sintomas fossem resultado de uma infecção fúngica. Entretanto, todos os esforços no sentido de isolar e identificar um fungo a partir das raízes e hastes das plantas apresentando necrose foram mal sucedidos. Um novo surto ocorreu em 2001, afetando lavouras de soja em diferentes regiões (municípios de Acreúna, Quirinópolis, Porteirão e Luziânia, em Goiás; Sorriso em Mato Grosso; Barreiras na Bahia e Balsas no Maranhão), algumas destas distantes 2.000 km do local da primeira ocorrência. Recentemente a doença foi identificada em Palotina, estado do Paraná. Amostras de plantas infectadas foram enxertadas em plantas do cultivar Embrapa 63. Sintomas de mosaico, enfezamento e queima do broto se desenvolveram após duas a três semanas, sugerindo etiologia viral (Almeida *et al.*, 2005). A necrose da haste não é um sintoma comum em infecções virais, entretanto, a queima do broto tem sido associada, no Brasil e na Argentina, a

pelo menos três vírus (Costa, 1977; Anjos & Lin, 1984; Laguna *et al.*, 1988; Almeida, 1994). A confirmação de que se tratava de um carlavírus veio com análises moleculares, microscopia eletrônica de transmissão e purificação viral (Almeida *et al.*, 2005). A seqüência nucleotídica parcial obtida apresentou identidade elevada (84%) com um fragmento de 130 pb de CpMMV, sugerindo que este seja um isolado desta espécie, ou uma nova espécie relacionada. O trabalho de Almeida *et al.* (2005) constituiu o primeiro relato da transmissão de um carlavírus pelo biótipo B de *B. tabaci*.

4. Resistência a vírus mediada por RNA interferente

O silenciamento de RNA é um termo utilizado para descrever a redução da expressão gênica ao nível pós-transcricional de maneira seqüência-específica (Baulcombe, 2002; Ding, 2000). Dois grupos de pesquisadores relataram este fenômeno em plantas aproximadamente ao mesmo tempo (Napoli *et al.*, 1990; van der Krol *et al.*, 1990). Esforços para incrementar a pigmentação de antocianina em pétalas de flores de petúnias por meio da superexpressão do gene chalcona sintase (*chs*) resultaram em flores transgênicas apresentando redução parcial ou até mesmo total da pigmentação em níveis variados (Napoli *et al.*, 1990). A análise de expressão revelou que os mRNAs de *chs* - endógeno e transgene – foram reduzidos ou se encontravam até mesmo ausentes, indicando que o mecanismo, denominado co-supressão, havia sido ativado contra seqüências homólogas. Fenômenos similares foram descritos em nematóides, insetos, protozoários e fungos, sendo agrupados sob o termo geral de silenciamento de RNA ou RNAi (*RNA interference*, ou *interfering RNA*) (Cogoni & Macino, 2000). Existem vários processos de silenciamento de RNA já estudados, os quais apresentam em comum a presença de um RNA fita dupla (*double stranded*, dsRNA). A presença desse tipo de molécula pode induzir a degradação de RNAs mensageiros (mRNA) homólogos, um evento conhecido como silenciamento gênico pós-transcricional (*posttranscriptional gene silencing*, PTGS) ou silenciamento de RNA.

O silenciamento de RNA é um mecanismo conservado de regulação da expressão de mRNA em plantas, animais e fungos, caracterizado pela degradação de mRNAs endógenos/transgênicos no citoplasma, resultando na

redução da expressão gênica. Em plantas, o silenciamento de RNA controla inúmeros processos de desenvolvimento e é requerido para a regulação da acumulação viral. Existem dois aspectos importantes. Primeiro, o silenciamento dos mRNAs ocorre no citoplasma. Segundo, pequenas moléculas de RNA (21-25nts) são geradas a partir dos mRNAs alvos silenciados. Esses pequenos RNAs são classificados em diferentes classes com base nas diferenças em termos de biogênese e função: *small interfering RNA* (siRNA), *microRNA* (miRNA), *trans-acting siRNA* (ta-siRNA), *natural antisense transcript-derived siRNA* (natsiRNA) e *piwi-interacting RNA* (piRNA) (Chapman & Carrington, 2007).

Na rota dos siRNAs em plantas, o silenciamento é desencadeado por RNAs virais de fita simples altamente estruturados ou RNAs de fita dupla produzidos pelo hospedeiro ou pela RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) viral (Moissiard & Voinnet, 2006). Em plantas, as RdRp's RDR1 e RDR6 são requeridas para o silenciamento de vírus e transgenes (Dalmay et al., 2000; Mourrain et al., 2000; Xie et al., 2001). Essas RdRp's utilizam ssRNAs como moldes para a produção de dsRNA, o qual por sua vez serve como substrato para as enzimas *Dicer-like* (DCL, um tipo de RNase III). As DCLs (quatro enzimas distintas denominadas DCL1, DCL2, DCL3 e DCL4 em *Arabidopsis*) reconhecem e clivam dsRNA em pequenos RNAs de 21-25 nt de comprimento. Os siRNAs produzidos são então incorporados em complexos de silenciamento induzidos por RNA (*RNA-induced silencing complex*, RISC), os quais guiam a clivagem dos RNAs alvos. Alternativamente, eles podem ser acoplados a complexos de silenciamento transcricional induzidos por RNA (*RNA-induced transcriptional silencing complexes*, RITS) para direcionar o silenciamento da cromatina por meio da metilação de DNA e histonas. No RISC, os siRNAs mediam a ligação sequência-específica e a clivagem dos RNAs alvos (Baulcombe, 2004). Alternativamente, os siRNAs são usados como *primers* para a RdRp para a transcrição de RNAs alvos gerando dsRNAs adicionais e produzindo mais siRNAs. Essa atividade expande o *pool* de siRNAs e amplifica o silenciamento. Em plantas, as funções biológicas deste mecanismo incluem a regulação da expressão de genes endógenos, a formação de heterocromatina, a repressão de transposons e a defesa contra infecções virais (Waterhouse et al., 2001).

A primeira indicação do papel de dsRNA como um forte indutor dos silenciamento de RNA veio de estudos com o nematóide *Caenorhabditis elegans*. A injeção, embebição ou alimentação de *C. elegans* com dsRNA alvo foi suficiente para elicitar uma resposta de silenciamento eficaz e altamente específica (Fire *et al.*, 1998). A expressão de sequências senso e antisenso do mesmo gene gerando uma estrutura em forma de grampo de dsRNA promove o silenciamento mais efetivo em relação à expressão de transcritos senso ou antisenso isoladamente (Waterhouse *et al.*, 2001). Em plantas, o dsRNA é clivado em espécies de pequenos RNAs por diversas ribonucleases tipo III, com funções distintas. Evidências recentes de complementação funcional entre as diferentes DCLs de *Arabidopsis* sugerem que estas proteínas podem apresentar papéis intercambiáveis e sobrepostos nas rotas dos siRNAs e miRNAs (Bouche *et al.*, 2006; Deleris *et al.*, 2006).

Os miRNAs são gerados a partir do processamento de precursores maiores de miRNA (pre-miRNA) pela enzima DCL1 (Bartel, 2004). DCL 2 produz siRNAs derivados de RNAs virais (Xie *et al.*, 2004) e a partir de transcritos complementares relacionados a estresses abióticos (Borsani *et al.*, 2005). Além disso, possui função parcialmente redundante com DCL4 na síntese de ta-siRNAs com 22 nt, que atuam no silenciamento de genes endógenos (Xie *et al.*, 2005). DCL3 produz siRNAs com 24 nt a partir de seqüências repetidas e transposons, envolvidos na formação de heterocromatina (Xie *et al.*, 2004). DCL4 é a principal enzima envolvida na síntese de siRNAs a partir de repetições invertidas (Dunoyer *et al.*, 2005).

Outras proteínas, tais como HEN1, também atuam no processamento de siRNAs e miRNAs (Boutet *et al.*, 2003). Pequenos RNAs de 21 a 26 nts podem ser usados em um complexo tipo RISC em plantas para fornecer especificidade de seqüência para o silenciamento do mRNA alvo (Klahre *et al.*, 2002). Proteínas AGO se ligam a mRNAs e siRNAs efetores. AGO1 é responsável pelo recrutamento dos siRNAs e miRNAs ao complexo RISC em *Arabidopsis*, e possui atividade de RNase III, responsável pela clivagem dos mRNAs alvo (Baumberger e Baulcombe, 2005).

O silenciamento de RNA em plantas, o qual é funcionalmente similar ao RNAi em nematóides, ocorre em resposta a transgenes, transposons e infecções virais (Vance & Vaucheret, 2001; Waterhouse *et al.*, 2001;

Baulcombe, 2002). O padrão variegado da produção de antocianina na corola de petúnias devido à superexpressão de *chs* (Napoli *et al.*, 1990) é um exemplo deste tipo de silenciamento.

O silenciamento gênico transcricional (TGS) ocorre no núcleo e está correlacionado com a metilação do DNA e mudanças na acetilação de histonas e metilação (Matzke *et al.*, 2004). Mutantes de *Arabidopsis* defectivos em TGS foram isolados (Jeddeloh *et al.*, 1999; Mittlesten Scheid *et al.*, 1998) e mapeiam em genes que codificam proteínas remodeladoras da cromatina, incluindo DDM1 (*DNA deficient in methylation*) e MET1 (DNA metiltransferase) (Jeddeloh *et al.*, 1999; Finnegan & Dennis, 1993). Mudanças na estrutura da cromatina tornam o DNA inacessível à maquinaria de transcrição e, ao contrário do que ocorre no silenciamento pós-transcricional (PTGS), não há produção de mRNA. Evidência inicial sugeriu que o TGS seria resultado do pareamento de DNA (Bender, 1998), entretanto atualmente acredita-se que siRNAs são, de alguma maneira, guiados em direção às seqüências de DNA complementares (Wassenegger *et al.*, 1994; Matzke *et al.*, 2001). O TGS pode também funcionar protegendo as plantas contra os danos causados por transposons (Lippman *et al.*, 2003). Em plantas transgênicas, o TGS é frequentemente associado com a metilação de regiões promotoras (Aufsatz *et al.*, 2002), enquanto a região codificadora é frequentemente metilada no RNAi (Jones *et al.*, 1998b).

A regulação da expressão gênica mediada por miRNAs também ocorre pós-transcricionalmente (revisado em Baulcombe, 2004). Os miRNAs se ligam a mRNAs cognatos específicos de modo a destiná-los à clivagem ou reprimir sua tradução (Llave *et al.*, 2002). Os miRNAs são codificados *in trans* e são processados em fragmentos de 20-24 nt. Evidências sugerem que os miRNAs são importantes para a regulação espacial e temporal de genes relacionados ao desenvolvimento em plantas e animais (Kidner & Martienssen, 2004). Esta rota tem sido utilizada para o desenho de miRNAs artificiais (amiRNAs) cuja expressão em plantas transgênicas pode conferir resistência contra vírus vegetais (Niu *et al.*, 2006; Qu *et al.*, 2007).

Os vírus de plantas elicitam o silenciamento de RNA nos seus hospedeiros por meio da produção de intermediários do ciclo de replicação de dsRNA, de transcritos complementares que podem parear formando dsRNA,

ou devido à estrutura secundária do RNA viral. Em todos esses casos, ocorre a clivagem do dsRNA em siRNAs, que são direcionados para a clivagem do RNA viral (Marathe *et al.*, 2000; Ratcliff *et al.*, 1999).

Os geminivírus, que possuem genoma composto de DNA, interagem com a maquinaria de silenciamento de RNA em plantas diferentemente dos vírus com genoma de RNA (Muangsan *et al.*, 2004). A infecção pelo *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) apresenta uma fase de recuperação que é provavelmente o resultado da produção de siRNAs a partir de transcritos complementares do vírus. Entretanto, ao contrário dos vírus de RNA, seu genoma (composto de DNA) não é degradado. Folhas de mandioca e *N. benthamiana* demonstrando recuperação das infecções por ACMV e *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) apresentam um aumento na produção de siRNAs e um decréscimo correspondente no acúmulo de DNA viral (Chellappan *et al.*, 2004b).

Vanitharani *et al.* (2005) sugerem que dsRNA é produzido durante o ciclo de infecção dos geminivírus, desencadeando diretamente o silenciamento. O genoma dos geminivírus é constituído de DNA fita simples, entretanto eles produzem intermediários de dsDNA que servem como molde para a transcrição bidirecional dos genes virais (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). O pareamento de transcritos que se sobrepõem nas extremidades 3' é possível. Alternativamente, a presença anormal de elevados níveis de ssRNAs resultantes da transcrição de genes virais e seqüências silenciadas podem servir como moldes para a produção de dsRNA, mediada por RDR6 (Muangsan *et al.*, 2004; Robertson, 2004).

A capacidade dos vírus induzirem uma resposta de silenciamento em plantas tem sido utilizada no silenciamento de transcritos endógenos e transgenes. A clonagem de fragmentos de genes do hospedeiro em um vetor viral e a subsequente introdução do vetor no hospedeiro original desencadeia uma resposta de silenciamento contra o fragmento inserido, um processo denominado silenciamento gênico induzido por vírus (*virus-induced gene silencing*, VIGS) (Ruiz *et al.*, 1998). As seqüências inseridas devem apresentar regiões de, no mínimo, 23 nts para um transgene (Thomas *et al.*, 2001) ou 51 nts para um gene endógeno (Thomas *et al.*, 2001; Peele *et al.*, 2001). Vários vírus de RNA e DNA têm sido modificados para servirem como vetores VIGS, incluindo três membros do gênero *Begomovirus*: TGMV, ACMV e *Cabbage leaf*

curl virus (CaLCuV) (Robertson, 2004; Fofana *et al.*, 2004). A utilização de vetores virais proporciona um mecanismo epigenético que permite o estudo da função gênica e o silenciamento por meio de nocaute do mRNA, sem a necessidade de transformação genética da planta.

Um aspecto interessante a respeito do silenciamento em plantas é a proliferação e movimento de um sinal de silenciamento autônomo. Foi demonstrado que siRNAs se acumulam em tecido silenciado (Mlotshwa *et al.*, 2002), e são capazes de se movimentarem localmente, célula-a-célula e a longa distância (Ruiz-Medrano *et al.*, 2004). Himber *et al.* (2003) relatou que siRNAs de 21 nt gerados durante VIGS de GFP mediado por vírus de RNA são capazes de movimento a curtas distâncias (10-15 células). Eles também demonstraram que o movimento a longa distância depende de um mecanismo de revezamento da amplificação que requer RDR6 e SDE3 (uma RNA helicase). Os siRNAs podem ser regenerados a cada 10-15 células para a propagação do sinal de silenciamento ao longo da planta. Conforme mencionado anteriormente, Muangsan *et al.* (2004) demonstraram que RDR6 é requerida para a disseminação local do VIGS desencadeado por geminivírus.

O transporte de siRNAs pelo floema pode ser responsável pela disseminação do sinal sistêmico em plantas (Kim, 2005). Uma pequena proteína de ligação a RNA derivada do floema de *Cucurbita maxima* (CmPSRP1) foi isolada e demonstrada associar-se a siRNAs de 21-25 nt durante o silenciamento induzido por vírus e transgenes (Yoo *et al.*, 2004). Foi verificado que CmPSRP1 auxilia o movimento de ssRNA célula-a-célula e o movimento a longa distância ao longo do floema. O movimento de dsRNA não é facilitado por esta proteína, indicando que podem existir outras proteínas ainda não identificadas envolvidas no movimento de dsRNA. Outras proteínas de ligação a RNA de *Cucurbita* sp. também foram isoladas e foi demonstrado que auxiliam no transporte de viróides, porém ainda não está claro se estas possuem atividade de ligação a siRNA (Gomez & Pallas, 2004).

Como uma alternativa aos programas de melhoramento genético convencionais, a obtenção de plantas resistentes a vírus contendo transgenes derivados de vírus para a expressão da proteína capsidial, de movimento ou da replicase (funcional ou modificada), tem sido relatada com diferentes graus de sucesso. No caso dos vírus de genoma composto por ssDNA, como os

geminivírus, plantas contendo versões de diferentes genes virais, mas principalmente do gene *Rep*, têm sido descritas apresentando diferentes graus de resistência (Day *et al.*, 1991; Bejarano & Lichtenstein, 1994; Aragão *et al.*, 1996; Noris *et al.*, 1996; Bendahmane & Gronenborn, 1997; Asad *et al.*, 2003; Lucioli *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2004; Chellappan *et al.*, 2004a). Day *et al.* (1991) mostraram a eficiência parcial da estratégia de RNA antisense do gene *Rep* para o TGMV em plantas transgênicas de fumo. Aragão *et al.* (1998) utilizaram a estratégia antisense dos genes *Rep* e *MP* do BGMV em feijoeiro. Foi demonstrada a expressão do RNA correspondente em baixos níveis, resultando no retardamento do aparecimento da doença e no decréscimo da incidência de mosaico, em condições de pressão moderada de mosca branca.

A essencialidade da proteína REP e sua interação específica com a origem de replicação dos geminivírus conduziram a novas tentativas de obter plantas transgênicas altamente resistentes ou imunes, por meio da produção de uma proteína REP não funcional a qual interferiria com a ligação da proteína normal ao sítio de iniciação da replicação (Hanson *et al.*, 1995). Esta estratégia, denominada de “transdominância letal”, caracteriza-se por uma mutação letal na proteína REP no sítio de ligação de NTPs (substituição do resíduo de ácido aspártico na posição 262 por um resíduo de arginina), o que inibe a replicação do vírus em um sistema que depende da proporção relativa entre a concentração da proteína viral mutante e a nativa. A resistência ao BGMV, avaliada pela incidência de doença, foi significativa em uma das linhagens transgênicas, mas dependente do número de insetos utilizados na inoculação e da duração da exposição aos insetos virulíferos (Faria *et al.*, 2006). Brunetti *et al.* (1997) foram os primeiros a relatarem a obtenção de tomateiro transgênico com resistência ao TYLCSV por meio da expressão de cópias truncadas do gene *Rep*. Estas plantas, entretanto, não eram apropriadas para cultivo comercial, devido ao fenótipo de enrolamento foliar associado com o elevado acúmulo do produto do transgene. Linhagens transgênicas de tomateiro expressando a CP do TYLCV demonstraram atraso na manifestação dos sintomas e recuperação da doença após inoculação por mosca-branca (Kunik *et al.*, 1994). Yang *et al.* (2004) demonstraram resistência e imunidade contra o TYLCV em linhagens transgênicas de tomateiro expressando cópias truncadas do gene *Rep*. As plantas não demonstraram

sintomas e o DNA viral não foi detectado após os desafios realizados em condições de campo (Yang *et al.*, 2004).

A resistência mediada por RNA (dependente do silenciamento de RNA) pode oferecer proteção contra uma grande variedade de vírus de DNA e RNA. Ao se comparar com a resistência mediada pela expressão da proteína capsidial, a proteção mediada por RNA possibilita um maior nível de resistência viral (Lomonossoff, 1995). Entretanto, este tipo de resistência é normalmente eficaz apenas contra vírus apresentando sequências altamente relacionadas (Baulcombe, 1996), o que é um fator negativo para a resistência viral nas culturas. Infecções por vírus distintos com sequências não relacionadas podem superar a resistência mediada por RNA porque o silenciamento será atenuado/inibido pelo supressor de silenciamento do vírus não relacionado (Niu *et al.*, 2006). Para uma aplicação prática da estratégia, portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de um sistema que confira amplo espectro de resistência no campo.

Jean *et al.* (2000) contruíram um transgene quimérico simples com sequências derivadas de dois vírus distintos, o potyvírus *Turnip mosaic virus* (TuMV) e o tospovírus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). A expressão desse transgene conferiu resistência mediada por RNA contra espécies não relacionadas. Similarmente, Bucher *et al.* (2006) demonstraram que plantas de tomateiro expressando um único e pequeno RNA *hairpin* quimérico compreendendo 4 segmentos do gene N (150 nt) de diferentes tospovírus (TSWV; *Groundnut ringspot virus*, GRSV; *Tomato chlorotic spot virus*, TCSV; e *Watermelon silver mottle virus*, WSMoV) apresentaram amplo espectro de resistência contra tospovírus. Em dois casos envolvendo resistência ao begomovírus *Cotton leaf curl Multan virus* (CLCuMV) em plantas de fumo (Asad *et al.*, 2003) e a diversos begomovírus causadores de mosaico em mandioca (Chellappan *et al.*, 2004a), o silenciamento de RNA foi descrito como o mecanismo responsável pela resistência.

A noção de que o silenciamento de RNA é responsável pela resistência (Baulcombe, 1996) e o reconhecimento que dsRNA e siRNA eram peças-chaves nesse processo (Waterhouse *et al.*, 1998; Hamilton & Baulcombe, 1999) levou à utilização de construções tipo *intron-hairpin* (ihpRNA) para a produção direta de um dsRNA que induz eficientemente o silenciamento gênico

e a resistência a vírus (Smith *et al.*, 2000; Kalantidis *et al.*, 2002; Pooggin *et al.*, 2003). Foi sugerido que a estrutura *intron-harpin* pode aumentar a estabilidade e eficiência na formação do dsRNA, induzindo o silenciamento de tal forma que a planta se torna imune ao vírus. A estratégia ihpRNA foi empregada com sucesso na proteção contra os potyvírus *Potato virus Y* (PVY) e *Plum pox virus* (PPV) e contra o luteovírus *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) (Smith *et al.*, 2000; Pandolfini *et al.*, 2003). Uma construção similar foi utilizada contra o begomovírus *Vigna mungo yellow mosaic virus* (VmYMV) em plantas de *Vigna mungo* (Poggin & Hohn, 2004). Neste estudo, a construção foi liberada de forma transiente nas folhas por biobalística, e as plantas se recuperaram totalmente da infecção.

Fuentes *et al.* (2006) desenvolveram linhagens transgênicas de tomateiro a partir de uma construção ihpRNA designada para induzir silenciamento contra o gene que codifica a proteína associada à replicação (C1) do TYLCV. A região-alvo consistiu em 726 nucleotídeos da extremidade 3' do gene C1. Plantas transgênicas oriundas da linhagem 126, contendo uma única cópia do transgene, demonstraram imunidade ao TYLCV, mesmo sob extremas condições de infecção. Este trabalho consistiu o primeiro relato de obtenção de plantas resistentes a um vírus de DNA a partir da estratégia de ihpRNA. Os autores verificaram uma correlação entre o padrão de integração do transgene e os níveis de resistência obtidos em diferentes eventos de transgenia, por meio da caracterização genômica de plantas representativas de comportamentos contrastantes. Foi observado que a progênie de uma linhagem que apresentava 100% de plantas imunes apresentou um padrão de cópia única do transgene, enquanto plantas derivadas de outra linhagem com padrão multicópia apresentaram fenótipo variável entre resistência e suscetibilidade. Isto pode ser consequência do silenciamento transcricional do transgene, pois foi demonstrado que (trans)genes repetidos em plantas podem ser inativados por metilação desde que eles sejam capazes de se parear (Matzke & Matzke, 1995). Os autores, portanto, verificaram uma correspondência ambígua entre o número de cópias integradas e o nível de proteção das linhagens transgênicas. O sítio de integração do transgene pode resultar em uma produção diferente dos transcritos correspondentes (Gallie, 1998), causando, em alguns casos, quantidade insuficiente de ihpRNA para ser

processado pela proteína DCL4, para a produção de siRNAs e para conferir resistência.

