

ANDREIA VARMES FERNANDES

CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE DOIS *Begomovirus*
QUE INFECTAM *Sida rhombifolia*

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Curso de Agroquímica,
para obtenção do título de “Magister
Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
NOVEMBRO – 1999

ANDREIA VARMES FERNANDES

CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE DOIS *Begomovirus*
QUE INFECTAM *Sida rhombifolia*

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Agroquímica, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 6 de agosto de 1999.

Prof. Francisco Murilo Zerbini Júnior
(Conselheiro)

Prof. Maurílio Alves Moreira
(Conselheiro)

Prof^ª Márcia Rogéria de Almeida

Prof. Luiz Orlando de Oliveira

Prof^ª Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Orientadora)

AGRADECIMENTO

O ambiente de trabalho aos poucos nos revela aquelas pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuem para a realização de um trabalho. A essas pessoas, o meu muito obrigada pela força, pelo esclarecimento e pelas boas conversas. Assim, alguns nomes e instituições devem ser citados:

Ao Curso de Agroquímica da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de obter este título.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

À professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes, pela orientação e pela contribuição para a minha formação profissional.

Aos meus conselheiros Maurílio Alves Moreira e Francisco Murilo Zerbini, pelo apoio científico.

Ao meu e sempre meu Francisco, pela paciência e pela dedicação.

Ao meu colega de trabalho Rafaelo, pela colaboração, principalmente no início deste trabalho.

Aos meus colegas de Projeto de Pesquisa Eduardo, Poliane, Andrea, Marcelo e Jeferson, pelos bons momentos.

Aos meus colegas de laboratório Soninha, Fátima, Joci, Júlio e Raul, pelas agradáveis conversas e pelos esclarecimentos de dúvidas ou até mesmo confundindo ainda mais.

Ao professor Everaldo, pelo acesso ao seu computador.

Ao Senhor Fizinho, do Departamento de Fitopatologia, pelas preciosas plantinhas.

BIOGRAFIA

ANDREIA VARMES FERNANDES, filha de José Fernandes e Vandecy Varmes Fernandes, nasceu em Mantena, Estado de Minas Gerais.

Em 1997, bacharelou-se e licenciou-se em Química pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa Minas Gerais.

No segundo semestre de 1997, nessa mesma Universidade, ingressou no Curso de Mestrado em Agroquímica, defendendo a tese em 6 de agosto de 1999.

CONTEÚDO

| | Página |
|---|--------|
| EXTRATO | viii |
| ABSTRACT | x |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 4 |
| 2.1. A família <i>Geminiviridae</i> | 4 |
| 2.2. Proteínas virais | 6 |
| 2.3. Replicação e movimento | 11 |
| 2.4. Pseudo-recombinação entre <i>Begomovirus</i> | 13 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 16 |
| 3.1. Material vegetal e obtenção de plantas sintomáticas | 16 |
| 3.2. Extração de DNA total de plantas infectadas | 16 |
| 3.3. Propagação do vírus via biolística | 18 |
| 3.4. Diagnóstico das plantas sintomáticas | 18 |
| 3.4.1. Amplificação por PCR | 18 |
| 3.4.2. Análise de “Southern blot” | 19 |
| 3.5. Clonagem do genoma viral diretamente do DNA extraído de <i>Sida rhombifolia</i> | 21 |