Bonfim *et al.* (2007) utilizaram uma construção ihpRNA contendo parte do gene que codifica a proteína capsidial para a transformação de plantas de feijoeiro e, de um total de 18 plantas transgênicas obtidas, duas apresentaram imunidade ao BGMV. Testes de progênies avançadas indicaram que, sob uma densidade populacional de mais de 300 moscas-brancas virulíferas por planta, em contato com as linhagens transgênicas por todo o ciclo de vida das plantas, 92,7 % permaneceram sem sintomas (Bonfim *et al.*, 2007).

LITERATURA CITADA

- Adams, M.J., Antoniw, J.F., Fauquet, C.M. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. *Archives of Virology*, v. 150, p. 459-479. 2005.
- Adams, M.J., Antoniw, J.F., Bar-Joseph, M., Brunt, A.A., Candresse, T., Foster, G.D., Mertelli, G.P., Milne, R.G., Fauquet, C.M. The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology*, v. 149, p. 1045-1060. 2004.
- Ambrozevicius, L.P., Calegario, R.F., Fontes, E.P.B., Carvalho, M.G., Zerbini, F.M. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 27, p. 372-377, 2002.
- Almeida, A.M.R., Miranda, L.C. Ocorrência do vírus do mosaico comum da soja no estado do Paraná e sua transmissibilidade por semente. *Fitopatologia Brasileira*, v. 4, p. 293-297. 1979.
- Almeida, A.M.R. Virus diseases. *In: Tropical soybean: Improvement and production*. Roma: FAO. pp. 65-74. 1994.
- Almeida, J.D., Galvão, R.M., Zerbini, F.M., Fontes, E.P.B. Molecular characterization of novel tomato and Sida-infecting geminiviruses. *Brazilian Journal of Genetics*, v. 20. p. 255-255. 1997.
- Almeida, A.M.R., Almeida, L.A., Kiihl, R.A.S. Seleção de genótipos de soja resistentes a duas estirpes de *Soybean mosaic virus*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 26, p. 99. 2001.
- Almeida, A.M.R., Almeida, L.A., Kiihl, R.A.S., Domit, L.A. Identification of a new strain of the *Soybean mosaic virus* in Brazil. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v. 38, p. 1095-1100. 1995.
- Almeida, A.M.R., Piuga, F.F., Marin, S.R.R., Kitajima, E.W., Gaspar, J.O., Oliveira, T.G., Moraes, T.G. Detection and partial characterization of a carlavirus causing stem necrosis of soybean in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 30, p. 191-194. 2005.

- Almeida, A.M.R., Yuki, V., Costa Val, W.M., Harada, A., Pola, J.N., Turkiewsky, L. Epidemiological studies on *Soybean mosaic virus* in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 19, p. 401-407. 1994.
- Almeida, J.A., Galvão, R.M., Zerbini, F.M., Fontes, E.P.B. A new geminivirus identified in the *Sida rhombifolia*-infecting geminivirus complex is probably monopartite. *Brazilian Journal of Genetics*, v. 20, p. G38. 1997.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, v. 25, p. 3389-3402. 1997.
- Anjos, J.R.N., Lin, M.T. Bud blight of soybeans caused by cowpea severe mosaic virus in Central Brazil. *Plant Disease*, v. 68, p. 405-407. 1984.
- Aragão, F.J.L., Barros, L.M.G., Brasileiro, A.C.M., Ribeiro, S.G., Smith, F.D., Sanford, J.C., Faria, J.C., Rech, E.L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 93, p.142-150. 1996.
- Aragão, F.J.L., Sarokin, L.; Vianna, G. R., Rech, E.L. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 101, p. 1-6. 2000.
- Aragão, F.J.L., Brasileiro, A.C.M., Ribeiro, S.G., Faria, J.C., Rech, E.L. Inoculation of bean and soybean with cloned Bean golden mosaic virus (BGMV) DNA using particle acceleration. *Fitopatologia Brasileira*, v. 20, p. 642-644. 1995.
- Asad, S., Haris, W.A, Bashir, A., Zafar, Y., Malik, K.A., Malik, N.N., Lichtenstein, C.P. Transgenic tobacco expressing geminiviral RNAs are resistant to the serious viral pathogen causing cotton leaf curl disease. *Archives of Virology*, v. 148, p. 2341-2352. 2003.
- Aufsatz W., Mette M.F., Van Der Winden J., Matzke A.J., Matzke, M. RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 4, p. 16499-16506. 2002.
- Baliji, 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*, v. 94. p. 772-779. 2004.
- Barbosa, M.Z., Assumpção, R. Ocupação territorial da produção e da agroindústria da soja no Brasil, nas décadas de 80 e 90. *Informações Econômicas*, v.31, p.7-16. 2001.
- Barros, D.R., Lima, A.T.M., Fernandes, J.J., Carvalho, M.G., Zerbini, F.M. Expression in *Escherichia coli* of the AC5 ORF from *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), and production of an AC5-specific antiserum. *Virus Reviews and Research*, v. 8, p. 193. 2003.
- Barros, D.R., Lima, A.T.M., Fernandes, J.J., Carvalho, M.G., Zerbini, F.M. Immunolocalization of the AC5 protein of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) in *Nicotiana benthamiana*. *Program and Abstracts, 4th International*

- Geminivirus Symposium and 2nd International ssDNA Comparative Virology Workshop, Cape Town, South Africa. p. 2-10. 2004.
- Basso, J., Dallaire, P., Charest, P.J., Devantier, Y., Laliberte, J.F. Evidence for an internal ribosome entry site within the 5' non-translated region of turnip mosaic potyvirus RNA. *Journal of General Virology*, v. 75, p. 3157-3165. 1994.
- Baulcombe, D.C. RNA silencing. *Current Biology*, v. 12, p. R82-R84. 2002.
- Baulcombe, D.C. RNA as a target and an initiator of posttranscriptional gene silencing in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*, v. 32, p. 79-88. 1996.
- Baulcombe, D.C. RNA silencing in plants. *Nature* v. 431, p. 356-363. 2004.
- Baumberger, N., Baulcombe, D.C. Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 102, p. 11928-11933. 2005.
- Bejarano, E.R., Lichtenstein, C.P. Expression of TGMV antisense RNA in transgenic tobacco inhibits replication of BCTV but not ACMV geminiviruses. *Plant Molecular Biology*, v. 24, p. 241-248. 1994.
- Bendahmane, M., Gronenborn, B. Engineering resistance against tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) using antisense RNA. *Plant Molecular Biology*, v. 33, p. 351-357. 1997
- Bender, J. Cytosine methylation of repeated sequences in eukaryotes: the role of DNA pairing. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 23, p. 252-256. 1998.
- Bento, J.M.S. Perdas por insetos na agricultura. *Ação ambiental*, v. 4, p. 19-21. 1999.
- Berger, P.H., Adams, M.J., Barnett, O.W., Brunt, A.A., Hammond, J., Hill, J.H., Jordan, R.L., Kashiwazaki, S., Rybicki, E.P., Spence, N., Stenger, D.C., Ohki, S.T., Uyeda, I., Van Zaayen, A., Valkonen, J.P., Vetten, H.J. Family *Potyviridae*. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego. Elsevier Academic Press. 2005.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., Hannon, G.J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, v. 409, p. 363-366. 2001.
- Bonato, E.R., Bonato, A.L.V. *A soja no Brasil: história e estatística*. Londrina: Embrapa-CNPSo. 61p. 1987.
- Bonfim, K., Faria, J.C., Nogueira, E.O., Mendes, E.A., Aragão, F.J. RNAi-mediated resistance to *Bean Golden Mosaic Virus* in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Molecular Plant Microbe Interactions*, v. 20, p. 717-726. 2007.
- Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P.E., Sunkar, R., Zhu, J.-K. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell*, v. 123, p. 1279-1291. 2005.
- Boiteux, L.S., Inoue-Nagata, A.K., Mendonça, J.L., Ávila, A.C., Giordano, L.B., Fonseca, M.E.N. Caracterização molecular de um isolado distinto de

- Begomovirus* infectando *Physalis angulata*. Fitopatologia Brasileira, v. 28, p. 247. 2003.
- Boutet, G., Vazquez, F., Liu, J., Beclin, C., Fagard, M., Gratias, A., Morel, J.B., Crete, P., Chen X., Vaucheret, H. Arabidopsis HEN1: A genetic link between endogenous miRNA controlling development and siRNA controlling transgene silencing and virus resistance. Current Biology, v. 13, p. 843-848. 2003.
- Briddon, R.W. Cotton leaf curl disease, a multicomponent begomovirus complex. Molecular Plant Pathology, v. 4, p. 427-434. 2003.
- Briddon, R.W., Pinner, M.S., Stanley, J., Markham, P.G. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. Virology, v. 177, p.85-94. 1990.
- Briddon, R.W., Bedford, I.D., Tsai, J.H. e Markham, P.G. Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, tomato pseudo-curly top virus, suggests a recombinant origin. Virology, v.219, p.387-394. 1996.
- Brown, J.B., Bird, J. Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. Plant Disease, v. 76, p. 220-225. 1992.
- Brunetti, A., Tavazza, M., Noris, E., Tavazza, R., Caciagli, P., Ancora, G., Crespi, S., Accotto, G.P. High expression of truncated viral Rep protein confers resistance to tomato yellow leaf curl virus in transgenic tomato plants. Molecular Plant Microbe Interactions, v. 10, p. 571-579. 1997.
- Brunt, A.A., Kenten, R.H. Cowpea mild mottle, a newly recognized virus infecting cowpea (*Vigna unguiculata*) in Ghana. Annals of Applied Biology, v. 74, p. 67-74. 1973.
- Bryant, G.R., Hill J.H., Bailey T.B., Tachibana H., Durand D.P., Benner, H.I. Detection of soybean mosaic virus in seed by solid-phase radioimmunoassay. Plant Disease, v. 66, p. 693-695. 1982.
- Bucher, E., Lohuis, D., van Poppel, P.M., Geerts-Dimitriadou, C., Goldbach, R., Prins, M. Multiple virus resistance at a high frequency using a single transgene construct. Journal of General Virology, v. 87, p. 3697–3701. 2006.
- Buzzell, R.I., Tu, J.C. Inheritance of soybean resistance to soybean mosaic virus. Journal of Heredity, v. 75, p. 82. 1984.
- Calegario, R.F., Ferreira, S.S., Andrade, C., Zerbini, F.M. Caracterização de um isolado do begomovírus *Sida Micrantha Mosaic Virus* (SimMV) obtido de tomateiro. Fitopatologia Brasileira, v. 29, p. 150. 2004.
- Callaway, A., Giesman-Cookmeyer, D., Gillock, E.T., Sit, T.L., Lommel, S.A. The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. Annual Review of Phytopathology, v. 39, p. 419-456. 2001.
- Castillo-Urquiza, G.P., Beserra Jr, J.E.A., Bruckner, F.P., Lima, A.T.M., Varsani, A., Alfenas-Zerbini, P., Zerbini, F.M. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. Archives of Virology, v. 153, p. 1985-1989. 2008.

- Chellappan P., Masona M.V., Vanitharani R., Taylor N.J., Fauquet, C.M. Broad spectrum resistance to ssDNA viruses associated with transgene-induced gene silencing in cassava. *Plant Molecular Biology*, v. 56, p. 601-611. 2004a.
- Chellappan, P., Vanitharani, R., Fauquet, C.M. Short interfering RNA accumulation correlates with host recovery in DNA virus-infected hosts, and gene silencing targets specific viral sequences. *Journal of Virology*, v. 78, p. 7465-7477. 2004b.
- Chen, P., Buss, G.R., Tolin, S.A. Resistance to soybean mosaic virus conferred by two independent dominant genes in PI 486355. *Journal of Heredity*, v. 84, p. 25-28, 1993.
- Chen, P., Buss, G.R., Roane, C.W., Tolin, S.A. Allelism among genes for resistance to soybean mosaic virus in strain-differential soybean cultivars. *Crop Science*, v. 31, p. 305-309. 1991.
- Chen, P., Buss, G.R., Roane, C.W., Tolin, S.A. Inheritance in soybean of resistant and necrotic reactions to soybean mosaic virus strains. *Crop Science*, v. 34, p. 414-422. 1994.
- Chen, P., Buss, G.R., Tolin, S.A., Gunduz, I., Cicek, M. A valuable gene in Suweon 97 soybean for resistance to soybean mosaic virus. *Crop Science*, v. 42, p. 333-337. 2002.
- Chen, P., Ma, G., Buss, G.R., Gunduz, I., Roane, C.W., Tolin, S.A. Inheritance and allelism tests of Raiden soybean for resistance to soybean mosaic virus. *Journal of Heredity*, v. 92, p. 51-55, 2001.
- Cho, E.K., Chung, B.J. Studies on identification and classification of soybean virus diseases. I. Preliminary studies on a soybean virus disease. *Korean Journal of Plant Protection*, v. 15, p. 61-68. 1976.
- Cho, E.K., Goodman, R.M. Field spread of soybean mosaic virus strains. *Korean Journal of Plant Protection*, v. 21, p. 53-60. 1982.
- Cho, E.K., Goodman, R.M. Strains of soybean mosaic virus: Classification based on virulence in resistant soybean cultivars. *Phytopathology*, v. 69, p. 467-470. 1979.
- Cho, E.K., Chung, B.J., Lee, S.H. Studies on identification and classification of soybean virus disease in Korea. II. Etiology of a necrotic disease of *Glycine max*. *Plant Disease Reporter*, v. 61, p. 313-317. 1977.
- Cogoni, C., Macino, G. Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Current Opinion in Genetics, Development*, v. 10, p. 638-43. 2000.
- CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: grãos: quarto levantamento. Brasília. 39p. 2009.
- Conover, R.A. Studies of two viruses causing mosaic diseases of soybean. *Phytopathology*, v. 38, p. 724-735. 1948.
- Costa, A.S. Whitefly-transmitted plant disease. *Annual Review of Phytopathology*, v. 16, p. 429-447. 1976.
- Costa, A.S., Bennett, C.W. Whitefly-transmitted mosaic of *Euphorbia prunifolia*. *Phytopathology*, v. 40, p. 266-283. 1950.

- Costa, A.S. Investigações sobre moléstias da soja no estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica*, v. 3, p. 3-30. 1977.
- Costa, A.S. Three whitefly-transmitted virus diseases of beans in São Paulo, Brazil. *FAO Plant Protection Bulletin*, v. 13, p. 2-12. 1965.
- Costa, A.S., Miranda, M.A.C., Almeida, A.M.R. Ocorrência de infecção natural de certas cultivares de soja com o vírus do mosaico dourado do feijoeiro. *Semin. Nac. de Pesq. de Soja*, I, Anais. Vol. II, p. 145-150. 1979.
- Costa, A.S. Studies on *Abutilon* mosaic in Brazil. *Phytopathologische Zeitschrift*, v. 24, p. 97-112. 1955.
- Costa, A. S., Carvalho, A. M. Mechanical transmission and properties of the abutilon mosaic virus. *Phytopathologische Zeitschrift*, v. 37, p. 259-272.
- Costa, A.S., Gaspar, J.O., Vega, J. Mosaico angular do feijoeiro Jalo causado por um carlavírus transmitido pela mosca branca *Bemisia tabaci*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 8, p. 325-337. 1983.
- Costa, A.S., Miranda, M.A.C., Almeida, A.M.R. Ocorrência de infecção natural de certas cultivares de soja com o vírus do mosaico dourado do feijoeiro. *Anais, I Seminário Nacional de Pesquisa de Soja, Paraná, Brasil*. p. 145-150. 1979.
- Davies, J.W., Stanley, J., Donson, J., Mullineaux, P.M., Boulton, M.I. Structure and replication of geminivirus genomes. *Journal of Cell Science*, v. 7, p. 95-107. 1987.
- Day, A.G., Bejarano, E.R., Buck, K.W., Burrell, M., Lichtenstein, C.P. Expression of an antisense viral gene in transgenic tobacco confers resistance to the DNA virus tomato golden mosaic virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 88, p. 6721-6725. 1991.
- Demski, J.W., Jellum, M.D. Single and double virus infection of soybean: Plant characteristics and chemical composition. *Phytopathology*, v. 65, p. 1154-1156. 1975.
- Desbiez, C., David, C., Mettouchi, A., Laufs, J., Gronenborn, B. Rep protein of tomato yellow leaf curl geminivirus has an ATPase activity required for viral DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 92, p. 5640-5644. 1995.
- Dhingra, K.L., Chenulu, V.V. Effect of soybean mosaic virus on yield and nodulation of soybean cv. Bragg. *Indian Phytopathology*, v. 33, p. 586-590. 1980.
- Ding, S.W. RNA silencing. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 11, p. 152-156. 2000.
- Dong, X., Van Wezel, R., Stanley, J., Hong, Y. Functional characterization of the nuclear localization signal for a suppressor of post-transcriptional gene silencing. *Journal of Virology*, v. 77, p. 7026-7033. 2003.
- Dunoyer, P., Himber, C., Voinnet, O. DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. *Nature Genetics*, v. 37, p. 1356-1360. 2005.

- Eagle, P.A., Orozco, B.M., Hanley-Bowdoin. A DNA sequence required for geminivirus replication also mediates transcriptional regulation. *Plant Cell*, v. 6, p. 1157-1170. 1994.
- El-Amrety, A.A., El-Said, H.M., Salem, D.E. Effect of soybean mosaic virus infection on quality of soybean seed. *Agricultural Research*, v. 63, p. 155-164. 1985.
- 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*, v. 10, p. 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 of General Virology*, v. 72, p. 1005-1012. 1991.
- FAO, 2006. <http://faostat.fao.org/site/381/default.aspx>.
- Fargette, D., Fauquet, C., Thouvenel, J.C. Yield losses induced by African cassava mosaic virus in relation to the mode and date of infection. *Tropical Pest Management*, v. 34, p. 89-91. 1988.
- Fargette, D., Jeger, M., Fauquet, C. e Fishpool, L.D.C. Analysis of temporal disease progress of African cassava mosaic virus. *Phytopathology*, v. 84, p. 91-98. 1993.
- Faria, J.C., Maxwell, D.P. Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. *Phytopathology*, v. 89, p. 262-268. 1999.
- Faria, J.C. Mosaico Dourado. In: Sartorato, A., Rava, C.A. (Ed.). Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle. Brasil. Embrapa. pp. 263-284. 1994.
- Faria, J.C., Bezerra, I.C., Zerbini, F.M., Ribeiro, S.G., Lima, M. F. Situação atual das geminiviroses no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 25, p. 125-137. 2000.
- Fernandes, A.V., Andrade, E.C., Alfenas, P.F., Galvão, R.M., Zerbini, F.M., Fontes, E.P.B. Clonagem e caracterização de novos geminivírus que infectam *Sida rhombifolia*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 23, p. 317. 1998.
- Fernandes, A.V., Galvão, R.M., Machado, J.J., Zerbini, F.M., Fontes, E.P.B. Cloning and molecular characterization of A components of two new *Sida rhombifolia*-infecting geminiviruses. *Virus Reviews and Research*, v. 4(Suppl.), p. 148. 1999.
- Fernandes, J.J.; Zerbini, F.M. Simultaneous detection of the genomic components of TGV-Ub, a *Begomovirus* isolated from tomatoes at Triângulo Mineiro, Brazil, in *Nicandra physaloides* and *Phaseolus vulgaris*. *Virus Reviews and Research*, v. 5(Suppl.), p. 193. 2000.
- 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 Genes*, v. 36, p. 251-258. 2008.
- Fonseca, M.E.N., Boiteux, L.S., Inoue-Nagata, A.K., Camargo, A.M., Dutra, W.P., Giordano, L.B., Ávila, A.C. Análise de um isolado de *Begomovirus*

- obtido de *Malva parviflora* no Brasil Central. Fitopatologia Brasileira, v. 28, p. 248. 2003a.
- Fonseca, M.E.N., Inoue-Nagata, A.K., Camargo, A.M., Dutra, W.P., Ávila, A.C, Giordano, L.B., Boiteux, L.S. Análise molecular de um isolado de begomovírus infectando amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*) no Brasil Central. Fitopatologia Brasileira, v. 28, p. 248. 2003b.
- Fontes, E.P.B., Eagle, P.A., Sipe, P.S., Luckow, V.A., Hanley-Bowdoin, L. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. Journal of Biological Chemistry, v. 269, p. 8459-8465. 1994a.
- Fontes, E.P.B., Gladfelter, H.J., Schaffer, R.L., Petty, I.T.D., Hanley-Bowdoin, L. Geminivirus replication origins have a modular organization. Plant Cell, v. 6, p. 405-416. 1994b.
- Fontes, E.P.B., Luckow, V.A., Hanley-Bowdoin, L. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. Plant Cell, v. 4, p. 597-608. 1992.
- Finnegan, E.J., Dennis E.S. Isolation and identification by sequence homology of a putative cytosine methyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. Nucleic Acids Research, v. 21, p. 2383-2388. 1993.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature, v. 391, p. 806-811. 1998.
- Fofana, I.B., Sangare, A., Collier, R., Taylor, C., Fauquet, C.M. A geminivirus induced gene silencing system for gene function validation in cassava. Plant Molecular Biology, v. 56, p. 613-624. 2004.
- Fontes, E.P.B., Luckow, V.A., Hanley-Bowdoin, L. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. Plant Cell, v. 4, p. 597-608. 1992.
- Fontes, E.P.B., Eagle, P., Sipes, P., Hanley-Bowdoin, L.. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for replication. Journal of Biological Chemistry, v. 269, p. 8459-8465. 1994.
- Fontes, E.P.B., Gladfelter, H., Schaffer, R.L., Petty, I.T.D., Hanley-Bowdoin, L. 1994. Geminivirus replication origins have a modular organization. Plant Cell, v. 6, p. 405-416. 1994.
- Frischmuth, T., Zimmat, G., Jeske, H. The nucleotide sequence of Abutilon mosaic virus reveals prokaryotic as well as eukaryotic features. Virology, v. 178, p. 461-468. 1990.
- Fuentes, A., Ramos, P.L., Fiallo, E., Callard, D., Sánchez, Y., Peral, R., Rodríguez, Pujol, M. Intron-hairpin RNA derived from replication associated protein C1 gene confers immunity to Tomato Yellow Leaf Curl Virus infection in transgenic tomato plants. Transgenic Research, v. 15, p. 291-304. 2006.
- Galiakparov, N., Goszczynski, D.E., Che, X., Batuman, O., Bar-Joseph, M., Mawassi, M. Two classes of subgenomic RNA of *Grapevine virus A* produced by internal controller elements. Virology, v. 312, p. 434-448. 2003.

- Gallie, D.R. Controlling gene expression in transgenics. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 1, p. 166-172. 1998.
- Gallie, D.R., Tanguay, R.L., Leathers, V. The tobacco etch viral 5' leader and poly(A) tail are functionally synergistic regulators of translation. *Gene*, v. 165, p. 233-238. 1995.
- 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. Program and Abstracts, 2nd International Workshop on Bemisia and Geminiviral Diseases, San Juan, Puerto Rico. p. L-93. 1998.
- Gardner, M.W., Kendrick, J.B. Soybean mosaic. *Journal of Agricultural Research*, v. 22, p. 111-114. 1921.
- Gaspar, J.O., Beriam, L.O.S., Alves, M.N., Oliveira, A.R., Costa, A.S. Serological identity of bean angular mosaic and cowpea mild mottle viruses. *Fitopatologia Brasileira*, v. 10, p. 195-199. 1985.
- Gaspar, J.O., Belintani, P., Almeida, A.M.R., Kitajima, E.W. A degenerate primer allows amplification of part of the 3'-terminus of three distinct carlavirus species. *Journal of Virological Methods*, v. 148, p. 283-285. 2008.
- Gilbertson, R.L., Faria, J.C., Hanson, S.F., Morales, F.J., Ahlquist, P.G., Maxwell, D.P., Russell, D.R. Cloning of the complete DNA genomes of four bean-infecting geminiviruses and determining their infectivity by electric discharge particle acceleration. *Phytopathology*, v. 81, p. 980-985. 1991.
- Goldbach, R., Bucher, E., Prins, M. Resistance mechanisms to plant viruses: an overview. *Virus Research*, v. 92, p. 207-212. 2003.
- Gomez, G., Pallas, V. A long-distance translocatable phloem protein from cucumber forms a ribonucleoprotein complex in vivo with Hop stunt viroid RNA. *Journal of Virology*, v. 78, p. 10104-10110. 2004.
- Grimsley, N., Hohn, B., Hohn, T., Walden, R. "Agroinfection", an alternative route for viral infection of plants by using the T-DNA plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 83, p. 3282-3286. 1986.
- Gröning, B.R., Hayes, R.J., Buck, W. Simultaneous regulation of tomato golden mosaic virus coat protein and AL1 gene expression: expression of the AL4 gene may contribute to suppression of the AL1 gene. *Journal of General Virology*, v. 75, p. 721-726. 1994.
- Gunduz, I., Buss, G.R., Chen, P., Tolin, S.A. Characterization of SMV resistance genes in Tusan 140 and Hourei soybean. *Crop Science*, v. 42, p. 90-95. 2002.
- Gunduz, I., Buss, G.R., Chen, P., Tolin, S.A. Genetic and phenotypic analysis of Soybean mosaic virus resistance in PI 88788 soybean. *Phytopathology*, v. 94, p. 687-692. 2004.
- Gunduz, I., Ma, G., Buss, G.R., Chen, P., Tolin, S.A. Genetic analysis of resistance to Soybean mosaic virus in OX670 and Harosoy soybean. *Crop Science*, v. 41, p. 1785-1791. 2001.

- Halbert, S.E., Irwin, M.E. Effect of soybean canopy closure on landing rates of aphids with implications for restricting spread of soybean mosaic virus. *Annals of Applied Biology*, v. 97, p. 1-9. 1981.
- Hameed, S., Khalid, S., Ehsan-Ul-Haq, Hashrni, A.A. Cotton leaf curl disease in Pakistan caused by a whitefly transmitted geminivirus. *Plant Disease*, v. 78, p. 529. 1994.
- Hamilton, A.J., Baulcombe, D.C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, v. 286, p. 950-952. 1999.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G.J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, v. 404, p. 293-296. 2000.
- Hanley-Bowdoin L., Elmer J.S., Rogers S.G. Expression of functional replication protein from tomato golden mosaic virus in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 87, p. 1446-1450. 1990.
- 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 Plant Sciences*, v. 18, p. 71-106. 1999.
- Harrison, B.D., Liu, Y.L., Khalid, S., Hameed, S., Otim Nape, G.W. Robinson, D.J. Detection and relationships of cotton leaf curl virus and allied whitefly-transmitted geminiviruses occurring in Pakistan. *Annals of Applied Biology*, v. 130, p. 61-75. 1997.
- Hayes, R.J., Buck, K.W. Replication of tomato golden mosaic virus DNA B in transgenic plants expressing open reading frames (ORFs) of DNA A: Requirement of ORF AL2 for production of single-stranded DNA. *Nucleic Acids Research*, v. 17, p. 10213-10222, 1989.
- Heyraud-Nitschke, F., Schumacher, S., Laufs, J., Schaefer, S., Schell, J., Gronenborn, B. Determination of the origin cleavage and joining domain of geminivirus Rep proteins. *Nucleic Acids Research*, v. 23, p. 910-916. 1995.
- Hill, J.H. Soybean mosaic virus. *In*: Hartman, G.L., Sinclair, J.B., Rupe, J.C. (Ed.). *Compendium of Soybean Diseases*. St. Paul: The American Phytopathological Society. pp.70-71. 1999.
- Hill, J.H., Lucas, B.S., Benner, H.I., Tachibana, H., Hammond, R.B., Pedigo, L.P. Factors associated with the epidemiology of soybean mosaic virus in Iowa. *Phytopathology*, v. 70, p. 536-540. 1980.
- Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler, C., Voinnet, O. Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO Journal*, v. 22, p. 4523-4533. 2003.
- Hollings, M., Brunt, A.A. Potyviruses. *In*: Kurstak, E. (Ed.) *Handbook of Plant Virus Infections: Comparative Diagnosis*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland. pp. 731-807. 1981a.
- Hollings, M., Brunt, A.A. Potyvirus group. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*, no. 245. 1981b.
- Hull, R. *Matthew's Plant Virology*. 4^a ed. Londres: Academic Press. 2002.

- Inoue-Nagata, A.K., Rocha, W.B., Nagata, T. Weed host of a tomato begomovirus. Proceedings and Abstracts of the 4th International Geminivirus Symposium and 2nd International ssDNA Comparative Virology Workshop. pp. 1-11. 2004a.
- Inoue-Nagata, A.K., Albuquerque, L.C., Rocha, W.B., Nagata, T. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi29 DNA polymerase. Journal of Virological Methods, v. 116, p. 209-211. 2004b.
- Inoue-Nagata, A.K., Martin, D.P., Boiteux, L.S., Giordano, L.D., Bezerra, I.C., De Avila, A.C. New species emergence via recombination among isolates of the Brazilian tomato infecting Begomovirus complex. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 41, p. 1329-1332. 2006.
- Irwin, M.E., Goodman, R.M. Ecology and control of soybean mosaic virus. *In*: Maramorosch, K., Harris, K.F. (Eds.) Plant Diseases and Vectors: Ecology and Epidemiology. New York: Academic Press. pp.181-220. 1981.
- Irwin, M.E., Schultz, G.A. Soybean mosaic virus. FAO Plant Protection Bulletin, v. 29, p. 41-55. 1981.
- Iwaki, M., Thongmeekarn, P., Prommin, M., Honda, Y., Hibi, J. Whitefly transmission and some properties of cowpea mild mottle virus on soybean in Thailand. Plant Disease, v. 66, p. 265-268. 1982.
- Jan, F.J., Fagoaga, C., Pang, S.Z., Gonsalves, D. A single chimeric transgene derived from two distinct viruses confers multi-virus resistance in transgenic plants through homology-dependent gene silencing. General Virology, v. 81, p. 2103-2109. 2000.
- Jayaram, C.H., Hill, J.H., Miller, W.A. Complete nucleotide sequences of two soybean mosaic virus strains differentiated by response of soybean containing the *Rsv* resistance gene. Journal of General Virology, v. 73, p. 2067-2077. 1992.
- Jeddeloh, J.A., Stokes, T.L., Richards, E.J. Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. Nature Genetics, v. 22, p. 94-97. 1999.
- Jeyanandarajah, P., Brunt, A.A. The natural occurrence, transmission, properties and possible affinities of cowpea mild mottle virus. Journal of Phytopathology, v. 137, p. 148-156. 1993.
- Jones, A.L., Johansen I.E., Bean S.J., Bach I., Maule, A.J. Specificity of resistance to pea seed-borne mosaic potyvirus in transgenic peas expressing the viral replicase (NIb) gene. Journal of General Virology, v. 79, p. 3129-3137. 1998a.
- Jones, A.L., Thomas, C.L., Maule, A.J. De novo methylation and co-suppression induced by a cytoplasmically replicating plant RNA virus. EMBO Journal, v. 17, p. 6385-6393. 1998b.
- Kalantidis, K., Psaradakis, S., Tabler, M., Tsagris, M. The occurrence of CMV-specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus-derived double-stranded RNA is indicative of resistance to the virus. Molecular Plant-Microbe Interactions, v. 15, p. 826-833. 2002.

- Kidner, C.A., Martienssen, R.A. Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through *ARGONAUTE1*. *Nature*, v. 428, p. 81-84. 2004.
- Kiihl, R.A.S., Hartwig, E.E. Inheritance of reaction to soybean mosaic virus in soybeans. *Crop Science*, v. 19, p. 372-375. 1979.
- Kim, J.Y. Regulation of short-distance transport of RNA and protein. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 8, p. 45-52. 2005.
- Kim, K.S., Fulton, R.W. Ultrastructure of *Datura stramonium* infected with euphorbia virus suggestive of a whitefly-transmitted geminivirus. *Phytopathology*, v. 74, p. 236-241. 1984.
- Kjemtrup, S., Sampson, K., Peele, C., Nguyen, L.V., Conkling, M.A., Thompson, W.F., Robertson, D. Gene silencing from plant DNA carried by a geminivirus. *Plant Journal*, v. 14, p. 91-100. 1998.
- Klahre, U., Crété, P., Leuenberger, S.A., Iglesias, V.A., Meins Jr, F. High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic posttranscriptional gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 99, p. 11981-11986. 2002.
- Kogan, M., Turnipseed, S.G. Ecology and management of soybean arthropods. *Annual Review of Entomology*, v. 32, p. 507-538. 1987.
- Koonin, E.V., Dolja, V.V. Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: Implication of comparative analysis of amino acid sequences. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, v. 28, p. 375-430. 1993.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, v. 5, p. 150-163. 2004.
- Kunik, T., Salomon, R., Zamir, D., Navot, N., Zeidan, M., Michelson, I., Gafni, Y., Czosnek, H. Transgenic tomato plants expressing the tomato yellow leaf curl virus capsid protein are resistant to the virus. *Biotechnology*, v. 15, p. 500-504. 1994.
- Laguna, I.G., Arneodo, J.D., Rodríguez-Pardina, P., Fiorona, M. *Cowpea mild mottle virus* infecting soybean crops in Northwestern Argentina. *Fitopatologia Brasileira*, v. 31, p. 317. 2006.
- Laguna, I.G., Rodríguez-Pardina, P., Truol, G., Nieves, J. Virus diseases of soybean in Argentina. *Fitopatologia Brasileira*, v. 13, p. 193-197. 1988.
- Laufs, J., Traut, W., Heyraud, F., Matzeit, G., Rogers, S.G., Schell, J., Gronenborn, B. *In vitro* cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 92, p. 3879-3883. 1995.
- Lazarowitz, S.G., Beachy, R.N. Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *Plant Cell*, v. 11, p. 535-548. 1999.
- Lazarowitz, S.G. Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 11, p. 327-349. 1992.

- Legg, J.P., Thresh, J.M. Cassava mosaic virus disease in East Africa: A dynamic disease in a changing environment. *Virus Research*, v. 71, p. 135-149. 2000.
- Lim, S.M. Resistance to soybean mosaic virus in soybeans. *Phytopathology*, v. 75, p. 199-201. 1985.
- Lima Neto, V.C., Costa, A.S. Influência da idade da planta e número de vetores na transmissão do mosaico comum da soja. *Fitopatologia Brasileira*, v. 4, p. 397-400. 1979.
- Lippman, Z., May, B., Yordan, C., Singer, T., Martienssen, R. Distinct mechanisms determine transposon inheritance and methylation via small interfering RNA and histone modification. *PLoS Biology*, v. 1, p. 420-427. 2003.
- Liu, L., van Tonder, T., Pietersen, G., Davies, J. W., Stanley, J. Molecular characterisation of a subgroup I geminivirus from a legume in South Africa. *Journal of General Virology* v. 78, p. 2113-2117. 1997.
- Llave, C., Kasschau, K.D., Rector, M.A., Carrington, J.C. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell*, v. 14, p. 1605-1619. 2002.
- Lomonosoff, G.P. Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, v. 33, p. 323-343. 1995.
- Lucioli A., Noris E., Brunetti A., Tavazza R., Ruzza V., Castillo A.G., Bejarano E.R., Accotto G.P., Tavazza M. *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* re-derived resistance to homologous and heterologous geminiviruses occurs by different mechanisms and is overcome if virus-mediated transgene silencing is activated. *Journal of Virology*, v. 77, p. 6785-6798. 2003.
- Ma, G., Chen, P., Buss, G.R., Tolin, S.A. Genetic characteristics of two genes for resistance to soybean mosaic virus in PI486355 soybean. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 91, p. 907-914. 1995.
- Ma, G., Chen, P., Buss, G.R., Tolin, S.A. Genetic study of a lethal necrosis to Soybean mosaic virus in PI 507389 soybean. *Journal of Heredity*, v. 94, p. 205-211. 2003.
- Mansoor, S., Briddon, R.W., Zafar, Y., Stanley, J. Geminivirus disease complexes: An emerging threat. *Trends in Plant Sciences*, v. 8, p. 128-134. 2003.
- Mansoor, S., Briddon, R.W., Bull, S.E., Bedford, I.D., Bashir, A., Hussain, M., Saeed, M., Zafar, 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*, v. 148, p. 1986. 2003.
- Marathe, R., Anandalakshmi, R., Smith, T.H., Pruss, G.J., Vance, V.B. RNA viruses as inducers, suppressors and targets of post-transcriptional gene silencing. *Plant Molecular Biology*, v. 43, p. 295-306. 2000.
- Maruthi, M.N., Seal, S., Colvin, J., Briddon, W., Bull, E. *East African cassava mosaic Zanzibar virus* - a recombinant begomovirus species with a mild phenotype. *Archives of Virology*, v. 149, p. 2365-2377. 2004.

- Matyis, J.C., Silva, D.M., Oliveira, A.R. e Costa, A.S. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. *Summa Phytopathologica*, v. 1, p. 267-275. 1975.
- Matzke, M., Aufsatz, W., Kanno, T., Daxinger, L., Papp, I., Mette, M.F., Matzke, A.J. Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1677, p. 129-141. 2004.
- Matzke, M., Matzke A.J., Kooter, J.M. RNA: guiding gene silencing. *Science*, v. 293, p. 1080-1083. 2001.
- Matzke, M.A., Matzke, A.J. How and why do plants inactivate homologous (trans)genes?. *Plant Physiology*, v. 107, p. 679-685. 1995.
- Meister, G., Tuschl, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, v. 431, p. 343-349. 2004.
- Mello, R.N. Begomovírus em soja no Brasil e ferramentas moleculares para sua identificação. Tese D.S. Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa. 2001.
- Mello, R.N., Almeida, A.M.R., Zerbini, F.M. Detection and identification of geminiviruses infecting soybean and associated weeds in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 25, p. 444. 2000.
- Mello, R.N., Cotrim, M.A.A., Lopes, E.F., Moreira, A.G., Contin, F.S., Fontes, E.P.B., Almeida, A.M.R., Zerbini, F.M. Survey of begomoviruses associated with soybean and identification of *Sida mottle virus* (SiMoV) infecting this crop in Brazil. *Virus Reviews and Research*, v. 7, p. 157. 2002.
- Menten, J.O., Roston, A.J. Mosaico dourado e a necessidade da regionalização da cultura do feijoeiro no Estado de São Paulo. *Revista da Agricultura*, v. 55, p. 287-300. 1980.
- Mittelsten Scheid, O., Afsar, K., Paszkowski, J. Release of epigenetic gene silencing by trans-acting mutations in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 95, p. 632-637. 1998.
- Mlotshwa, S., Voinnet, O., Mette, M.F., Matzke, M., Vaucheret, H., Ding, S.W., Pruss, G., Vance, V.B. RNA silencing and the mobile silencing signal. *Plant Cell*, v. 14, p. S289- S301. 2002.
- 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 populations. *Virology*, v. 303, p. 317-326. 2002.
- Morales, F.J. Situación del mosaico dorado en la América del Sur: Brasil. *In: Morales, F.J. (Ed.). Bean golden mosaic: Research advances*. Cali: CIAT. pp.90-95. 1994.
- Morales, F.J., Jones, P.G. The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. *Virus Research*, v. 100, p. 57-65. 2004.
- Morales, F.J., Anderson, P.K. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology*, v. 146, p. 415-441. 2001.

- Moreira, A.G. Caracterização molecular de dois begomovírus que infectam soja (*Glycine max* L. Merrill) e construção de um vetor viral para indução de silenciamento gênico. Dissertação M.S. Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa. 2005.
- Moriones, E., Navas-Castillo, J. *Tomato yellow leaf curl virus*, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Research*, v. 71, p. 123-134. 2000.
- Morris, B.A., Richardson, K.A., Haley, A., Zhan, X., Thomas, J.E. The nucleotide sequence of the infectious cloned DNA component of tobacco yellow dwarf virus reveals features of geminiviruses infecting monocotyledonous plants. *Virology*, v. 187, p. 633-642. 1992.
- Morris, B., Richardson, K., Eddy, P., Zhan, X.C., Haley, A., Gardner, R. Mutagenesis of the AC3 open reading frame of African cassava mosaic virus DNA A reduces DNA B replication and ameliorates disease symptoms. *Journal of General Virology*, v. 72, p. 1205-1213. 1991.
- Muangsan, N., Beclin C., Vaucheret H., Robertson D. Geminivirus VIGS of endogenous genes requires SGS2/SDE1 and SGS3 and defines a new branch in the genetic pathway for silencing in plants. *Plant Journal*, v. 38, p. 1004-1014. 2004.
- Mullineaux, P.M., Donson, J., Morris-Krsinich, B.A.M., Bouton, M.I., Davies, J.W. The nucleotide sequence of maize streak virus DNA. *EMBO Journal*, v. 3, p. 3063-3068. 1984.
- Naidu, R.E., Gowda, S., Satyanarayana, T., Boyko, V., Reddy, A.S., Dawson, W.O., Reddy, D.V.R. Evidence that whitefly-transmitted cowpea mild mottle virus belongs to the genus *Carlavirus*. *Archives of Virology*, v. 143, p. 769-780. 1998.
- Napoli C., Lemieux C., Jorgensen, R. Expression of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, v. 2, p. 279-289. 1990.
- Noris, E., Accotto, G.P., Tavazza, R., Brunetti, A., Crespi, S., Tavazza M. Resistance to tomato yellow leaf curl geminivirus in *Nicotiana benthamiana* plants transformed with a truncated viral C1 gene. *Virology*, v. 224, p. 130-138. 1996.
- Noeiry, A.O., Lucas, W.J., Gilbertson, R.L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell*, v. 76, p. 925-932. 1994.
- Noris, E., Lucioli, A., Tavazza, R., Caciagli, P., Accotto, G.P., Tavazza, M. *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* can overcome transgene-mediated RNA silencing of two essential viral genes. *Journal of General Virology*, v. 85, p. 1745-1749. 2004.
- Orozco, B.M., Gladfelter, H.J., Settlege, S.B., Eagle, P.A., Gentry, R.N., Hanley-Bowdoin, L. Multiple cis elements contribute to geminivirus origin function. *Virology*, v. 242, p. 346-356. 1998.
- Orozco, B.M., Hanley-Bowdoin, L. Conserved sequence and structural motifs contribute to the DNA binding and cleavage activities of a geminivirus

- replication protein *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, p. 24448-24456. 1998.
- Orozco, B.M., Gladfelter, H.J., Settlage, S.B., Eagle, P.A., Gentry, R.N., Hanley-Bowdoin, L. Multiple cis elements contribute to geminivirus origin function. *Virology*, v. 242, p. 346- 356. 1998.
- Padgett, G.B., Nutter, F.W., Kuhn, C.W., All, J.N. Quantification of disease resistance that reduces the rate of tobacco etch virus epidemics in bell pepper. *Phytopathology*, v. 80, p. 451-455. 1990.
- 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*, v. 224, p. 390-404. 1996.
- Palmer, K.E., Rybicki, E.P. The molecular biology of mastrevirus. *Advances in Virus Research*, v. 50, p.183-234. 1998.
- Pandolfini, T., Molesini, B., Avesani, L., Spina, A., Polverari, A. Expression of self-complementary hairpin RNA under the control of the rolC promoter confers systemic disease resistance to plum pox virus without preventing local infection. *BMC Biotechnology*, v. 3, p. 7. 2003.
- Panizzil, A.R., Corrêa-Ferreira, B.S. Dynamics in the insect fauna adaptation to soybean in the tropics. *Trends in Entomology*, v. 1, p. 71-88. 1997.
- Parlevliet, J.E. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Annual Review of Phytopathology*, v. 17, p. 203-222. 1979.
- Peele, C., Jordan, C.V., Muangsan, N., Turnage, M., Egelkrout, E., Eagle, P., Hanley-Bowdoin, L., Robertson, D. Silencing of a meristematic gene using geminivirus-derived vectors. *Plant Journal*, v. 27, p. 357-366. 2001.
- Polston, J.E., Anderson, P.K. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Disease*, v. 81, p. 1358-1369. 1997.
- Polston, J.E., McGovern, R.J., Brown, L.G. Introduction of *Tomato yellow leaf curl virus* in Florida and implications for the spread of this and other geminiviruses of tomato. *Plant Disease*, v. 83, p. 984-988. 1999.
- Pooggin, M., Hohn, T. Fighting geminiviruses by RNAi and vice versa. *Plant Molecular Biology*, v. 55, p. 149-152. 2004.
- Pooggin, M., Shivaprasad, P. V., Veluthambi, K., Hohn, T.: RNAi targeting of DNA virus in plants. *Nature Biotechnology*, v. 21, p. 131-132. 2003.
- Prins, M., Laimer, M., Noris, E., Schubert, J., Wassenegger, M., Tepfer, M. Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Molecular Plant Pathology*, v. 9, p. 73-83. 2008.
- Ratcliff, F.G., Macfarlane, S.A., Baulcombe, D.C. Gene silencing without DNA. RNA-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell*, v. 11, p. 1207-1216. 1999.
- Ribeiro, S.G., Ambrozevicius, L.P., Ávila, A.C., Bezerra, I.C., Calegario, R.F., Fernandes, J.J., Lima, M.F., Mello, R.N., Rocha, H., Zerbini, F.M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology*, v. 148, p. 281-295. 2003.

- Ritzenthaler, C. Resistance to plant viruses: Old issue, news answers? *Current Opinion in Biotechnology*, v. 16, p. 118-122. 2005.
- Robertson, D. VIGS vectors for gene silencing: many targets, many tools. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 55, p. 495-519. 2004.
- Rocha, W.B., Nagata, T., Giordano, L.B., Pereira, W., Inoue-Nagata, A.K. Susceptibility of weeds to a tomato begomovirus. *Virus Reviews and Research*, 2003, v. 8., p. 187-188.
- Rodríguez-Pardina, P.E., Arneodo, J.D., Truol, G.A., Herrera, P.S., Laguna, I.G. First record of Cowpea mild mottle virus in bean crops in Argentina. *Australasian Plant Pathology*, v. 33, p. 129-130. 2004.
- Rodríguez-Pardina, P.E., Ploper, D., Laguna, I.G., Truol, G.A., Hanada, K., Rivas-Plastero, G.G., Ramirez, P., Herrera, P.S. Presencia de un geminivirus en cultivos de soja del Noroeste Argentino. *Avance Agroindustrial*, v. 19, p. 38-41. 1998.
- Rodríguez-Pardina, P.E., Zerbini, F.M., Ducasse, D.A. Genetic diversity of begomoviruses infecting soybean, bean and associated weeds in Northwestern Argentina. *Fitopatologia Brasileira*, v. 31, p. 342-348. 2006.
- 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*, v. 77, p. 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*, v. 43, p. 361-394. 2005.
- Ross, J.P. Effect of time and sequence of inoculation of soybeans with soybean mosaic and bean pod mottle viruses on yields and seed characters. *Phytopathology*, v. 59, p. 1404-1408. 1969.
- Ruiz, M.T., Voinnet, O., Baulcombe, D.C. Initiation and maintenance of virus induced gene silencing. *Plant Cell*, v. 10, p. 937-946. 1998.
- Ruiz-Medrano, R., Xoconostle-Cazares, B., Kragler, F. The plasmodesmatal transport pathway for homeotic proteins, silencing signals and viruses. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 7, p. 641-650. 2004.
- Sakai, J., Rodriguez-Pardina, P.E., Onuki, M., Usugi, T., Shohara, K., Hanada, K. Nucleotide sequence of a geminivirus isolate detected from soybean showing yellow and roguer symptoms in Argentina. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, v. 63, p. 270. 1997.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 3^a ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.
- Sanderfoot, A.A., Lazarowitz, S.G. Cooperation in viral movement: The geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery. *Plant Cell*, v. 7, p. 1185-1194. 1995.
- Seal, S.E., Jeger, M.J., Van Den Bosch, F. Begomovirus evolution and disease management. *Advances in Virus Research*, v. 67, p. 297-316. 2006.

- Sediyama, T., Kiihl, R.A.S., Almeida, L.A. Genética e melhoramento da soja. *In: Miyasaka, S., Medina, J.C. (Ed.). Cultura da soja no Brasil. Campinas: Ital. pp. 209-240. 1981.*
- Shepherd, D.N., Martin, D., Thomson, J.A. Transgenic strategies for developing crops resistant to geminiviruses. *Plant Science*, v. 176, p. 1-11. 2009.
- Shukla, D.D., Ward, C.W., Brunt, A.A. *The Potyviridae*. Wallingford: CAB International. 1994.
- Smith, N.A., Singh, S.P., Wang, M.B., Stoutjesdijk, P.A., Green, A.G., Waterhouse, P.M. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature*, v. 407, p. 319-320. 2000.
- Stanley, J., Bisaro, D.M., Briddon, R.W., Brown, J.K., Fauquet, C.M., Harrison, B.D., Rybicki, E.P., Stenger, D.C. Family *Geminiviridae*. *In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.). Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press. pp. 301-326. 2005.*
- Sunter, G., Bisaro, D.M. Transactivation in a geminivirus: AL2 gene product is needed for coat protein expression. *Virology*, v. 180, p. 416-419. 1991.
- Sunter, G., Bisaro, D.M. Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. *Plant Cell*, v. 4, p. 1321-1331. 1992.
- Sunter, G., Hartitz, M.D., Bisaro, D.M. Tomato golden mosaic virus leftward gene expression: autoregulation of geminivirus replication protein. *Virology*, v. 195, p. 275-280. 1993.
- Suryawanshi, A.P., Mali, V.R., Bulbule, S.V., Kurundkar, B.P. Reactions of soybean genotypes to cowpea mild mottle virus - soybean isolate. *Indian Journal of Virology*, v. 5, p. 129-131. 1989.
- Tenllado, F., Llave, C., Diaz-Ruiz, J.R. RNA interference as a new biotechnological tool for the control of virus diseases in plants. *Virus Research*, v. 102, p. 85-96. 2004.
- Thomas, C.L., Jones, L., Baulcombe, D.C., Maule, A.J. Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector. *Plant Journal*, v. 25, p. 417-425. 2001.
- Thouvenel, J.C., Monsarrat, A., Fauquet, C. Isolation of cowpea mild mottle virus from diseased soybeans in Ivory Coast. *Plant Disease*, v. 66, p. 336-337. 1982.
- Timmermans, M.C.P., Das, O.P., Messing, J. Geminivirus and their use as extrachromosomal replicons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 45, p. 79-112. 1994.
- Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A.L., Bernardi, F. Potyvirus proteins: A wealth of functions. *Virus Research*, v. 74, p. 157-175. 2001.
- Van Der Krol, A.R., Mur, L.A., Beld, M., Mol, J.N., Stuitje, A.R. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*, v. 2, p. 291-299. 1990.

- Valverde, R.A., Sim, J., Lotrakul, P. Whitefly transmission of sweet potato viruses. *Virus Research*, v. 100, p. 123-128. 2004.
- Van Wezel, R., Dong, X., Liu, H., Tien, P., Stanley, J., Hong, Y. Mutation of three cysteine residues in tomato yellow leaf curl virus-China C2 protein causes dysfunction in pathogenesis and posttranscriptional gene-silencing suppression. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 15, p. 203-208. 2002.
- Van Wezel, R., Liu, H., Tien, P., Stanley, J., Hong, Y. Gene C2 of the monopartite geminivirus *Tomato yellow leaf curl virus-China* encodes a pathogenicity determinant that is localized in the nucleus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 14, p. 1125-1128. 2001.
- Vance, V., Vaucheret, H. RNA silencing in plants: Defense and counterdefense. *Science*, v. 292, p. 2277-2280. 2001.
- Vanitharani, R., Chellappan, P., Fauquet, C.M. Geminiviruses and RNA silencing. *Trends in Plant Science*, v. 10, p. 144-51. 2005.
- Vanitharani, R., Chellappan, P., Pita, J.S., Fauquet, C.M. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology*, v. 78, p. 9487-9498. 2004.
- Vaucheret, H., Beclin, C., Fagard, M. Post-transcriptional gene silencing in plants. *Journal of Cell Science*, v. 114, p. 3083-3091. 2001.
- Vizcarret, M.M. La situación actual de las moscas blancas en la Argentina: Perspectivas de Manejo. *Anais, VIII Encontro Latino-americano e do Caribe sobre Moscas Brancas e Geminivirus Recife, Brasil*. pp. 59-63. 1999.
- Voinnet, O. RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends in Genetics*, v. 17, p. 449-459. 2001.
- Walters, H.J. Leguminous hosts of soybean mosaic virus. *Plant Disease Reporter*, v. 47, p. 726-728. 1963.
- Wassenegger, M., Heimes, S., Riedel, L., Sanger, H.L. RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell*, v. 76, p. 567-576. 1994.
- Waterhouse, P.M., Graham, M.W., Wang, M.B. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 95, p. 13959-13964. 1998.
- Waterhouse, P.M., Wang, M.B., Finnegan, E.J. Role of short RNAs in gene silencing. *Trends in Plant Science*, v. 6, p. 297-301. 2001.
- Wege, C., Gotthardt, R.D., Frischmuth, T., Jeske, H. Fulfilling Koch's postulates for *Abutilon mosaic virus*. *Archives of Virology*, v. 145, p. 2217-2225. 2000.
- Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M.B., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Robinson, S.P., Gleave, A.P., Green, A.G., Waterhouse, P.M. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant Journal*, v. 27, p. 581-590. 2001.

- Wrather, J.A., Anderson, T.R., Arsyad, D.M., Gai, J., Ploper, L.D., Porta-Puglia, A., Ram, H.H., Yorinori, J.T. Soybean diseases loss estimates for the top 10 soybean producing countries in 1994. *Plant Disease*, v. 81, p. 107-110. 1997.
- Xie, Y., Zhou, P. Molecular characterization of squash leaf curl Yunnan virus, a new begomovirus and evidence for recombination. *Archives of Virology*, v. 148, p. 2047-2054. 2003.
- Xie, Z., Allen, E., Wilken, A., Carrington, J.C. DICER-LIKE 4 functions in transacting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 102, p. 12984-12989. 2005.
- Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E., Carrington, J.C. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biology*, v. 2, p. E104. 2004.
- Yang, Y., Sherwood, T.A., Patte, C.P., Hiebert, E., Polston, J.E. Use of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) *Rep* gene sequences to engineer TYLCV resistance in tomato. *Phytopathology*, v. 94, p. 490-496. 2004.
- Yoo, B.C., Kragler, F., Varkonyi-Gasic, E., Haywood, V., Archer-Evans, S., Lee, Y.M., Lough, T.J., Lucas, W.J. A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell*, v. 16, p. 1979-2000. 2004.
- Zhang, W., Olson, N.H., Baker, T.S., Faulkner, L., Agbandje-Mckenna, M., Boulton, M.I., Davies, J.W., McKenna, R. Structure of the *Maize streak virus* geminate particle. *Virology*, v. 279, p. 471-477. 2001.
- Zheng, C., Chen, P., Gergerich, R. Genetic Analysis of Resistance to Soybean Mosaic Virus in J05 Soybean. *Journal of Heredity*, v. 97, p. 429-437. 2006.
- 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 DNA-A of geminivirus isolates from okra. *Journal of General Virology*, v. 79, p. 915-923. 1998.

CAPÍTULO 1

THREE DISTINCT BEGOMOVIRUSES ASSOCIATED WITH SOYBEAN IN CENTRAL BRAZIL

Fernandes, F.R., Cruz, A.R.R., Faria, J.C., Zerbini, F.M. & Aragão, F.J.L. Three distinct begomoviruses associated with soybean in Central Brazil. Archives of Virology, submetido.

Three Distinct Begomoviruses Associated With Soybean in Central Brazil

F. R. Fernandes^{1,2}, A. R. R. Cruz¹, J. C. Faria³, F. M. Zerbini^{2*}, F. J. L. Aragão^{1*}

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Laboratório de Transferência de Genes, PqEB W5 Norte, Brasília, DF, 70770-900, Brazil

²Dep. de Fitopatologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 36570-000, Brazil

³Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antonio de Goiás, GO, 75375-000, Brazil

*To whom correspondence should be addressed. Email: aragao@cenargen.embrapa.br or zerbini@ufv.br

The sequences reported in this paper have been deposited in the GenBank under the accession numbers FJ665283, FJ686693, FJ686694, FJ686695, and FJ686696.

Summary

We report the complete nucleotide sequences of geminiviruses of the genus *Begomovirus* infecting soybean (*Glycine max*) in Central Brazil. Samples obtained from soybean plants collected at Santo Antonio de Goiás, Goiás State, showing typical symptoms of viral infection, were analyzed. Infection was confirmed by PCR-based amplification of a DNA-A fragment with universal begomovirus primers. Total DNA from infected plants was then submitted to rolling circle amplification (RCA), and 2.6 kb molecules were cloned into plasmid vectors. Sequencing of the clones thus obtained confirmed infection by three distinct begomoviruses: *Bean golden mosaic virus*, *Sida micrantha mosaic virus* and Okra mottle virus, the latter reported recently as a novel virus infecting okra plants in Brazil. Begomovirus infection of soybean plants has been reported sporadically in Brazil, and has generally not been considered to be of economic relevance. The significance of the high degree of genetic variability of begomoviruses associated with soybean, as opposed to other leguminous plant species, is discussed.

During the last two decades, begomoviruses (whitefly-transmitted geminiviruses) have emerged as major plant pathogens, particularly in the tropics and subtropics, causing severe economic losses and seriously threatening crop production [22, 26]. Geminiviruses, comprising the family *Geminiviridae*, have characteristic twinned icosahedral particles (18 x 30nm) encapsidating a circular, single-stranded DNA genome of approximately 2.6 kb in length, which is replicated through a double-stranded intermediate in the nuclei of infected plant cells [38]. The family is divided into four genera based on host range, type of insect vector and genome features [44]. Viruses in the genus *Begomovirus* are transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci* Genn. and infect dicot plants. Begomoviruses found in the Old World can have either mono- or bipartite genomes, while those native to the Americas are all bipartite, consisting of two genomic components named DNA-A and DNA-B. The DNA-A encodes two replication-associated proteins, a trans-activating protein and the single capsid protein. The DNA-B encodes two movement-associated proteins (reviewed by Rojas et al. [38]).

Major contributing factors for the emergence and spread of begomoviruses are the dissemination of the highly polyphagous 'B' biotype of *B. tabaci* with the subsequent increase in the vector's populations [27, 42], and the rapid evolution of new variants by recombination and pseudorecombination mechanisms [4, 15, 21, 35, 49]. In the Americas, begomoviruses are limiting factors to common bean, tomato and pepper production in several countries (reviewed by Morales [28]), and have also been reported in cotton, cucurbits and soybean [20, 36, 43]. It is also well established that many wild plant species harbor indigenous viruses, which may serve as virus reservoirs between cropping seasons [3, 16-18, 39, 41].

Bean (*Phaseolus* spp.)-infecting begomoviruses are disseminated throughout the Americas causing yield-limiting infections. Genetic diversity of bean-infecting

begomoviruses is low, with only four species described (*Bean calico mosaic virus*, BCaMV; *Bean dwarf mosaic virus*, BDMV; *Bean golden mosaic virus*, BGMV; and *Bean golden yellow mosaic virus*, BGYMV) [13]. It has also been shown that BGMV isolates from Brazil display a remarkably low degree of genetic variability, unusual for begomoviruses [12]. The opposite is true for begomoviruses infecting solanaceous crops such as tomato and pepper: a large number of species have been described, and genetic variability among isolates of a given species is usually very high [1-3, 14, 33, 34, 47].

In spite of the ubiquitous occurrence of BGMV infection in beans, soybean (*Glycine max*)-infecting begomoviruses are not common in Brazil. Sporadic reports have been made since the 1980's, with recent reports of BGMV, *Sida mottle virus* (SiMoV) and two possible new viruses detected in soybean samples collected in Southeastern Brazil [9, 24, 29]. However, in none of these reports was begomovirus infection in soybean associated with economically important disease. This is in contrast to the situation in neighboring Argentina, where soybean infection by three distinct begomoviruses, including SiMoV, is reported to be widespread in the Northwestern region, causing moderate to severe yield losses [36].

Here, we report the detection of three begomoviruses, two of them previously unreported in soybean, associated with samples collected in Central Brazil. Our results indicate a high genetic diversity of begomoviruses associated with this crop, more similar to the pattern found in solanaceous than in leguminous hosts.

Ten leaf samples of soybean exhibiting typical begomovirus symptoms, including yellow and golden mosaic, chlorotic mottling, blistering, leaf distortion and dwarfing, were collected from fields around Santo Antônio de Goiás, State of Goiás, Brazil (16°30'S, 49°17'W). Samples were collected in January 2008 from an experimental soybean field with an area of 2.2 ha.

Total DNA was isolated from these samples as described [11]. The presence of begomoviruses was initially confirmed by PCR, using primers PAL1v1978/PARc496 [37]. Reactions were prepared in a 25 μ L volume containing 3 μ L of template DNA and a final primer concentration of 0.25 μ M. Reactions were submitted to an initial denaturing step at 94°C for 3 min, followed by 30 cycles of denaturing at 94°C for 1 min, annealing at 50°C for 1 min, and extension at 72°C for 2 min, and a final extension at 72°C for 10 min. Total DNA extracted from infected samples was then used as a template for rolling circle amplification (RCA) using the Illustra TempliPhi DNA Amplification Kit (GE Healthcare), according to the manufacturer's instructions. Genome concatemers generated during amplification were digested with restriction enzymes to release unit-length genomes. A preliminary screening was carried out to identify enzymes capable of linearizing the Templiphy amplification products. After digestion, genomic DNA was gel-purified and cloned into pBS KS+ (Stratagene). Clones were sequenced by primer walking at Macrogen Inc. (USA). Cognate components were identified based on their high sequence identity in the common region.

DNA-A nucleotide sequences were initially submitted to a BLAST search for preliminary species assignment based on the 89% threshold level established by the *Geminiviridae* Study Group of the ICTV [44]. Additional pairwise comparisons were made with DNAMAN version 6. New World begomovirus DNA-A and DNA-B sequences were retrieved from GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank) in January 2009.

Phylogenetic relationships were determined based on a multiple sequence alignment performed using CLUSTAL W [46]. Phylogenetic analysis was carried out using the MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) version 4.1 software

program [45]. The Kimura 2-parameter [19] was used to compute distances between each pair of sequences. Phylogenetic trees were then constructed using the Neighbour-Joining algorithm [40]. Bootstrap values were computed using 1,000 replicates to evaluate support for the groupings.

Soybean plants were found exhibiting typical begomovirus symptoms, including yellow and golden mosaic, chlorotic mottling, blistering, leaf distortion and dwarfing (Fig 1). The presence of begomoviruses was confirmed by PCR in all ten soybean samples, as revealed by the expected DNA fragment amplified using the PAL1v1978/PARc496 primer pair (data not shown). These DNA fragments were sequenced, and those from eight samples showed >94% identity with *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV, GenBank accession number EU908733); one showed 96% identity with *Bean golden mosaic virus* (BGMV, M88686), and one showed 97% identity with Okra mottle virus (OMoV, EU914817). As all eight sequences related to SiMMV had 100% identity, one sample (designated SO3), along with the samples SO7 and SO8 (presumably infected by BGMV and OMoV, respectively), were chosen for cloning and sequencing of the complete viral genomes.

The amplification product from sample SO3 was cutted with either *Xba* I or *Sal* I, generating clones pISO34XbaI and pISO34SalI, respectively. Their insert sequences were 2,669 and 2,657 nt in length, respectively. Sequence comparisons showed 96% nucleotide identity between the viral insert in pISO34XbaI and SiMMV DNA-A, and 96% nucleotide identity between the viral insert in pISO34SalI and SiMMV DNA-B. In accordance with the current guidelines for begomovirus nomenclature [13], the isolate represented by these clones was named *Sida micrantha mosaic virus*-[Brazil:Santo Antonio de Goiás 3:Soybean:2008] (SiMMV-[BR:Sag3:Soy:08]).

The amplification product from sample SO8 was cut either with *Bam*H I or *Pst* I, generating clones pISO84PstI and pISO811BamHI, respectively. Their insert sequences were 2,659 and 2,652 nt in length, respectively. Comparison with begomovirus sequences deposited in the GenBank indicated 99% nucleotide identity between the viral insert in pISO84PstI and OMoV DNA-A, and 98% nucleotide identity between the viral insert in pISO811BamHI and OMoV DNA-B. Thus, the isolate represented by these clones was named Okra mottle virus-[Brazil:Santo Antonio de Goiás 8:Soybean:2008] (OMoV-[BR:Sag8:Soy:08]).

The amplification product from sample SO7 was cut with *Bam*H I, generating clone pISO712BamHI, the insert of which is 2,611 nt in length and has 98% nucleotide identity with BGMV DNA-A. Thus, the isolate represented by this clone was named *Bean golden mosaic virus*-[Brazil:Santo Antonio de Goiás 7:Soybean:2008] (BGMV-[BR:Sag7:Soy:08]).

Phylogenetic analysis clustered each one of the three isolates with the other previously sequenced isolate of the respective species (Fig. 2). Interestingly, soybean-infecting begomoviruses were placed in three distinct monophyletic clusters: the first, with a 100% bootstrap value, includes SiMoV, SiMMV and OMoV (all three originally described infecting plants of the Malvaceae), plus two viruses originally isolated from malvaceous weeds and one tomato-infecting virus; the second cluster, with a 89% bootstrap value, contains BGMV and three tomato-infecting viruses; and the third, with a 99% bootstrap value, contains *Soybean blistering mosaic virus* (SbBMV, described and so far detected only in Argentina) and two tomato-infecting viruses. With the single exception of SbBMV, all of these viruses have so far been detected only in samples collected in Brazil.

The increasing occurrence of begomoviruses in Brazil demands efforts to study their diversity in order to anticipate and monitor outbreaks, as well as to understand the evolutionary forces driving the emergence of novel begomoviruses in crop species previously unaffected by these pathogens. For example, begomoviruses have been reported in passionfruit in Brazil, and the characterization of one of the species indicates a close relationship with tomato-infecting viruses ([30]; S. Siqueira and F.M. Zerbini, *unpublished results*).

In this work, begomovirus isolates from soybean plants cultivated in Brazil have been completely sequenced for the first time. This is also the first report of natural soybean infection by both SiMMV and OMoV.

It is noteworthy that three species were detected out of only ten samples, suggesting a high degree of genetic diversity for begomoviruses naturally associated to soybean. In contrast, in the closely-related leguminous species *Phaseolus vulgaris*, only one begomovirus, BGMV, has been observed so far in Brazil ([12]; J. C. Faria & F. J. L. Aragão, *unpublished results*). In addition, phylogenetic analysis revealed that the four begomoviruses which infect soybean in South America fall into three clearly distinct monophyletic branches, each branch also containing viruses which were originally detected in malvaceous and solanaceous species. Begomoviruses are known to cluster geographically rather than based on host range [31, 48], and indeed all three branches containing the soybean viruses include viruses restricted to Brazil or Argentina. A larger survey, including samples from different parts of the country and analyzing a greater number of viral isolates (including several isolates of each viral species) will be necessary to confirm or not the high degree of genetic diversity for soybean-infecting begomoviruses.

SiMMV was the most frequently detected virus in our samples, and soybean plants infected by this virus displayed more severe symptoms than those infected by BGMV or OMoV. Interestingly, the closely related SiMoV was the most frequently detected begomovirus in soybean samples from Northeastern Argentina [36]. Whether this is merely a coincidence, or the result of a better adaptation of sida-infecting viruses to soybean, remains to be determined. Moreover, the efficiency of the insect vector in transferring different viruses from indigenous weeds to soybeans should be further investigated.

The detection of OMoV in soybean was unexpected. There is no information on the biological properties of this virus (except that it infects okra, and now soybean), and its genomic sequence has been recently determined from infected okra plants. It is yet another emerging begomovirus species from Brazil, and future surveys should indicate whether it will become more prevalent in the field.

Begomoviruses have been reported in Brazil since the 1950's in weeds and ornamental plants [5, 6]. The first studies reporting the occurrence of BGMV in beans and of *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) in tomatoes stated that they were considered of low economic relevance [7, 23]. Nonetheless, BGMV became a considerable economic problem years after being described, due to the large increase in whitefly populations, which in turn was caused by the increase in the area planted with soybean, which is an excellent host for the whitefly [8, 10, 25]. It is now becoming evident that soybean is a host not only for BGMV but also for a number of additional begomoviruses. Although mixed infections could not be observed in our soybean samples, the co-existence of distinct viruses in the same field, associated with the presence of the insect vector, could facilitate the occurrence of recombination events.

Recombination has been singled out as a fundamental process for the generation of begomovirus genetic diversity [32].

Although begomoviruses have never been associated with economically important diseases of soybean in Brazil, its susceptibility to a number of begomoviruses from different phylogenetic lineages which also infect other crop species is cause for concern. Future changes in the structure of vector populations could increase the incidence and/or the severity of begomovirus infections in soybean. For example, the emergence of novel begomoviruses as serious pathogens of tomatoes in Brazil is directly correlated with the introduction and quick dissemination of the B biotype of the whitefly vector [34]. Furthermore, considering the enormous acreage occupied by soybeans in Brazil, the significance of this crop as a reservoir host of begomoviruses should not be underestimated even if infection occurs at low incidence.

References

1. Ala-Poikela M, Svensson E, Rojas A, Horko T, Paulin L, Valkonen JPT, Kvarnheden A (2005) Genetic diversity and mixed infections of begomoviruses infecting tomato, pepper and cucurbit crops in Nicaragua. *Plant Pathology* 54: 448-459
2. Ambrozevicius LP, Calegario RF, Fontes EPB, Carvalho MG, Zerbini FM (2002) Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 27: 372-377
3. Castillo-Urquiza GP, Beserra Jr. JEA, Bruckner FP, Lima ATM, Varsani A, Alfenas-Zerbini P, Zerbini FM (2008) Six novel begomoviruses infecting

- tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. Archives of Virology: 1985-1989
4. Chakraborty S, Vanitharani R, Chattopadhyay B, Fauquet CM (2008) Supervirulent pseudorecombination and asymmetric synergism between genomic components of two distinct species of begomovirus associated with severe tomato leaf curl disease in India. Journal of General Virology 89: 818-828
 5. Costa AS, Bennett CW (1950) Whitefly transmitted mosaic of *Euphorbia prunifolia*. Phytopathology 40: 266-283
 6. Costa AS (1955) Studies on *Abutilon* mosaic in Brazil. Phytopathologische Zeitschrift 24: 97-112
 7. Costa AS (1965) Three whitefly-transmitted virus diseases of beans in São Paulo, Brazil. Plant Protection Bulletin F.A.O. 13: 2-12
 8. Costa AS (1975) Increase in the populational density of *Bemisia tabaci*, a threat to widespread virus infection of legume crops in Brazil. In: Bird J and Maramorosch K (eds) Tropical Diseases of Legumes. Academic Press, New York, pp 171-186
 9. Costa AS, Miranda MAC, Almeida AMR (1978) Natural infection of some soybean cultivars with bean golden mosaic virus (in Portuguese). Anais do 1º Seminário Nacional de Pesquisa de Soja 1: 145-150
 10. De Fazio G (1985) Bean golden mosaic virus in Brazil (in Portuguese). Fitopatologia Brasileira 10: 41-48
 11. Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19: 11-15

12. Faria JC, Maxwell DP (1999) Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. *Phytopathology* 89: 262-268
13. Fauquet CM, Briddon RW, Brown JK, Moriones E, Stanley J, Zerbini FM, Zhou X (2008) Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology* 153: 783-821
14. Fernandes FR, Albuquerque LC, Giordano LB, Boiteux LS, Ávila AC, Inoue-Nagata AK (2008) Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes* 36: 251-258
15. Garcia-Andres S, Accotto GP, Navas-Castillo J, Moriones E (2007) Founder effect, plant host, and recombination shape the emergent population of begomoviruses that cause the tomato yellow leaf curl disease in the Mediterranean basin. *Virology* 359: 302-312
16. Hofer P, Engel M, Jeske H, Frischmuth T (1997) Nucleotide sequence of a new bipartite geminivirus isolated from the common weed *Sida rhombifolia* in Costa Rica. *Virology* 78: 1785-1790
17. Idris AM, Hiebert E, Bird J, Brown JK (2003) Two newly described begomoviruses of *Macroptilium lathyroides* and common bean. *Phytopathology* 93: 774-783
18. Jovel J, Reski G, Rothenstein D, Ringel M, Frischmuth T, Jeske H (2004) *Sida micrantha* mosaic is associated with a complex infection of begomoviruses different from *Abutilon mosaic virus*. *Arch Virol* 149: 829-41
19. Kimura M (1980) A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120

20. Lazarowitz SG (1991) Molecular characterization of two bipartite geminiviruses causing squash leaf curl disease: role of viral replication and movement functions in determining host range. *Virology* 180: 70-80
21. Lefeuvre P, Martin DP, Hoareau M, Naze F, Delatte H, Thierry M, Varsani A, Becker N, Reynaud B, Lett JM (2007) Begomovirus 'melting pot' in the south-west Indian Ocean islands: Molecular diversity and evolution through recombination. *J Gen Virol* 88: 3458-68
22. Mansoor S, Zafar Y, Briddon RW (2006) Geminivirus disease complexes: the threat is spreading. *Trends in Plant Science* 11: 209-212
23. Matyis JC, Silva DM, Oliveira AR, Costa AS (1975) Purification and morphology of tomato golden mosaic virus (in Portuguese). *Summa Phytopathologica* 1: 267-275
24. Mello RN, Cotrim MAA, Lopes EF, Moreira AG, Contin FS, Fontes EPB, Almeida AMR, Zerbini FM (2002) Survey of begomoviruses associated with soybean and identification of *Sida mottle virus* (SiMoV) infecting this crop in Brazil. *Virus Reviews and Research* 7(Supplement): 157
25. Menten JO, Roston AJ (1980) Bean golden mosaic and the need to compartmentalize bean fields in São Paulo state (in Portuguese). *Revista da Agricultura* 55: 287-300
26. Morales FJ, Anderson PK (2001) The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology* 146: 415-441
27. Morales FJ, Jones PG (2004) The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. *Virus Research* 100: 57-65
28. Morales FJ (2006) History and current distribution of begomoviruses in Latin America. *Advances in Virus Research* 67: 127-162

29. Moreira AG (2005) Molecular characterization of two soybean (*Glycine max* L. Merrill)-infecting begomoviruses and construction of a viral gene silencing vector. M.Sc. Thesis, Dep. de Fitopatologia. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
30. Novaes QS, Freitas-astua J, Yuki VA, Kitajima EW, Rezende JAM (2003) Partial characterization of a bipartite begomovirus infecting yellow passion flower in Brazil. *Plant Pathology* 52: 648-654
31. Padidam M, Beachy RN, Fauquet CM (1995) Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. *Journal of General Virology* 76: 249-263
32. Padidam M, Sawyer S, Fauquet CM (1999) Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265: 218-224
33. Polston JE, Anderson PK (1997) The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Disease* 81: 1358-1369
34. Ribeiro SG, Ambrozevicius LP, Ávila AC, Bezerra IC, Calegario RF, Fernandes JJ, Lima MF, Mello RN, Rocha H, Zerbini FM (2003) Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology* 148: 281-295
35. Ribeiro SG, Martin DP, Lacorte C, Simões IC, Orlandini DRS, Inoue-Nagata AK (2007) Molecular and biological characterization of Tomato chlorotic mottle virus suggests that recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses. *Phytopathology* 97: 702-711
36. Rodríguez-Pardina PE, Zerbini FM, Ducasse DA (2006) Genetic diversity of begomoviruses infecting soybean, bean and associated weeds in Northwestern Argentina. *Fitopatologia Brasileira* 31: 342-348

37. Rojas MR, Gilbertson RL, Russell DR, Maxwell DP (1993) Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77: 340-347
38. Rojas MR, Hagen C, Lucas WJ, Gilbertson RL (2005) Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology* 43: 361-394
39. Roye ME, McLaughlin WA, Nakhla MK, Maxwell DP (1997) Genetic diversity among geminiviruses associated with the weed species *Sida* spp., *Macroptilium lathyroides*, and *Wissadula amplissima* from Jamaica. *Plant Disease* 81: 1251-1258
40. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425
41. Salati R, Nakhla MK, Rojas MR, Guzman P, Jaquez J, Maxwell DP, Gilbertson RL (2002) *Tomato yellow leaf curl virus* in the Dominican Republic: Characterization of an infectious clone, virus monitoring in whiteflies, and identification of reservoir hosts. *Phytopathology* 92: 487-496
42. Seal SE, Jeger MJ, Van den Bosch F (2006) Begomovirus evolution and disease management. *Advances in Virus Research* 67: 297-316
43. Seo YS, Turini TA, Cook CG, Gilbertson RL, Natwick ET (2006) Evaluation of cotton germ plasm for resistance to the whitefly and cotton leaf crumple (CLCr) disease and etiology of CLCr in California's Imperial Valley. *Plant Disease* 90: 877-884
44. Stanley J, Bisaro DM, Briddon RW, Brown JK, Fauquet CM, Harrison BD, Rybicki EP, Stenger DC (2005) Family *Geminiviridae*. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U and Ball LA (eds) *Virus Taxonomy*. Eighth

- Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego, pp 301-326
45. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599
 46. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680
 47. Torres-Pacheco I, Garzón-Tiznado JA, Brown JK, Becerra-Flora A, Rivera-Bustamante R (1996) Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the Southern United States. *Phytopathology* 86: 1186-1192
 48. Ueda S, Onuki M, Hanada K, Takanami Y (2008) Unique grouping of the Far East Asian begomovirus complex based on sequence analyses of the DNA-A genome and associated DNA beta satellite molecules isolated from tomato, honeysuckle and Eupatorium plants in Japan. *Archives of Virology* 153: 417-426
 49. Varsani A, Shepherd DN, Monjane AL, Owor BE, Erdmann JB, Rybicki EP, Peterschmitt M, Briddon RW, Markham PG, Oluwafemi S, Windram OP, Lefeuvre P, Lett JM, Martin DP (2008) Recombination, decreased host specificity and increased mobility may have driven the emergence of maize streak virus as an agricultural pathogen. *Journal of General Virology* 89: 2063-2074

Figure legends

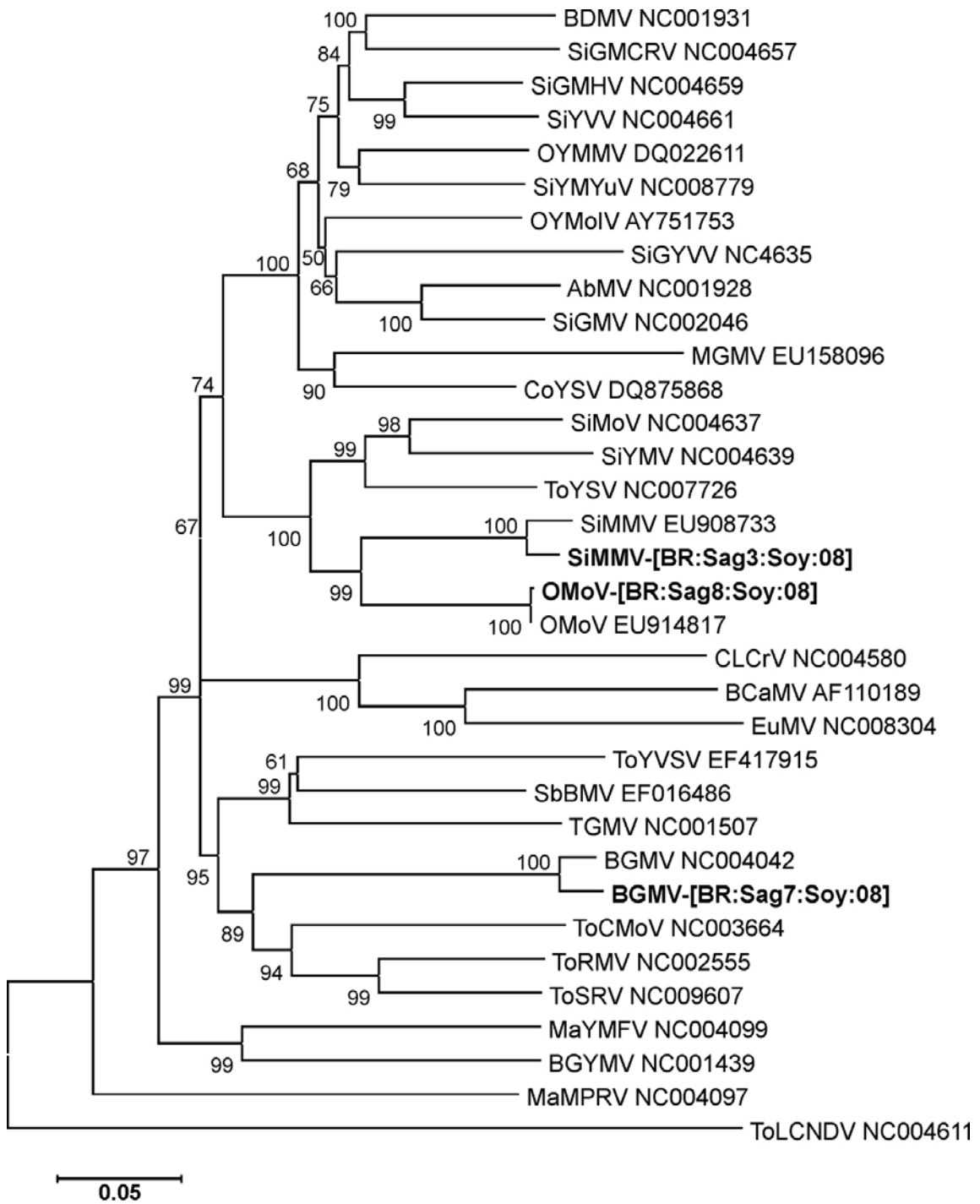
Fig. 1. Symptoms observed in soybean samples infected with *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV), Okra mottle virus (OMoV) and *Bean golden mosaic virus* (BGMV).

Fig. 2. Consensus phylogenetic tree based on the complete DNA-A sequences of begomovirus species available in GenBank. Begomoviruses isolated from soybean are in bold. Horizontal distances are proportional to the genetic distances between the isolates. *Scale bar* indicates the proportion of sites changing along each branch. Vertical distances are arbitrary. Bootstrap values $\geq 50\%$ are displayed on the nodes. AbMV, *Abutilon mosaic virus*; BCaMV, *Bean calico mosaic virus*; BDMV, *Bean dwarf mosaic virus*; BGMV, *Bean golden mosaic virus*; BGYMV, *Bean golden yellow mosaic virus*; CoYSV, *Corchorus yellow spot virus*; CLCrV, *Cotton leaf crumple virus*; EuMV, *Euphorbia mosaic virus*; MGMV, *Macroptilium golden mosaic virus*; MaMPRV, *Macroptilium mosaic Puerto Rico virus*; MaYMFV, *Macroptilium yellow mosaic Florida virus*; OMoV, *Okra mottle virus*; OYMMV, *Okra yellow mosaic Mexico virus*; OYMoIV, *Okra yellow mottle Iguala virus*; SiGMV, *Sida golden mosaic virus*; SiGMCRV, *Sida golden mosaic Costa Rica virus*; SiGMHV, *Sida golden mosaic Honduras virus*; SiGYVV, *Sida golden yellow vein virus*; SiMMV, *Sida micrantha mosaic virus*; SiMoV, *Sida mottle virus*; SiYMV, *Sida yellow mosaic virus*; SiYMYuV, *Sida yellow mosaic Yucatan virus*; SiYVV, *Sida yellow vein virus*; SbBMV, *Soybean blistering mosaic virus*; ToCMoV, *Tomato chlorotic mottle virus*; TGMV, *Tomato golden mosaic virus*; ToLCNDV, *Tomato leaf curl New Delhi virus*; ToRMV, *Tomato rugose mosaic virus*; ToSRV, *Tomato severe rugose virus*; ToYSV, *Tomato yellow spot virus*; ToYVSV, *Tomato yellow vein streak virus*.

Figure 1



Figure 2



CAPÍTULO 2

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF A NEW ISOLATE OF *Euphorbia mosaic peru virus* (EUMPV) INFECTING *Euphorbia heterophylla* IN CENTRAL BRAZIL

Fernandes, F.R., Cruz, A.R.R., Faria, J.C., Zerbini, F.M. & Aragão, F.J.L. Molecular characterization of a new isolate of *Euphorbia mosaic Peru virus* (EuMPV) infecting *Euphorbia heterophylla* in Central Brazil.

Molecular characterization of a new isolate of *Euphorbia mosaic Peru virus* (EuMPV) infecting *Euphorbia heterophylla* in Central Brazil

Fernanda R. Fernandes^{1,2}, Andréa R. R. Cruz¹, Josias C. Faria³, Francisco M. Zerbini¹, Francisco J. L. Aragão^{1*}

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Laboratório de Transferência de Genes, PqEB W5 Norte, Brasília, DF, 70770-900, Brazil

²Dep. de Fitopatologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 36570-000, Brazil

³Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antonio de Goiás, GO, 75375-000, Brazil

*To whom correspondence should be addressed. Email: aragao@cenargen.embrapa.br

The sequences reported in this paper have been deposited in the GenBank under the accession numbers _____

Summary

Euphorbia mosaic Peru virus (EuMPV), a recently proposed novel species within the genus *Begomovirus*, was isolated from an *Euphorbia heterophylla* plant growing nearby a soybean field in Central Brazil. The complete bipartite genome was cloned from a total DNA extract and its nucleotide (nt) sequence was determined. The DNA-A sequence of the EuMPV-Brazil (EuMPV-BR) isolate shared 89% nt identity with the original EuMPV isolate from Peru. The EuMPV-BR genome organization was typical of other New World, bipartite begomoviruses. The DNA-A component was 2609 nt in size, while the DNA-B component was 2578 nt long. The DNA-B sequence of the EuMPV-BR isolate shared 75% with an *Euphorbia mosaic virus* (EuMV) isolate from Yucatán Peninsula, Mexico (the DNA-B sequence of the EuMPV isolate from Peru is not available). Although *E. heterophylla* is a well distributed weed species in different tropical and subtropical regions, no begomoviruses infecting this species had been fully characterized in Brazil. The role of *E. heterophylla* as a reservoir host for crop-infecting begomoviruses is discussed.

Introduction

Geminiviruses, comprising the family *Geminiviridae*, have characteristic twinned icosahedral particles (18 x 30nm) encapsidating a circular, single-stranded DNA genome of approximately 2.6 kb. The family is divided into four genera based on host range, type of insect vector and genome features (Stanley *et al.*, 2005). Viruses in the genus *Begomovirus* are transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci* Genn. and infect dicot plants. Begomoviruses native to the Americas have a bipartite genome consisting of two genomic components named DNA-A and DNA-B. The DNA-A encodes two replication-associated proteins, a trans-activating protein and the single capsid protein. The DNA-B encodes two movement-associated proteins (reviewed by Rojas *et al.*, 2005).

Begomoviruses cause serious diseases in a number of economically important crops, mostly in tropical and subtropical regions (Morales, 2006). The most severely affected crops in Brazil are beans and tomatoes (Faria and Maxwell, 1999; Zerbini *et al.*, 2005). The begomovirus *Bean golden mosaic virus* (BGMV) has been an important pathogen of Brazilian bean crops since the 1970's (Faria and Maxwell, 1999). Following the introduction and rapid dissemination of the B biotype of *Bemisia tabaci* into Brazil in the mid 1990's, novel begomoviruses have emerged as important pathogens of tomatoes and, to a lesser extent, pepper crops (Nozaki *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2003). It is believed that the transfer of indigenous begomoviruses present in wild and weed hosts became possible with the presence of the more polyphagous B biotype of the whitefly vector, which quickly displaced the previously existent A biotype (Lima *et al.*, 2002).

The species diversity of begomoviruses associated with several common weeds has been well documented (Ambrozevicius *et al.*, 2002; Hallan *et al.*, 1998; Hofer *et al.*, 1997; Roye *et al.*, 2006; Roye *et al.*, 1997; Roye *et al.*, 1999). These studies indicated that each weed species tends to harbor one or two begomovirus species at most, suggesting that purifying selection acts strongly on viral populations as they co-evolve with the host over an extended period of time (Huang and Zhou, 2006; Idris *et al.*, 2003; Roye *et al.*, 2006; Seal *et al.*, 2006). It is also well established that weeds can act as important reservoirs for non-indigenous begomoviruses once they are introduced into a new region (Salati *et al.*, 2002). However, it remains to be demonstrated that weeds are a

significant source of inoculum for any important crop-infecting begomovirus. Preliminary reports indicate that the primary begomoviruses infecting weeds are not the same ones that infect crops (Gilbertson et al., 1997; Rojas et al., 1992), although it has been speculated that a number of common weeds may serve as alternate hosts for crop-infecting geminiviruses inbetween cropping seasons (Garcia-Andres et al., 2006; Salati et al., 2002).

Reports of begomovirus infection in weeds and other wild plants in Brazil can be found in the literature as early as the 1950's (Costa, 1955; Costa and Bennett, 1950). *Euphorbia heterophylla* L. is a native species present in tropical and subtropical America, and also widely distributed in other tropical regions around the world (Wilson, 1981). It is considered to be a weed plant of great economic importance causing yield losses in soybean and peanut crops (Bridges et al., 1992; Moore et al., 1990; Willard and Griffin, 1993). *E. heterophylla* is a common weed in the Southern, Southeastern and Mid-Western regions of Brazil. The bipartite begomovirus *Euphorbia mosaic virus* (EuMV) has been associated with *E. heterophylla* plants with disease symptoms in Brazil (Costa and Bennett, 1950), Puerto Rico (Bird and Sánchez, 1971; Bird et al., 1975) and Venezuela (Debrot and Centeno, 1986). Costa and Bennett (1950) described EuMV as a distinct virus based on vector transmission, host range and symptomatology, and this was confirmed by later studies on the physico-chemical properties of purified virions (Bird et al., 1975; Costa, 1976; Debrot and Centeno, 1986; Jaramillo and Lastra, 1986). These studies were all carried out before the widespread use of molecular techniques for plant virus characterization. Particularly in Brazil, EuMV has not been the subject of a detailed study since the 1980's (Souza et al., 1986), and therefore no isolate has been characterized at the molecular level.

An *E. heterophylla* plant showing typical symptoms of begomovirus infection was sampled in a soybean field and infection by a begomovirus was confirmed by PCR with universal primers for the genus. The viral genome was cloned and fully sequenced. The results obtained suggest that the plant was infected with an isolate of *Euphorbia mosaic Peru virus* (EuMPV), a recently characterized begomovirus species.

Material and Methods

One sample of an *E. heterophylla* plant exhibiting typical symptoms of begomovirus infection was collected in January 2008 from a soybean field (2.2 ha) near Santo Antônio de Goiás, State of Goiás, Brazil (16°30'S, 49°17'W) (Figure 1).

Total DNA was isolated from this sample as described (Doyle and Doyle, 1987). The presence of a begomovirus was initially confirmed by PCR using the universal primers PAL1v1978/PARc496 (Rojas *et al.*, 1993). Total DNA extracted from the infected sample was then used as a template for rolling circle amplification (RCA) using the Illustra TempliPhi DNA Amplification Kit (GE Healthcare), according to the manufacturer's instructions. Genome concatemers generated during amplification were digested with restriction enzymes to release unit-length genomes. A preliminary screening was carried out to identify enzymes capable of linearizing the TempliPhi amplification product. After digestion, genomic DNA was gel-purified and cloned into pKS+ (Stratagene). Clones were sequenced by primer walking at Macrogen Inc. (USA). Cognate components were identified based on their high sequence identity at the common region.

DNA-A nucleotide sequences were initially submitted to a BLAST search (Altschul *et al.*, 1990) for preliminary species assignment based on the 89% threshold level established by the *Geminiviridae* Study Group of the ICTV (Stanley *et al.*, 2005). Additional pairwise comparisons were made with DNAMAN version 6.0, using the Optimal Alignment option with the following parameters: K-tuple= 2, Gap penalty= 7, Gap open= 10, Gap extension= 5. The deduced amino acid sequences for the seven viral ORFs (Rep, Trap, Ren, AC4 and CP in DNA-A; MP and NSP in DNA-B) were also compared using the following parameters: BLOSUM matrix, K-tuple=2, Gap penalty=4, Gap open=10, Gap extension=0.1. Phylogenetic relationships were determined based on a multiple sequence alignment performed with CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). Phylogenetic analysis was carried out with the MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) version 4.1 software program (Tamura *et al.*, 2007). The Kimura 2-parameter (Kimura, 1980) was used to compute distances between each pair of sequences. Phylogenetic trees were then constructed using the Neighbour-Joining algorithm (Saitou and Nei, 1987).

Bootstrap values were computed using 2,000 replicates to evaluate support for the groupings. New World begomovirus DNA-A and DNA-B sequences were retrieved from GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank) in February 2009: *Abutilon mosaic virus* (AbMV, NC_001928), *Bean calico mosaic virus* (BCaMV, AF110189), *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV, NC_001931), *Bean golden mosaic virus* (BGMV, 004042), *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV, NC_001439), *Cabbage leaf curl virus* (CabLCuV, NC_003866), *Cabbage leaf curl Jamaica virus* (CabLCuJV, ABA26613), *Chino del tomate virus* (CdTV, NC_003831), *Corchorus yellow spot virus* (CoYSV, DQ875868), *Cotton leaf crumple virus* (CLCrV, NC_004580), *Cucurbit leaf crumple virus* (CuLCrV, AF256200), *Euphorbia leaf curl virus* (EuLCV, FJ487911), *Euphorbia leaf curl Guangxi virus* (EuLGxCV, AM411424), *Euphorbia mosaic Peru virus* (EuMPV, AM886131), *Euphorbia mosaic virus-A* [Mexico:Yucatan:2004] (EuMV-A[MX:Yuc:04], DQ318937), *Euphorbia mosaic virus-A* [Puerto Rico:Jurabo:1991] (EuMV-A[PR:Jur:91], AF068642), *Euphorbia mosaic virus-B* [Mexico:Jalisco:2005] (EuMV-B[MX:Jal:05], DQ520942), *Euphorbia mosaic virus*-[Jamaica:Wissadula:2004] (EuMV-[JM:Wis:04], FJ407052), *Macroptilium golden mosaic virus* (MaGMV, EU158096), *Macroptilium mosaic Puerto Rico virus* (MaMPRV, NC_004097), *Macroptilium yellow mosaic Florida virus* (MaYMFV, NC_004099), *Macroptilium yellow mosaic virus* (MaYMV, NC_004731), *Merremia mosaic virus* (MeMV, NC_007965), *Melon chlorotic leaf curl virus* (MCLCuV, AF325497), *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OYMMV, DQ022611), *Okra yellow mottle Iguala virus* (OYMoIV, AY751753), *Rhynchosia golden mosaic virus* (RhGMV, EU021216), *Rhynchosia golden mosaic Sinaloa virus* (RhGMSV, DQ406672), *Sida golden mosaic Costa Rica virus* (SGMCRV, NC_004657), *Sida golden mosaic Honduras virus* (SGMHV, NC_004659), *Sida golden mosaic virus* (SGMV, NC_002046), *Sida golden yellow vein virus* (SiGYVV, NC_004635), *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV, NC_005330), *Sida mottle virus* (SiMoV, NC_004637), *Sida yellow mosaic virus* (SiYMV, NC_004639), *Sida yellow mosaic Yucatan virus* (SiYMYuV, NC_008779), *Sida yellow vein virus* (SiYVV, NC_004661), *Soybean blistering mosaic virus* (SbBMV, EF016486), *Squash mild leaf curl virus* (SqMLCV, NC_004645), *Squash leaf curl virus* (SqLCV, NC_001936), *Tobacco apical stunt virus* (TbASV, DQ318934), *Tomato chino La Paz virus* (ToChLPV, NC_005843),

Tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV, NC_003664), *Tomato golden mosaic virus* (TGMV, NC_001507), *Tomato golden mottle virus* (ToGMoV, NC_008057), *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV, NC_004611), *Tomato mild yellow leaf curl Aragua virus* (ToMYLCAV, AY927277), *Tomato mottle virus* (ToMoV, NC_001939), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV, NC_002555), *Tomato severe leaf curl virus* (ToSLCV, NC_004642), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV, NC_009607), *Tomato yellow spot virus* (ToYSV, NC_007726), *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV, EF417915), *Wissadula golden mosaic virus* (WGMV, NC_010951).

Results and Discussion

Because of their broad distribution and rapid propagation traits, weeds are thought to play an important role in virus epidemics, acting as reservoir hosts inbetween cropping seasons and as primary inoculum sources to initiate new infection cycles (Jones, 2004; Morales and Jones, 2004; Sacristan *et al.*, 2004).

Euphorbia heterophylla is an economically important weed in Brazil, commonly associated with major crops such as soybean (Willard and Griffin, 1993; Wilson, 1981). Infection by the begomovirus *Euphorbia mosaic virus* (EuMV) is well documented in this species in several countries in the Americas, including Brazil (Ala-Poikela *et al.*, 2005; Bird *et al.*, 1975; Debrot and Centeno, 1986; Jaramillo and Lastra, 1986; Souza *et al.*, 1986). EuMV isolates from Mexico and Jamaica have been completely sequenced (Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007). Although a number of studies on *Euphorbia* begomoviruses have been performed in Brazil (Costa and Bennett, 1950; Souza *et al.*, 1986), molecular characterization of Brazilian begomovirus isolates from *E. heterophylla* has not yet been carried out.

On a recent survey for soybean-infecting begomoviruses in Central Brazil, a symptomatic sample of *E. heterophylla* was collected, and infection was confirmed by PCR using universal begomovirus primers. The complete viral genome was cloned and sequenced, and the sequences of the DNA-A and DNA-B were compared with those of other weed-infecting, Western Hemisphere bipartite begomoviruses.

The DNA-A from the begomovirus present in the *Euphorbia heterophylla* plant was 2609 nt long and showed the highest identity (89%; Table 1) with the recently described *Euphorbia mosaic Peru virus* (EuMPV; genBank accession # AM886131), isolated from an *Euphorbia* sp. sample collected in Peru in 2007 (Shepherd *et al.*, 2008). Its positive or virion sense strand contains one ORF corresponding to the CP (AV1) gene (750 nt), and the negative or complementary sense strand contains four ORFs corresponding to the Rep (AC1, 1080 nt), Trap (AC2, 390 nt), Ren (AC3, 399 nt) and AC4 (363 nt) genes. When the deduced amino acid sequences of individual DNA-A ORFs were compared, the highest identity was always with the EuMPV isolate from Peru: 94% for AV1, 92% for AC1, 91% for AC2, 95% for AC3 and 77% for AC4 (Tables 3-7). A noticeable feature of this analysis is the low sequence identity for the AC4 ORF.

The DNA-B was 2578 nt long and showed the highest identity (67%; Table 2) with an *Euphorbia mosaic virus* (EuMV) isolate from Yucatan Peninsula, Mexico (it is noteworthy that there is no DNA-B sequence available for the EuMPV isolate from Peru). The virion sense strand contains one ORF corresponding to the NSP (BV1) gene (771 nt), and the complementary sense strand contains the ORF corresponding to the MP (BC1) gene (732 nt). When individual ORFs from the DNA-B were compared, the highest identity was always with EuMV: 75% for BV1 and 86% for BC1 (Tables 8-9).

The common regions (CRs) of the DNA-A and DNA-B have 92 % identity with each other, confirming that these are cognate DNA components (Figure 2). Both CRs contain the typical features of begomovirus origins of replication, including the Rep-binding associated iterons (two direct repeats, GGTGT, and one inverted repeat, ACACC) and the stem-loop structure which includes the conserved nonanucleotide (TAATATTAC).

Phylogenetic analysis based on complete DNA-A sequences placed the Brazilian isolate from *Euphorbia heterophylla* in a monophyletic cluster, with a 88% bootstrap confidence value, which contains several *Euphorbia mosaic virus* isolates, the Peruvian isolate of *Euphorbia mosaic Peru virus* and *Tomato mild yellow leaf curl Aragua virus* (Figure 3). This monophyletic cluster is part of a larger cluster, with a 100% bootstrap value, which includes several cucurbit, leguminous and malvaceous-infecting begomoviruses (Figure 3).

Based on these results, and in accordance with current ICTV guidelines for species assignment within the *Geminiviridae* family (Fauquet *et al.*, 2008), the Brazilian begomovirus from *E. heterophylla* should be considered as an isolate of EuPMV. However, considering that the sequence identity for the DNA-A is exactly at the threshold level for species demarcation (89%), that no DNA-B sequence is available for the Peruvian isolate, and that no biological properties have been determined for either isolate at this stage, this placement should be considered as provisional, as it may change in the future should the further characterization of these two isolates indicate significant biological differences between them.

Considering *E. heterophylla*'s widespread occurrence in the Americas, it would be interesting to determine whether EuMPV can be found in this species in other countries of this continent. In spite of its recent description, it is now established that EuMPV infects *E. heterophylla* plants in at least two geographically distinct regions of South America, Central Brazil and the highlands of Peru. Likewise, EuMV has also been detected in several South American countries. Thus, the role of *E. heterophylla* as a reservoir/alternative host for crop-infecting begomoviruses warrants further investigation.

In order to obtain data on its biological properties, infectious clones of the EuMPV-BR isolate will be introduced via biolistics into *E. heterophylla* plants, and a host range experiment, including soybean and bean, will be performed. It's important to fulfill Koch's postulates and complete the characterization of this begomovirus species, in order to determine its precise taxonomic position.

References

- Ala-Poikela M, Svensson, E, Rojas, A, Horko, T, Paulin, L, Valkonen, JPT, Kvarnheden, A, 2005. Genetic diversity and mixed infections of begomoviruses infecting tomato, pepper and cucurbit crops in Nicaragua. *Plant Pathology* **54**, 448-59.
- Altschul SF, Gish, W, Miller, W, Myers, EW, Lipman, DJ, 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403-10.
- Ambrozevicus LP, Calegario, RF, Fontes, EPB, Carvalho, MG, Zerbini, FM, 2002. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira* **27**, 372-7.

- Bird J, Sánchez, J, 1971. Whitefly-transmitted viruses in Puerto Rico. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico* **55**, 461-7.
- Bird J, Sánchez, J, Rodríguez, RL, Juliá, FJ, 1975. Rugaceous (whitefly-transmitted) viruses in Puerto Rico. In "Tropical Diseases of Legumes" (J Bird, K Maramorosch, Eds.), pp. 3-25. Academic Press, New York.
- Bridges DC, Brecke, BJ, Barbour, JC, 1992. Wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) interference with peanut (*Arachis hypogaea*). *Weed Science* **40**, 37-42.
- Costa AS, 1955. Studies on *Abutilon* mosaic in Brazil. *Phytopathologische Zeitschrift* **24**, 97-112.
- Costa AS, 1976. Whitefly-transmitted plant diseases. *Annual Review of Phytopathology* **14**, 429-40.
- Costa AS, Bennett, CW, 1950. Whitefly transmitted mosaic of *Euphorbia prunifolia*. *Phytopathology* **40**, 266-83.
- Debrot E, Centeno, F, 1986. Ocurrencia del virus mosaico de las euforbiáceas infectando a *Euphorbia heterophylla* L. en Venezuela. *Agronomía Tropical* **35**, 5-12.
- Doyle JJ, Doyle, JL, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**, 11-5.
- Faria JC, Maxwell, DP, 1999. Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. *Phytopathology* **89**, 262-8.
- Fauquet CM, Briddon, RW, Brown, JK, Moriones, E, Stanley, J, Zerbini, FM, Zhou, X, 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology* **153**, 783-821.
- Garcia-Andres S, Monci, F, Navas-Castillo, J, Moriones, E, 2006. Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: Evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature. *Virology* **350**, 433-42.
- Hallan V, Saxena, S, Singh, BP, 1998. *Ageratum*, *Croton* and *Malvastrum* harbour geminiviruses: Evidence through PCR amplification. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **14**, 931-2.
- Hernandez-Zepeda C, Idris, AM, Carnevali, G, Brown, JK, Moreno-Valenzuela, OA, 2007. Preliminary identification and coat protein gene phylogenetic relationships of begomoviruses associated with native flora and cultivated plants from the Yucatan Peninsula of Mexico. *Virus Genes* **35**, 825-33.
- Hofer P, Engel, M, Jeske, H, Frischmuth, T, 1997. Nucleotide sequence of a new bipartite geminivirus isolated from the common weed *Sida rhombifolia* in Costa Rica. *Virology* **78**, 1785-90.
- Huang JF, Zhou, XP, 2006. Molecular characterization of two distinct begomoviruses from *Ageratum conyzoides* and *Malvastrum coromandelianum* in China. *Journal of Phytopathology* **154**, 648-53.
- Idris AM, Hiebert, E, Bird, J, Brown, JK, 2003. Two newly described begomoviruses of *Macroptilium lathyroides* and common bean. *Phytopathology* **93**, 774-83.
- Jaramillo S, Lastra, R, 1986. Purification and properties of the geminivirus *Euphorbia mosaic virus*. *Journal of Phytopathology* **115**, 193-203.
- Jones RAC, 2004. Using epidemiological information to develop effective integrated virus disease management strategies. *Virus Research* **100**, 5-30.

- Kimura M, 1980. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**, 111-20.
- Lima LHC, Campos, L, Moretzsohn, MC, Návia, D, Oliveira, MRV, 2002. Genetic diversity of *Bemisia tabaci* (Genn.) populations in Brazil revealed by RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology* **25**, 217-23.
- Moore JD, Banks, PA, Pinnel-Alison, CL, 1990. Wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) control in peanut (*Arachis hypogaea*). *Weed Science* **38**, 536-40.
- Morales FJ, 2006. History and current distribution of begomoviruses in Latin America. *Advances in Virus Research* **67**, 127-62.
- Morales FJ, Jones, PG, 2004. The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. *Virus Research* **100**, 57-65.
- Nozaki DN, Krause-Sakate, R, Hasegawa, JM, Cesar, MA, Dziuba, PH, Pavan, MA, 2005. Ocorrência de *Tomato severe rugose virus* em pimentão (*Capsicum annuum* L.) no estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira* **30 (Suplemento)**, S189.
- Ribeiro SG, Ambrozevicius, LP, et al., 2003. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology* **148**, 281-95.
- Rojas MR, Gilbertson, RL, Russell, DR, Maxwell, DP, 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* **77**, 340-7.
- Rojas MR, Hagen, C, Lucas, WJ, Gilbertson, RL, 2005. Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology* **43**, 361-94.
- Roye ME, Collins, AM, Maxwell, DP, 2006. First report of a begomovirus associated with the common weed *Jatropha gossypifolia* in Jamaica. *Plant Pathology* **55**, 286-.
- Roye ME, McLaughlin, WA, Nakhla, MK, Maxwell, DP, 1997. Genetic diversity among geminiviruses associated with the weed species *Sida* spp., *Macroptilium lathyroides*, and *Wissadula amplissima* from Jamaica. *Plant Disease* **81**, 1251-8.
- Roye ME, Spence, J, McLaughlin, WA, Maxwell, DP, 1999. The common weed *Macroptilium lathyroides* is not a source of crop-infecting geminiviruses from Jamaica. *Tropical Agriculture* **76**, 256-62.
- Sacristan S, Fraile, A, Garcia-Arenal, F, 2004. Population dynamics of Cucumber mosaic virus in melon crops and in weeds in Central Spain. *Phytopathology* **94**, 992-8.
- Saitou N, Nei, M, 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406-25.
- Salati R, Nakhla, MK, Rojas, MR, Guzman, P, Jaquez, J, Maxwell, DP, Gilbertson, RL, 2002. *Tomato yellow leaf curl virus* in the Dominican Republic: Characterization of an infectious clone, virus monitoring in whiteflies, and identification of reservoir hosts. *Phytopathology* **92**, 487-96.
- Seal SE, Van den Bosch, F, Jeger, MJ, 2006. Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: Implications for sustainable control. *Critical Reviews in Plant Sciences* **25**, 23-46.

- Shepherd DN, Martin, DP, Lefeuvre, P, Monjane, AL, Owor, BE, Rybicki, EP, Varsani, A, 2008. A protocol for the rapid isolation of full geminivirus genomes from dried plant tissue. *Journal of Virological Methods* **149**, 97-102.
- Souza VBV, Kim, KS, Kitajima, EW, 1986. Ultrastructure of *Euphorbia heterophylla* and *Datura stramonium* infected with Brazilian Euphorbia mosaic virus. *Fitopatologia Brasileira* **11**, 400.
- Stanley J, Bisaro, DM, Briddon, RW, Brown, JK, Fauquet, CM, Harrison, BD, Rybicki, EP, Stenger, DC, 2005. Family *Geminiviridae*. In "Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses" (CM Fauquet, MA Mayo, J Maniloff, U Desselberger, LA Ball, Eds.), pp. 301-26. Elsevier Academic Press, San Diego.
- Tamura K, Dudley, J, Nei, M, Kumar, S, 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 1596-9.
- Thompson JD, Higgins, DG, Gibson, TJ, 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673-80.
- Willard TS, Griffin, JL, 1993. Soybean (*Glycine max*) yield and quality responses associated with wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) control programs. *Weed Technology* **7**, 118-22.
- Wilson AK, 1981. *Euphorbia heterophylla*: A review of distribution, importance and control. *Tropical Pest Management* **27**, 32-8.
- Zerbini FM, Andrade, EC, Barros, DR, Ferreira, SS, Lima, ATM, Alfenas, PF, Mello, RN, 2005. Traditional and novel strategies for geminivirus management in Brazil. *Australasian Plant Pathology* **34**, 475-80.

Table 1. Percent sequence identities between the complete DNA-A nucleotide sequences of the EuMPV isolate from Brazil and the most closely related viruses.

	EuMPV	ToMYLCAV	CuLCrV	SqMLCV	BCaMV	RhGMV	EuMV (DQ318937)	EuMV (AF068642)	EuMV (DQ520942)	EuMV (FJ407052)	EuMPV-BR
EuMPV	x	83	78	80	80	79	82	82	80	80	89
ToMYLCAV		x	80	81	81	82	86	86	87	87	83
CuLCrV			x	84	79	78	81	81	80	80	78
SqMLCV				x	80	80	83	83	82	82	80
BCaMV					x	80	81	80	80	80	79
RhGMV						x	81	81	80	80	79
EuMV (DQ318937)							x	95	93	92	83
EuMV (AF068642)								x	94	96	82
EuMV (DQ520942)									x	95	81
EuMV (FJ407052)										x	81

Table 2. Percent sequence identities between the complete DNA-B nucleotide sequences of the EuMPV isolate from Brazil and the most closely related viruses.

	ToMYLCAV	SiMMV	SiGMV	SiYVV	ToYSV	ToCYLV	RhGMV	CdTV	EuMV (DQ318938)	EuMV (EU740969)	EuMPV-BR
ToMYLCAV	x	61	63	61	63	62	62	60	68	68	67
SiMMV		x	62	62	80	64	61	64	63	62	62
SiGMV			x	99	65	63	64	77	63	63	63
SiYVV				x	64	62	65	74	61	61	60
ToYSV					x	65	61	61	61	59	61
ToCYLV						x	62	62	60	62	62
RhGMV							x	65	61	60	60
CdTV								x	62	61	61
EuMV (DQ318938)									x	82	67
EuMV (EU740969)										x	66

Table 3. Percent sequence identities between the deduced amino acid sequences of the CP (AV1) ORF encoded by the DNA-A of the EuMPV isolate from Brazil and the most closely related viruses.

	EuMPV	ToMYLCAV	TbASV	CuLCrV	CabLCuJV	SqMLCV	ToSRV	EuLCV	EuMV (FJ407052)	EuMV (ABF67521)	EuMV (DQ318937)	EuMV (DQ395342)	EuLGxCV	EuMPV- BR
EuMPV	x	96	94	92	92	96	93	69	94	94	95	95	69	94
ToMYLCAV		x	94	93	93	96	94	69	96	97	97	97	68	94
TbASV			x	93	93	95	91	71	93	94	94	94	71	92
CuLCrV				x	100	94	90	69	92	92	92	93	72	91
CabLCuJV					x	94	90	69	92	92	92	93	72	91
SqMLCV						x	93	69	94	94	94	95	71	92
ToSRV							x	69	91	92	92	92	71	94
EuLCV								x	69	70	70	70	77	71
EuMV (FJ407052)									x	98	99	99	67	91
EuMV (ABF67521)										x	99	99	67	91
EuMV (DQ318937)											x	99	68	92
EuMV (DQ395342)												x	67	92
EuLGxCV													x	68

Table 4. Percent sequence identities between the deduced amino acid sequences of the Rep (AC1) ORF encoded by the DNA-A of the EuMPV isolate from Brazil and the most closely related viruses.

	EuMPV	ToMYLCAV	BCaMV	ToSLCV	CabLCuV	CabLCuJV	EuLCV	EuLCV	EuMV (DQ395342)	EuMV (ABF67521)	EuMV (DQ318937)	EuMV (FJ407052)	EuMV (AF068642)	EuLGxCV	EuMPV- BR
EuMPV	x	88	86	85	85	85	55	53	85	86	86	85	84	53	92
ToMYLCAV		x	83	85	82	83	56	54	87	88	88	87	87	53	87
BCaMV			x	88	87	86	55	54	86	86	86	85	85	52	85
ToSLCV				x	86	85	55	53	86	88	88	86	86	53	85
CabLCuV					x	98	56	54	85	86	85	86	86	53	84
CabLCuJV						x	56	54	85	86	85	86	86	53	84
EuLCV							x	91	55	54	54	55	55	80	56
EuLCV								x	54	53	53	53	50	81	54
EuMV (DQ395342)									x	97	92	98	96	51	84
EuMV (ABF67521)										x	93	97	96	51	85
EuMV (DQ318937)											x	92	93	51	86
EuMV (FJ407052)												x	97	51	84
EuMV (AF068642)													x	51	85
EuLGxCV														x	53

Table 5. Percent sequence identities between the deduced amino acid sequences of the Trap (AC2) ORF encoded by the DNA-A of the EuMPV isolate from Brazil and the most closely related viruses.

	EuMPV	BGYMV	CuLCrV	MeMV	ToChLPV	ToSLCV	BCaMV	MCLCuV	SqMLCV	EuMV (AF068642)	EuMV (ABF67521)	EuMV (DQ395342)	EuMPV-BR
EuMPV	x	75	76	71	76	77	80	74	73	82	82	81	91
BGYMV		x	71	65	66	69	70	69	71	72	71	73	78
CuLCrV			x	68	68	69	70	74	69	70	71	72	75
MeMV				x	70	71	70	64	67	73	74	73	72
ToChLPV					x	92	70	63	66	76	73	73	71
ToSLCV						x	70	65	67	77	74	74	72
BCaMV							x	71	71	77	79	77	79
MCLCuV								x	75	70	76	75	71
SqMLCV									x	72	71	71	74
EuMV (AF068642)										x	93	92	80
EuMV (ABF67521)											x	97	81
EuMV (DQ395342)												x	79

Table 6. Percent sequence identities between the deduced amino acid sequences of the Ren (AC3) ORF encoded by the DNA-A of the EuMPV isolate from Brazil and the most closely related viruses.

	EuMPV	ToMYLCAV	BCaMV	BGYMV	SqLCV	ToSLCV	ToChLPV	EuMV (AF068642)	EuMV (ABF67521)	EuMV (FJ348361)	EuMV (DQ318937)	EuMPV-BR
EuMPV	x	80	74	78	79	76	75	80	79	80	78	95
ToMYLCAV		x	77	80	77	74	77	83	81	82	82	83
BCaMV			x	83	77	82	83	77	77	78	78	76
BGYMV				x	82	79	81	80	79	80	79	78
SqLCV					x	75	77	77	75	79	77	80
ToSLCV						x	94	78	77	77	77	77
ToChLPV							x	82	81	80	80	77
EuMV (AF068642)								x	98	91	91	80
EuMV (ABF67521)									x	91	92	78
EuMV (FJ348361)										x	98	80
EuMV (DQ318937)											x	78

Table 7. Percent sequence identities between the deduced amino acid sequences of the AC4 ORF encoded by the DNA-A of the EuMPV isolate from Brazil and the most closely related viruses.

	EuMPV	ToSLCV	SqMLCV	CabLCuV	RhGMSV	BCaMV	CabLCuJV	EuMV (FJ407052)	EuMV (DQ395342)	EuMV (ABF67521)	EuMPV-BR
EuMPV	x	64	54	60	60	52	54	59	58	59	77
ToSLCV		x	68	71	68	74	70	64	63	67	65
SqMLCV			x	69	62	68	66	72	72	75	55
CabLCuV				x	79	73	90	67	66	66	58
RhGMSV					x	69	74	61	60	60	57
BCaMV						x	71	64	63	64	60
CabLCuJV							x	64	64	62	56
EuMV (FJ407052)								x	98	88	63
EuMV (DQ395342)									x	88	62
EuMV (ABF67521)										x	63

Table 8. Percent sequence identities between the deduced amino acid sequences of the MP (BV1) ORF encoded by the DNA-B of the EuMPV isolate from Brazil and the most closely related viruses.

	SiMMV	OMoV	SiGMCRV	SiGMHV	SiGMV	ToYSV	SiYVV	ToSRV	RhGMSV	TGMV	CdTV	ToGMoV	EuMV (EU740969)	EuMV (DQ318938)	EuMPV- BR
SiMMV	x	88	78	78	80	81	79	80	72	73	75	75	70	71	74
OMoV		x	79	79	79	88	79	78	71	75	75	75	71	72	71
SiGMCRV			x	87	87	76	87	74	70	71	83	80	72	73	71
SiGMHV				x	92	77	92	73	72	71	84	84	71	72	71
SiGMV					x	77	99	74	71	71	84	82	73	75	71
ToYSV						x	76	74	70	75	73	75	70	71	70
SiYVV							x	74	71	71	83	81	73	75	71
ToSRV								x	68	73	71	70	67	68	69
RhGMSV									x	72	70	70	70	69	68
TGMV										x	70	71	70	70	68
CdTV											x	79	71	73	68
ToGMoV												x	70	70	70
EuMV (EU740969)													x	93	75
EuMV (DQ318938)														x	75

Table 9. Percent sequence identities between the deduced amino acid sequences of the NSP (BC1) ORF encoded by the DNA-B of the EuMPV isolate from Brazil and the most closely related viruses.

	ToMYLCAV	SiMMV	BGYMV	WGMV	ToMoV	ToYVSV	SiGMHV	SiYVV	MaYMV	MaMPRV	EuMV (EU740969)	EuMV (DQ318938)	EuMPV-BR
ToMYLCAV	x	84	82	82	83	82	84	83	82	81	87	85	86
SiMMV		x	85	86	86	82	88	86	86	86	83	82	83
BGYMV			x	85	84	83	85	86	90	90	84	84	82
WGMV				x	94	81	94	93	86	86	80	80	82
ToMoV					x	81	94	94	86	86	82	80	82
ToYVSV						x	81	81	83	81	84	81	81
SiGMHV							x	99	87	86	82	80	82
SiYVV								x	86	86	81	80	82
MaYMV									x	89	80	80	80
MaMPRV										x	82	82	80
EuMV (EU740969)											x	97	86
EuMV (DQ318938)												x	86

Figure legends

Figure 1. Symptoms observed in the *Euphorbia heterophylla* sample infected with the Brazilian isolate of *Euphorbia mosaic Peru virus* (EuMPV-BR).

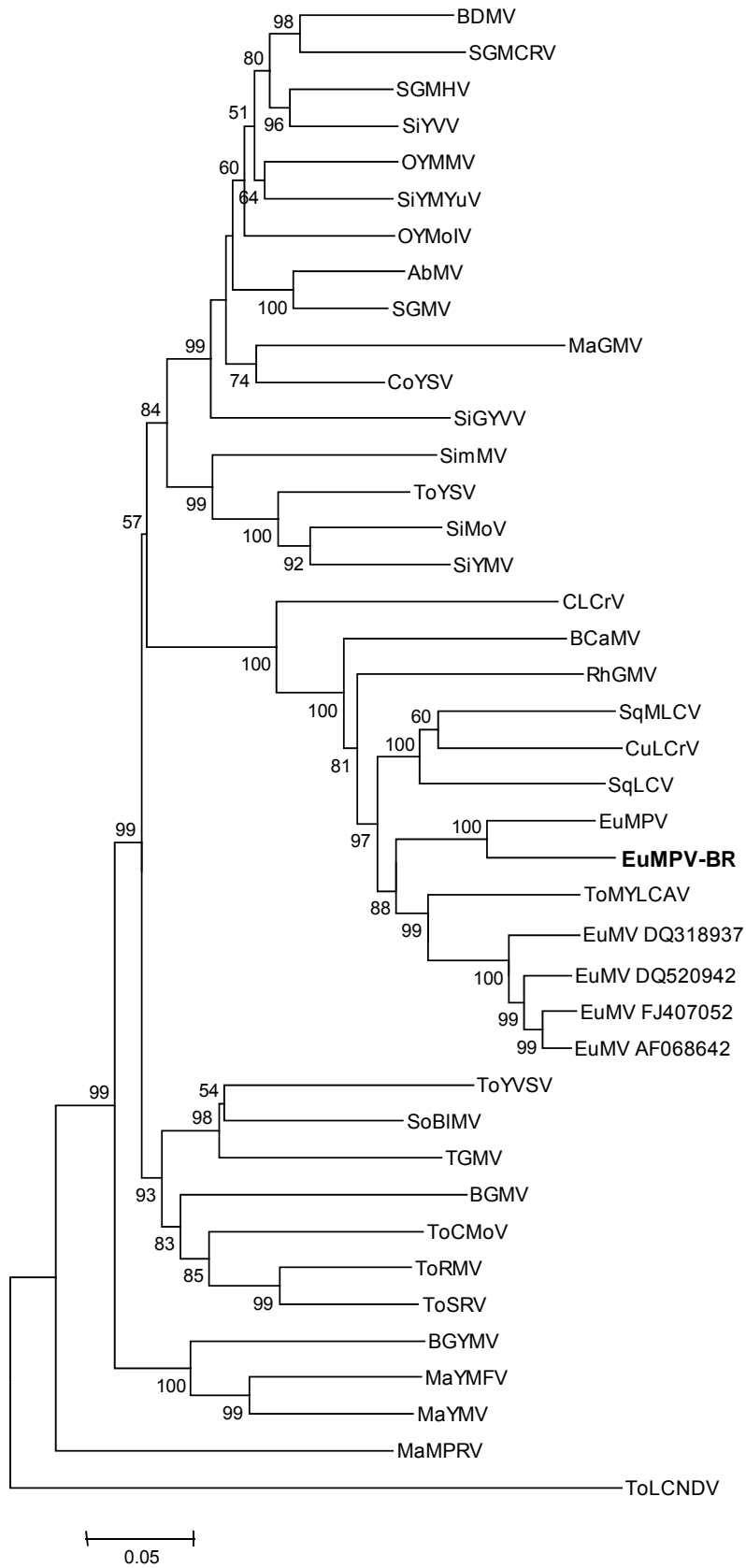
Figure 2. Alignment of the common regions of the DNA-A and DNA-b of the Brazilian isolate of *Euphorbia mosaic Peru virus* (EuMPV-BR). The iterons (Rep-binding sites) are underlined. The nucleotides which form the stem-loop structure are in italics, with the nonanucleotide at the origin of replication highlighted in bold. The TATA box of the Rep gene is boxed.

Figure 3. Bootstrap consensus phylogenetic tree based on the complete DNA-A sequences of begomovirus species available in GenBank. The isolate EuMPV-Br is highlighted in bold. Horizontal distances are proportional to the genetic distances among the isolates. Scale bar indicates the proportion of sites changing along each branch. Vertical distances are arbitrary. Bootstrap values ≥ 50 % are displayed on the nodes. For abbreviations and GenBank accession numbers, see Materials and Methods.

Figure 1



Figure 3



CAPÍTULO 3

OBTENÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE SOJA VISANDO RESISTÊNCIA MÚLTIPLA A VÍRUS

INTRODUÇÃO

Após muitos anos de melhoramento convencional visando resistência a doenças, é notório que, para algumas doenças causadas por vírus, as fontes de resistência naturais disponíveis no germoplasma cultivado e silvestre associado à espécie vegetal em questão são escassas. Por outro lado, a transformação genética de vegetais superiores apresentou avanços consideráveis nas duas últimas décadas devido aos progressos da biologia molecular, bioquímica e cultura de tecidos, o que permitiu a introdução de genes exógenos conferindo diferentes características agronômicas às mais variadas espécies de plantas. A transformação genética de plantas via biobalística (bombardeamento de partículas) ou via *Agrobacterium tumefaciens* encontra-se adaptada para espécies vegetais herbáceas e lenhosas, anuais e perenes, mono- e dicotiledôneas, evidenciando as inúmeras oportunidades que os avanços na tecnologia de transformação têm oferecido aos pesquisadores no melhoramento genético das espécies cultivadas (Sharma *et al.*, 2005; Vain, 2007).

Nesse contexto, o desenvolvimento de uma tecnologia para a introdução direta de genes pela biobalística foi fundamental, pois o uso de *A. tumefaciens* é limitado a espécies hospedeiras da bactéria, em sua maioria dicotiledôneas herbáceas de ciclo anual (Southgate *et al.*, 1995; Brasileiro e Carneiro, 1998; de Mello-Farias e Chaves, 2008). Além disso, o uso de *A. tumefaciens* exige a regeneração de plantas por meio de cultura de tecidos, algo que até hoje é difícil, ou mesmo impossível, no caso de espécies de grande importância

econômica como o feijoeiro e a soja (Chung e Singh, 2008; de Mello-Farias e Chaves, 2008).

A biobalística foi inicialmente proposta por Sanford *et al.* (1987), para a introdução de material genético no genoma nuclear de plantas superiores. A partir de então, a universalidade de aplicações desta tecnologia tem sido vastamente explorada, demonstrando ser um processo simples e efetivo para a introdução e a expressão de genes em bactérias, fungos, protozoários, algas, insetos, plantas e tecidos animais (Aragão *et al.*, 1992; Sanford *et al.*, 1993; Harrier e Millam, 2001; Trinks *et al.*, 2005; Weld *et al.*, 2006; Sunagawa *et al.*, 2007; Rech *et al.*, 2008).

Em leguminosas, a biobalística tem se mostrado uma tecnologia eficiente, propiciando taxas satisfatórias de transformação para a obtenção de plantas transgênicas expressando diferentes características. Isso pode ser observado para o feijão-comum (Bonfim *et al.*, 2007), soja (Aragão *et al.*, 2006) e feijão-de-corda (Ivo *et al.*, 2008). A utilização de genes marcadores de seleção com menores restrições à aplicação comercial das linhagens resultantes do processo de transformação também tem sido explorada (Aragão *et al.*, 2005; Nunes *et al.*, 2006).

O desenvolvimento de sistemas de transformação de plantas associado ao conceito de resistência derivada do patógeno (Sanford e Johnston, 1985) contribuiu muito para o progresso desta área. A obtenção de resistência a vírus por meio da estratégia de silenciamento de RNA tem se mostrado bastante apropriada nos casos em que não são encontrados genótipos que demonstrem resistência satisfatória, ou mesmo nenhum nível de resistência viral. Inicialmente, o fenômeno de silenciamento gênico foi descrito na tentativa de se obter plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) resistentes ao potyvírus *Tobacco etch virus* (TEV) (Lindbo e Dougherty, 1992). Posteriormente, Waterhouse *et al.* (1998) observaram que estratégias baseadas no silenciamento de RNA proporcionavam um nível de resistência muito mais elevado, chegando em alguns casos a imunidade, fato confirmado por vários autores (Hamilton e Baulcombe, 1999; Waterhouse *et al.*, 2001; Prins, 2003). Desde então, o silenciamento de RNA (também conhecido como RNA interferente) vem sendo utilizado como a estratégia preferencial para a obtenção de plantas geneticamente modificadas resistentes a vírus

pertencentes a diversas famílias e gêneros, com genomas de RNA (Baulcombe, 1996; Goldbach *et al.*, 2003; Prins, 2003; Ritzenthaler, 2005) ou de DNA (Fuentes *et al.*, 2006; Bonfim *et al.*, 2007; Rodríguez-Negrete *et al.*, 2009).

Pelo fato da maioria dos vírus de plantas possuírem genoma de RNA fita simples (ssRNA), estes se constituem em alvos *per se* para a tecnologia de RNA interferente, além do fato de hoje ser bem compreendido que um papel natural do silenciamento de RNA em plantas é a defesa destas contra os vírus (Fusaro *et al.*, 2006). A introdução de sequências do genoma viral na forma de repetições invertidas que expressam uma estrutura de grampo (*hairpin RNA*, hpRNA) ou um RNA fita dupla (dsRNA) nas plantas hospedeiras constitui-se em um método extremamente eficiente para a indução do silenciamento de RNA e a obtenção de resistência viral em plantas transgênicas (Waterhouse *et al.*, 1998). Para tal, um fragmento de um gene essencial do genoma viral é clonado nos sentidos senso e anti-senso, intercalado por um intron, sob controle de um promotor forte. O hpRNA formado não é traduzível, sendo, entretanto, clivado para gerar os siRNAs. Estes são incorporados a um complexo ribonucleoprotéico denominado RISC (*RNA-induced silencing complex*), onde servirão de guia para a degradação do RNA alvo (Eamens *et al.*, 2008).

A utilização deste tipo de construção permitiu o incremento dos resultados da tecnologia de transformação de plantas para resistência a vírus, tanto em termos quantitativos (efetividade da transformação, medida pela porcentagem de linhagens transgênicas efetivamente resistentes) como qualitativos (nível de resistência obtido). Enquanto as estratégias senso e anti-senso anteriormente utilizadas obtinham 5-20% de linhagens transgênicas efetivamente resistentes, cerca de 90% das linhagens geradas a partir de construções hpRNA apresentam-se resistentes (Smith *et al.*, 2000; Waterhouse e Helliwell, 2003; Waterhouse *et al.*, 1998). Utilizando construções hpRNA, foi possível a obtenção de resistência para um grande número de vírus com genoma de RNA, para os quais a estratégia senso é pouco eficaz (Kalantidis *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2004; Nomura *et al.*, 2004; Hily *et al.*, 2005;).

O presente trabalho teve como objetivo a obtenção de plantas de soja transgênicas resistentes a vírus de três diferentes gêneros, baseada na

tecnologia de RNA interferente: o begomovírus *Sida mottle virus* (SiMoV), o potyvírus *Soybean mosaic virus* (SMV) e o carlavírus *Cowpea mild mottle virus* (CpMMV).

MATERIAL E MÉTODOS

Construção do vetor pGEMPOTY

O vetor pGEMPOTY foi construído a partir do alinhamento das sequências do gene que codifica a proteína capsial (CP) das diversas estirpes do SMV e na análise *in silico* para a verificação de qual o melhor fragmento para se obter uma estrutura secundária de RNA satisfatória com mínima energia livre de formação de estruturas secundárias (Zucker, 2003). Uma sequência de 303 pares de bases (pb) do isolado de SMV cedido pelo Dr. Álvaro Almeida (Embrapa Soja) foi escolhida para a clonagem. O RNA total foi extraído de folhas de plantas de soja infectadas pelo SMV provenientes da Embrapa Soja, utilizando-se o kit Micro-to-Midi Total RNA Purification System (Invitrogen), segundo as recomendações de fabricante. O RNA extraído foi utilizado como molde para a síntese de cDNA utilizando-se a enzima Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen), com o uso de hexanucleotídeos de sequência aleatória. O cDNA obtido foi utilizado como molde para a amplificação do fragmento de 303 pb utilizando os oligonucleotídeos SMVXHOXBA (5'-CCT CGA GTC TAG AAA TGG CGT GTG GGT GAT G-3') e SMVBGL (5'-AGA TCT GTT AAC TCC CGA GAG AGC TGC-3'). A amplificação por PCR foi feita em um volume final de 50 µL, contendo 50 ng de DNA molde, 1x High Fidelity PCR Buffer, MgSO₄ 2mM, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo e 1 U de Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). A reação de amplificação foi realizada

em um termociclador PTC-100 (MJ Research), com os seguintes parâmetros: desnaturação a 94°C por 2 min, seguida de 35 ciclos de amplificação (94°C por 30 s, 55°C por 30 s, 68°C por 1 min) com um ciclo de alongação final de 5 min a 68°C. O produto da PCR foi analisado em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídeo (0,5 µg/L). O fragmento de 303 pb foi purificado a partir do gel utilizando-se o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), e foi clonado no vetor pGEM-T-Easy (Promega), segundo as recomendações do fabricante. Os clones obtidos foram verificados por meio de análise de restrição com *EcoRI* e o clone selecionado foi denominado pGEMSMV1. Este foi sequenciado utilizando-se os oligonucleotídeos universais M13F e M13R em sequenciador automático.

O DNA para amplificação do fragmento do SiMoV foi obtido a partir de um clone pertencente à coleção do Laboratório de Virologia Vegetal Molecular da UFV, o qual continha uma cópia do DNA-A completo do SiMoV clonada no vetor pKS+ (Stratagene). Este clone foi utilizado como molde para a reação de amplificação com os oligonucleotídeos SIMOVBGL (5'-CAG ATC TGG GGT GTG ACA TCA TCG ATG ACG-3') e SIMOVBAMKPN (5'-AGG TAC CGG ATC CCG CTG CAG CTG AGC CG-3'), obtendo-se um fragmento de 404 pb correspondente a uma porção do gene *Rep*. A reação de amplificação e as condições de temperatura foram semelhantes às descritas para o SMV. O fragmento de 404 pb foi purificado do gel de agarose utilizando-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) e foi clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega), segundo as recomendações do fabricante. Os clones obtidos foram checados por meio de análise de restrição com *EcoRI* e o clone selecionado foi denominado pGEMSIMOV4, e sequenciado utilizando-se os oligonucleotídeos universais M13F e M13R em seqüenciador automático.

Os clones pGEMSMV1 e pGEMSIMOV4 foram submetidos a clivagem com as enzimas *Bgl* II e *Sac* I. A digestão do clone pGEMSMV1 com estas enzimas lineariza o vetor, enquanto a digestão do clone pGEMSIMOV4 libera o fragmento desejado (404 pb), o qual foi eluído do gel de agarose e purificado. Procedeu-se à ligação do vetor pGEMSMV1 linearizado com o fragmento obtido a partir da digestão do pGEMSIMOV4. Foi realizada a transformação de *E. coli* com esta ligação. Após a checagem dos clones obtidos, selecionou-se apenas um, o qual foi denominado pGEMSMVSIMOV10. Em seguida,

procedeu-se à digestão do vetor pKANNIBAL (Helliwell e Waterhouse, 2003) (Figura 1) com as enzimas *Xba* I e *Bam*H I, assim como do clone pGEMSMVSIMOV10 com as mesmas enzimas. A digestão do vetor pKANNIBAL com estas enzimas lineariza o vetor, enquanto a digestão do clone pGEMSMVSIMOV10 libera o fragmento desejado, o qual foi eluído do gel de agarose e purificado. A ligação e transformação de *E. coli* foram realizadas e, após a verificação dos clones obtidos, foi selecionado o clone pKANSMVSIMOV19. Procedeu-se à digestão dos clones pKANSMVSIMOV19 e do pGEMSMVSIMOV10 com as enzimas *Xho* I e *Kpn* I e a ligação dos fragmentos desejados oriundos das digestões. Após a transformação em *E. coli* e a checagem dos clones obtidos, foi selecionado o clone pKANSMVSIMOVSMVSIMOV7. Este foi digerido com *Not* I para a liberação do cassete de interferência, o qual foi clonado no vetor pAC321 previamente linearizado com a mesma enzima. O vetor pAC321 contém o gene *ahas* de *Arabidopsis thaliana*, que confere resistência ao herbicida imazapyr (Aragão *et al.*, 2000). Após a obtenção e checagem dos clones, foi selecionado um, o qual foi denominado pGEMPOTY. Este vetor foi utilizado para a transformação de soja via biobalística.

Construção do vetor pCARLA

Inicialmente, procedeu-se à extração de RNA do material vegetal infectado com um isolado de CpMMV (cedido pelo Dr. Álvaro Almeida, Embrapa Soja) proveniente de Barreiras, BA, utilizando-se o kit Micro-to-Midi Total RNA Purification System (Invitrogen). Procedeu-se à síntese de cDNA com *random primers* e amplificação com os oligonucleotídeos CPMMVHINDKPN (5'-AAA GCT TGG TAC CGT CGT CCT TCC TTA GGG C-3') e CPMMVBAMXHO (5'-AGG ATC CCT CGA GGG TGG ATA GTG AGA TGG C-3'). O fragmento esperado, de 493 pb, corresponde a uma região do gene que codifica a proteína capsial. O fragmento amplificado foi inserido no vetor pGEM-T Easy (Promega), segundo as instruções do fabricante. Os clones obtidos foram testados para a presença do fragmento por meio de digestão

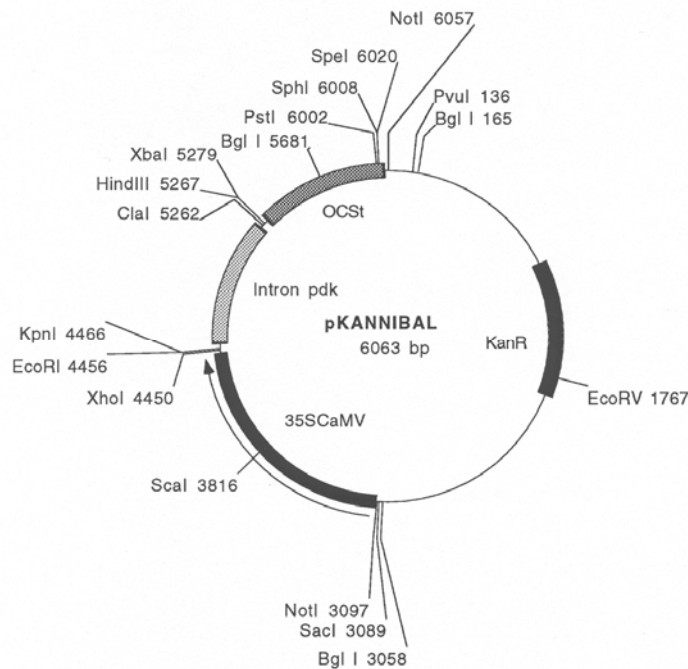


Figura 1. Mapa do vetor pKannibal, que serviu como base para a construção dos vetores de RNAi utilizados para transformação de soja. KanR, gene de resistência a canamicina; Intron pdk, intron do gene *piruvato ortofosfato dicinase (pdk)* de *Flaveria trinervia*; OCSt, terminador do gene *octopina sintase (OCS)* de *Agrobacterium tumefaciens*; 35SCaMV, promotor do RNA 35S do *Cauliflower mosaic virus (CaMV)*.

com *EcoR* I. O clone pGEM-CARLA8 foi escolhido para as etapas subsequentes de construção do vetor. Inicialmente foi realizada a digestão do vetor pKANNIBAL com as enzimas *Xho* I e *Kpn* I, assim como do clone pGEM-CARLA8. Os fragmentos obtidos foram eluídos do gel de agarose e purificados. Em seguida procedeu-se à ligação dos fragmentos e transformação de *E. coli*. Após a triagem dos clones obtidos foi selecionado o clone pKANCARLAXHOKPN1. Este foi então digerido com as enzimas *Hind* III e *Bam*H I, assim como o clone pGEM-CARLA 8. Os fragmentos foram eluídos do gel de agarose e purificados. Foi realizada a ligação e transformação de em *E. coli* e, após a checagem dos clones obtidos, foi selecionado o clone

pKANCARLA12 para o passo posterior. Este foi digerido com a enzima *Not I*, assim como o vetor pAC321, para que após a eluição dos fragmentos esperados fosse realizada a ligação e transformação de *E. coli*. O clone escolhido, denominado pCARLA, foi utilizado para a transformação de embriões de soja via biobalística.

Transformação genética de soja

Para a transformação genética de soja utilizou-se o protocolo desenvolvido na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Rech *et al.*, 2008). Sementes de soja cv. BR16 foram desinfestadas com etanol 70% por 1 min, hipoclorito de sódio 1% por 20 min, lavadas 3 vezes com água destilada estéril e embebidas por 16-18 horas. Os eixos embrionários foram isolados das sementes e o meristema apical foi exposto ao se retirarem os primórdios foliares. Os eixos embrionários foram posicionados com a região apical voltada para cima imediatamente antes do bombardeamento em meio de bombardeamento [MS (Murashige and Skoog, 1962) meio salino basal, sacarose 3% e fitagel Sigma 0,8%, pH 5,7]. O bombardeamento foi conduzido segundo Rech *et al.*, (2008), utilizando aceleração de partículas por alta pressão de gás hélio (Sanford *et al.*, 1991). Cinco microgramas de DNA plasmidial foram utilizados na preparação das micropartículas de tungstênio M10. Para a transformação, o vetor pGEMPOTY foi linearizado por meio de digestão com a enzima *Fsp I*, para inativar o gene de resistência ao antibiótico ampicilina presente no vetor de transformação (Vianna *et al.*, 2004). O vetor pCARLA foi utilizado para o bombardeamento sem ser previamente linearizado, pelo fato de existir um sítio de *Fsp I* adicional no cassete de interferência. A concentração do herbicida imazapyr foi previamente otimizada para selecionar adequadamente os embriões transgênicos.

Após o bombardeamento, os explantes foram transferidos para meio de indução [meio salino basal MS, suplementado com benzilaminopurina 22,2 µM, sacarose 3% e agar Sigma 0,6%, pH 5,7] e mantidos no escuro por 5 dias, quando então foram transferidos para meio MS suplementado com sacarose 3% e agar Sigma 0,6% e 600 nM do herbicida imazapyr (concentração ótima previamente determinada), para seleção dos transformantes. Os explantes

permanecerem na sala de cultura com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ até o aparecimento de brotos e raízes (aproximadamente 3 semanas), quando estavam com 2-4 cm de altura. Neste estágio, procedeu-se à transferência dos explantes para o meio MS suplementado com sacarose 3%, agar Sigma 0,6% e carvão ativado 0,3%, para a otimização do enraizamento *in vitro*. Após o aparecimento de raízes, os brotos foram aclimatados em copos plásticos contendo vermiculita e terra na proporção 1:1, em seguida foram cobertos com saco plástico por um período de 1 semana e mantidos em casa-de-vegetação.

Detecção dos transgenes em linhagens transformadas de soja via PCR

A confirmação da integração do transgene foi verificada via PCR de plântulas que apresentaram alongamento no meio de seleção após o cultivo por um período mínimo de 45 dias após a transformação. Foram selecionadas 4 regiões do vetor de transformação para a seleção das plântulas: gene *ahas*, promotor 35S, gene *OCS* e os fragmentos dos genes virais.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para a triagem das plantas transgênicas obtidas após o bombardeamento de embriões de soja.

Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')
35SKAN199F	CCA CTA TTA CAG AGG CAA GAG CAG C
35SKAN576R	GAC CTG CTG CGT AGG CCT CTC TAA C
OCSKAN83F	GCA TGT GTA GCT CAG ATC CTT ACC
OCSKAN515R	GTA GAG CGG ACG GCC AAT ACT CAA C
AHASP124	ACTAGAGATTCCAGCGTCAC
AHAS500C	GTG GCT ATA CAG ATA CCT GG
SMVXHOXBA	CCT CGA GTC TAG AAA TGG CGT GTG GGT GAT G
SIMOV BAMKPN	AGG TAC CGG ATC CCG CTG CAG CTG AGC CG

O DNA genômico foi extraído de folhas de soja pelo método CTAB (Doyle e Doyle, 1987). Três microlitros do DNA genômico (aproximadamente 50 ng) foram utilizados para cada reação de PCR. A amplificação foi feita em um volume final de 25 µL, contendo KCl 500 mM, Tris-HCl 200mM, pH8,4, MgCl₂ 1,25 mM, 0,25 µM de dNTPs , 0,2 µM de cada oligonucleotídeo e 1,5 U de *Taq* DNA polimerase. As reações foram realizadas em termociclador PTC-100 (MJ Research), com os seguintes parâmetros: desnaturação a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de amplificação (94°C por 30 s, 55°C por 1 min, 72°C por 2 min), com um ciclo de alongação final de 5 min a 72°C. O DNA de plantas não transformadas foi utilizado como controle negativo e o DNA plasmidial usado na transformação genética foi usado como controle positivo.

Desafio das plantas transformadas com o vetor pCARLA

As plantas transgênicas confirmadas via PCR foram desafiadas com o isolado de CpMMV a partir do qual a sequência nucleotídica para a construção do vetor pCARLA foi obtida. O desafio foi realizado por meio da inoculação mecânica com o isolado viral. Duzentos gramas de folhas de soja infectadas pelo CpMMV foram utilizadas como inóculo. O tecido vegetal foi macerado na presença de tampão fosfato de potássio 0,01 M pH 7,2, e o extrato foi aplicado nas folhas previamente pulverizadas com carborundum 600 mesh.

RESULTADOS

Detecção dos transgenes nas plantas transformadas com o vetor pGEMPOTY

Foram bombardeados 1.840 eixos embrionários de soja com o vetor pGEMPOTY. Após o bombardeamento, os eixos embrionários foram cultivados em meio cuja multibrotação foi induzida pela citocinina BAP. Os eixos embrionários permaneceram no escuro durante 24 horas, quando foram transferidos para o meio seletivo contendo imazapyr e transferidos para sala de cultura com fotoperíodo de 16h até o aparecimento de brotos. Os embriões que apresentaram crescimento alongado foram transferidos para o meio MS suplementado com sacarose e carvão ativado, para maximizar a formação de raízes. Destes, 23 transformantes foram positivos para a presença do gene OCS, do promotor 35S, do gene *ahas* e do cassete de interferência quando analisados via PCR, representando uma eficiência de transformação de 1,25%. Infelizmente, devido a problemas operacionais, as plantas morreram durante o período de aclimação. Uma nova etapa de bombardeamento foi realizada, na qual foram bombardeados 960 eixos embrionários de soja. Os embriões encontram-se em meio de seleção e, até o presente momento, foi realizada a detecção em três plântulas obtidas em meio seletivo. Destas, duas foram positivas para a presença do gene OCS, do promotor 35S, do gene *ahas* e do cassete de interferência quando analisadas via PCR.

Deteccção dos transgenes nas plantas transformadas com o vetor pCARLA

Foram bombardeados 1.620 eixos embrionários de soja com o vetor pCARLA. Após o bombardeamento, os eixos embrionários foram cultivados em meio cuja multibrotação foi induzida pela citocinina BAP. Os eixos embrionários permaneceram no escuro durante 24 horas, quando foram transferidos para o meio seletivo contendo imazapyr e transferidos para sala de cultura com fotoperíodo de 16h até o aparecimento de brotos. Os embriões que apresentaram crescimento alongado foram transferidos para o meio MS suplementado com sacarose e carvão ativado, para maximizar a formação de raízes. Destes, 8 transformantes foram positivos para a presença do gene OCS, do promotor 35S, do gene *ahas* e do cassete de interferência quando analisados via PCR, representando uma eficiência de transformação de 0,49%. Dentre as oito plântulas aclimatadas, cinco se estabeleceram e foram desafiadas com o CpMMV.

Desafio das plantas transformadas com o vetor pCARLA

Não foram observados sintomas de infecção viral até 30 dias após a inoculação. Entretanto, também não foram verificados sintomas nas plantas utilizadas como controles. A progênie destas plantas será efetivamente desafiada e monitorada em relação à resistência ao CpMMV.

DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi proposto que o silenciamento de genes virais impediria o acúmulo dos vírus em questão e, conseqüentemente, a indução de sintomas da infecção viral. Diversos exemplos de sucesso dessa estratégia para resistência a vírus com genoma de RNA podem ser encontrados na literatura, entretanto, um menor número de relatos de resistência a vírus com genoma de DNA foram documentados. O uso dos siRNAs, intermediários do silenciamento gênico, transformou-se em uma ferramenta poderosa para reduzir ou mesmo eliminar a expressão de um gene específico, como foi demonstrado com sucesso em uma ampla variedade de células e organismos (Waterhouse *et al.*, 2001). A descoberta de que é necessária a formação de um RNA fita dupla (dsRNA) para a ativação do mecanismo de silenciamento gênico levou à produção de plantas transgênicas contendo construções que induzem a formação de siRNA para promover eficientemente o silenciamento do gene alvo e, conseqüentemente, resistência ao vírus. Existe a expectativa de obtenção de resistência aos vírus em questão em função dos vários casos de sucesso descritos na literatura (Voinnet, 2005; Zerbini *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2007; Ding e Voinnet, 2007; Levy *et al.*, 2008; Prins *et al.*, 2008; Shepherd *et al.*, 2009).

Em relação às taxas de transformação de soja no caso do vetor pGEMPOTY, foi encontrado o valor de 1,25%. Esta taxa encontrada é considerada relativamente alta em relação ao que é comumente verificado em outros trabalhos envolvendo esta espécie de leguminosa. Na segunda etapa de

bombardeamento ainda não é possível inferir o valor da taxa de transformação, pelo fato de as plântulas ainda se encontram em fase de alongamento no meio seletivo. Deve-se levar em consideração que o vetor pGEMPOTY foi utilizado linearizado no bombardeamento dos embriões de soja. O uso de vetores lineares é importante para a inativação dos genes de seleção a antibióticos. Foi utilizado neste trabalho um novo sistema de seleção das células transformadas baseado no uso do herbicida imazapyr. Este marcador de seleção resultou em um aumento significativo, da ordem de 2 a 3 vezes, na recuperação dos transformantes comparado com o protocolo padrão de transformação de feijão, algodão e e soja (Vianna et al., 2004; Rech *et al.*, 2008).

A taxa de transformação verificada neste trabalho no que se refere às plantas transformantes oriundas do bombardeamento com o vetor pCARLA foi de 0,49%. Neste caso, o vetor não foi linearizado previamente. As plantas transgênicas inoculadas com o CpMMV não apresentaram sintomas da infecção pelo vírus até 30 dias após a inoculação. Após este período, duas plantas transgênicas já na fase reprodutiva apresentaram sintomas da infecção viral. Entretanto, os controles não-transformados (plantas oriundas do bombardeamento de eixos embrionários de soja negativas para a presença do transgene) também não apresentaram sintomas. Desta forma, em função dos resultados não terem fornecido informações seguras acerca da resistência das plantas em relação ao vírus, a progênie dessas plantas será desafiada e o monitoramento da infecção viral será realizado por meio de teste sorológico específico para o CpMMV. Em experimentos realizados com a inoculação do BGMV via mosca-branca em plantas homozigóticas e hemizigóticas de feijão, verificou-se que 100% das plantas homozigóticas não apresentaram sintomas da infecção viral, enquanto 28,7% das plantas hemizigóticas apresentaram sintomas leves. As plantas não transgênicas apresentaram sintomas severos duas semanas após a inoculação (Aragão e Josias, comunicação pessoal).

A progênie das plantas será avaliada também quanto à presença do transgene. Tem-se observado a não-transferência de transgenes para a progênie em várias plantas transgênicas (Aragão *et al.*, 2000), fenômeno atribuído a vários fatores, tais como a mutação insercional de genes envolvidos com o desenvolvimento ou com a formação de gametas. A eliminação física de transgenes foi relatada em soja (Aragão *et al.*, 2000), feijão (Aragão *et al.*,

1996), *Cyamopsis tetragonoloba* (Joersbo *et al.*, 1999), *Nicotiana tabacum* (Risseeuw *et al.*, 1997), *Nicotiana plumbaginifolia* (Cherdshewasart *et al.*, 1993, Risseeuw *et al.*, 1997) e *Arabidopsis thaliana* (Feldmann *et al.*, 1997, Howden *et al.*, 1998). O mecanismo envolvido na eliminação física parece estar relacionado à recombinação intracromossomal (Fladung, 1999), instabilidade genética devido às condições de cultura de tecidos (Risseeuw *et al.*, 1997, Joersbo *et al.*, 1999), ou a um processo de defesa genômica contra genes exógenos (Srivastava *et al.*, 1996).

A possibilidade de se verificar algum evento de transformação nos dois casos explorados no presente trabalho é promissora, ao se considerar que vários trabalhos realizados em diferentes espécies vegetais que utilizaram esta tecnologia obtiveram sucesso (Voinnet, 2005; Zerbini *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2007; Ding e Voinnet, 2007; Levy *et al.*, 2008; Prins *et al.*, 2008; Shepherd *et al.*, 2009).

LITERATURA CITADA

- Aragão, F.J.L. Engenharia genética na agricultura. *In*: Paterniani, E. (Org.). Ciência, agricultura e sociedade. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica. p.155-93. 2006.
- Aragão, F.J.L., Sá, M.F.G., Almeida, E.R., Gander, E.S., Rech, E.L. Particle bombardment-mediated transient expression of a Brazil nut methionine-rich albumin in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Molecular Biology*, v. 20, p. 357-359. 1992.
- Aragão, F.J.L., Vianna, G.R., Carvalheira, S., Rech, E.L. Germ line genetic transformation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by selection of transgenic meristematic cells with a herbicide molecule. *Plant Science*, v. 168, p. 1227-1233. 2005.
- Baulcombe, D.C. Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell*, v. 8, p. 1833-1844. 1996.
- Bonfim, K., Faria, J.C., Nogueira, E.O., Mendes, E.A., Aragão, F.J. RNAi-mediated resistance to *Bean golden mosaic virus* in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Molecular Plant Microbe Interactions*, v. 20, p. 717-726. 2007.
- Brasileiro, A.C.M., Carneiro, V.T.C., Eds. Manual de Transformação Genética de Plantas. Brasília, DF: Embrapa Cenargen, 176 p. 1998.
- Chen, Y.K., D. Lohuis, R. Goldbach, M. Prins. High frequency induction of RNA-mediated resistance against *Cucumber mosaic virus* using inverted repeat constructs. *Molecular Breeding*, v. 14, p. 215–226. 2004.
- Chung, G., Singh, R.J. Broadening the genetic base of soybean: A multidisciplinary approach. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 27, p. 295-341. 2008.
- De Mello-Farias, P.C., Chaves, A.L.S. Advances in Agrobacterium-mediated plant transformation with emphasis on soybean. *Scientia Agricola*, v. 65, p. 95-106. 2008.

- Ding, S., Voinnet, O. Antiviral immunity directed by small RNAs
Cell, v. 130, p. 413-426. 2007.
- Eamens, A., Wang, M., Smith, N.A., Waterhouse, P.M. RNA silencing in plants:
Yesterday, today, and tomorrow. Plant Physiology, v. 147, p. 456-468. 2008.
- Fuentes, A., Ramos, P.L., Fiallo, E., Callard, D., Sánchez, Y., Peral, R.,
Rodríguez, Pujol, M. Intron-hairpin RNA derived from replication associated
protein C1 gene confers immunity to Tomato Yellow Leaf Curl Virus infection
in transgenic tomato plants. Transgenic Research, v. 15, p. 291-304. 2006.
- Fusaro, A.F., Matthew, L., Smith, N.A., Curtin, S.J., Dedic-Hagan, J.,
Ellacott, G.A., Watson, J.M., Wang, M.B., Brosnan, C., Carroll, B.J., et al.
RNA interference-inducing hairpin RNAs in plants act through the viral
defence pathway. EMBO Rep., v. 7, p. 1168-1175. 2006.
- Goldbach, R., Bucher, E., Prins, M. Resistance mechanisms to plant viruses:
An overview. Virus Research, v. 92, p. 207-212. 2003.
- Harrier, L.A., Millam, S. Biolistic transformation of arbuscular mycorrhizal fungi:
progress and perspectives. Molecular Biotechnology, v. 18, p. 25-33. 2007.
- Helliwell, C., Waterhouse, P. Constructs and methods for high-throughput gene
silencing in plants. Methods, v. 30, p. 289-295. 2003.
- Hily, J.M., Scorza, R., Webb, K., Ravelonandro, M. Accumulation of the long
class of siRNA is associated with resistance to Plum pox virus in a transgenic
woody perennial plum tree. Molecular Plant-Microbe Interactions, v.18, p.
794-799. 2005.
- Ivo, N.L. , Nascimento, C.P. , Vieira, L.S. , Campos, F.A.P. , Aragão, F.J.L.
Biolistic-mediated genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata*) and
stable Mendelian inheritance of transgenes. Plant Cell Reports, v. 27, p.
1475-1483. 2008.
- Kalantidis, K., Psaradakis, S., Tabler, M., Tsagris, M. The occurrence of CMV-
specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus-derived double-
stranded RNA is indicative of resistance to the virus. Molecular Plant-Microbe
Interactions, v. 15, p. 826-833. 2002.
- Levy, A., Dafny-Yelin, M., Tzfira, T. Attacking the defenders: plant viruses fight
back. Trends in Microbiology, v. 16, p. 194-197. 2008.
- Lin, S.S., Henriques, R., Wu, H., Niu, Q., Yeh, S., Chua, N. Strategies and
mechanisms of plant virus resistance. Plant Biotechnology Reports, v.1, 125-
134. 2007.
- Lindbo, J.A., Dougherty, W.G. Untranslatable transcripts of the tobacco etch
virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus
Replication in transgenic plants and protoplasts. Virology, v. 189, p. 725-33.
1992.
- Nomura, K., Ohshima, K., Anai, T., Uekusa, H., Kita, N. RNA silencing of the
introduced coat protein gene of *Turnip mosaic virus* confers broad-spectrum
resistance in transgenic *Arabidopsis*. Phytopathology, v. 94, p. 730-736.
2004.

- Nunes, A.C.S , Vianna, G.R , Cuneo, F. , Amaya-Farfan, J. , Capdeville, G. , Rech, E.L , Aragão, F.J.L. RNAi-mediated silencing of the myo-inositol-1-phosphate synthase gene (GmMIPS1) in transgenic soybean inhibited seed development and reduced phytate content. *Planta*, v. 224, p. 125-132. 2006.
- Prins, M. Broad virus resistance in transgenic plants. *Trends in Biotechnology*, v. 21, p. 373-375. 2003.
- Prins, M., Laimer, M., Noris, E., Schubert, J., Wassenegger, M., Tepfer, M. Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Molecular Plant Pathology*, v. 9, p. 73-83. 2008.
- Rech, E L , Vianna, G. R. , Aragão, FJL . High efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. *Nature Protocols*, v. 3, p. 410-418. 2008.
- Ritzenthaler, C. Resistance to plants viruses: Old issue, new answers? *Current Opinion in Biotechnology*, v. 16, p. 118–122. 2005.
- Rodriguez-Negrete, E.A., Carrillo-Tripp, J., Rivera-Bustamante, R.F. RNA silencing against geminivirus: Complementary action of posttranscriptional gene silencing and transcriptional gene silencing in host recovery. *Journal of Virology*, v. 83, p. 1332-1340. 2009.
- Sanford, J.C., Johnston, S.A. The concept of parasite-derived resistance - Deriving resistance genes from the parasite's own genome. *Journal of Theoretical Biology*, v. 113, p. 395-405. 1985.
- Sanford, J.C., Smith, F.D., Russel, J.A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. *In: WU, R. (Ed.). Recombinant DNA – Part H. San Diego: Academic Press. pp. 483-509. 1993.*
- Sharma, K.K., Bhatnagar-Mathur, P., Thorpe, T.A. Genetic transformation technology: Status and problems. *In Vitro Cellular e Developmental Biology-Plant*, v. 41, p. 102-112. 2005.
- Shepherd, D.N., Martin, D., Thomson, J.A. Transgenic strategies for developing crops resistant to geminiviruses. *Plant Science*, v. 176, p. 1-11. 2009.
- Smith, N.A., Singh, S.P. Wang, M.B., Stoutjesdijk, P.A., Green, A.G., Waterhouse, P.M. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature*, v. 407, p. 319–320. 2000.
- Southgate, E.M., Davey, M.R., Power, J.B., Marchant, R. Factors affecting the genetic engineering of plants by microprojectile bombardment. *Biotechnology Advances*, v. 13, p. 631-651. 1995.
- Sunagawa, M., Murata, H., Miyazaki, Y., Nakamura, M. Transformation of the mycorrhizal basidiomycetes, *Suillus grevillei* and *S. bovinus*, by particle bombardment, *Biosciences, Biotechnology and Biochemistry*, v. 71, p. 47-50. 2007.
- Trinks, D., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P.V., Akbergenov, R., Oakeley, E.J., Veluthambi, K., Hohn, T., Pooggin, M.M. Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. *Journal of Virology*, v. 79, p. 2517–2527. 2005

- Vain, P. Thirty years of plant transformation technology development. *Plant Biotechnology Journal*, v. 5, p. 221-229. 2007.
- Voinnet, O. Non-cell autonomous RNA silencing. *FEBS Letters*, v. 579, p. 5858–5871. 2005.
- Waterhouse, P.M., Wang, M.B., Lough, T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature*, v. 411, p.834-842. 2001.
- Waterhouse, P.M., Graham, M.W., Wang, M.B. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 95, p. 13959-13964. 1998.
- Waterhouse, P. M., C. A. Helliwell. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nature Reviews Genetics*, v. 4, p. 29–38. 2003.
- Weld, R.J., Plummer, K., Carpenter, M.A., Ridgway, H.J. Approaches to functional genomics in filamentous fungi. *Cell Research*, v. 16, p. 31-44. 2006.
- Zerbini, F.M., Alfenas, P.F., Andrade, E.C. O silenciamento de RNA como um mecanismo de defesa de plantas a vírus. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v. 13, p. 191-246. 2005.