| | Página |
|---|--------|
| 3.5.1. Clonagem dos fragmentos parciais do genoma viral | 21 |
| 3.5.2. Seqüenciamento e análises comparativas de seqüências | 21 |
| 3.5.3. Construção de iniciadores específicos | 21 |
| 3.5.4. Amplificação e clonagem do componente genômico completo | 22 |
| 3.5.5. Diagnóstico dos clones | 23 |
| 3.6. Clonagem do vírus transmitido por meio de biolística para <i>N. benthamiana</i> | 24 |
| 3.6.1. Estratégia de clonagem | 24 |
| 3.6.2. Diagnóstico do clone | 24 |
| 3.7. Caracterização molecular dos genomas virais | 25 |
| 3.7.1. Estratégia de seqüenciamento de pUFV 153 e pUFV 135 | 25 |
| 3.7.1.1. Obtenção e descrição dos subclones de pUFV 153 | 25 |
| 3.7.1.2. Oligonucleotídios específicos para pUFV 153 | 26 |
| 3.7.1.3. Obtenção e descrição dos subclones de pUFV 135 | 27 |
| 3.7.2. Reações de seqüenciamento | 27 |
| 3.7.3. Similaridades e análises filogenéticas | 28 |
| 3.8. Análise da infectividade dos genomas clonados | 30 |
| 3.8.1. Clonagem dos clones pUFV 135 e pUFV 153 em 1,5 cópia | 30 |
| 3.8.2. Inoculação por biolística | 30 |
| 3.8.3. Inoculação via extrato vegetal | 31 |
| 3.8.4. Análise de pseudo-recombinação | 31 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 32 |
| 4.1. Clonagem molecular do vírus detectado em <i>Sida rhombifolia</i> | 32 |
| 4.2. Clonagem molecular do vírus de <i>Sida</i> a partir de <i>Nicotiana</i> <i>benthamiana</i> infectada por biolística | 37 |
| 4.3. Seqüenciamento dos componentes genômicos do vírus de <i>Sida</i> <i>rhombifolia</i> mosqueado e do vírus de <i>Sida rhombifolia</i> do mosaico amarelo | 39 |
| 4.4. Organização do genoma de SMoV e SYMV | 44 |

| | Página |
|---|--------|
| 4.5. Classificação dos componentes SMoV-A e SYMV-A, utilizando-se comparações de seqüências | 47 |
| 4.6. Análise de infectividade dos genomas virais clonados | 49 |
| 5. RESUMO E CONCLUSÕES | 54 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 56 |

EXTRATO

FERNANDES, Andreia Varmes, M. S., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 1999. **Clonagem e caracterização molecular de dois *Begomovirus* que infectam *Sida rhombifolia***. Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Conselheiros: Francisco Murilo Zerbini Júnior e Maurílio Alves Moreira.

A família *Geminiviridae* é constituída por vírus de plantas que possuem genomas de DNA circular de fita simples. Atualmente, está dividida em três gêneros, *Mastrevirus*, *Curtovirus* e *Begomovirus*, de acordo com o inseto transmissor, o tipo de hospedeiro e a organização do genoma, possuindo um ou dois componentes. A presença de geminivírus em plantas de *Sida rhombifolia* com sintomas de infecção viral foi detectada, em nível molecular, por PCR e “Southern blot”. O vírus proveniente de uma das amostras de *Sida rhombifolia* foi propagado em *Nicotiana benthamiana* via biolística, induzindo o sintoma de mosqueado. O componente A desse vírus foi clonado, seqüenciado e submetido à análise de comparação de seqüências, a qual indicou tratar-se de um novo *Begomovirus*. Pela análise filogenética, esse componente foi classificado como pertencente a um *Begomovirus* do hemisfério ocidental, que foi denominado vírus do mosqueado de *Sida*, SMoV. Entretanto, o componente B cognato desse

vírus não foi encontrado. Uma segunda amostra de *Sida rhombifolia* com sintoma de mosaico foi utilizada para clonagem direta do componente A, por meio de amplificação do componente genômico completo, utilizando-se iniciadores específicos. O componente A foi clonado e seqüenciado, e a análise da seqüência indicou a classificação como *Begomovirus* do hemisfério ocidental, sendo denominado vírus do mosaico amarelo de *Sida*, SYMV. Ambos os vírus (SMoV-A e SYMV-A) foram inoculados em plantas indicadoras por biolística, mas nenhuma planta apresentou sintoma de infecção viral. Tais resultados foram coerentes com a classificação filogenética dos dois novos *Begomovirus*, indicando que, provavelmente, SMoV e SYMV possuem dois componentes, embora o componente B de SYMV e SMoV não tenham sido detectado em amostras de *Sida* com sintomas. Ensaio de infecção mista evidenciaram que SMoV-A é funcional e se move sistemicamente em *Nicotiana benthamiana* na presença de proteínas de movimento heterólogas, fornecidas *in trans*. SMoV-A foi detectado por “Southern blot” em folhas apicais de *N. benthamiana* infectada com TGMV-A, TGMV-B e SMoV-A. A identificação de pelo menos dois novos *Begomovirus* em *Sida rhombifolia* indicou que esses vírus são facilmente adaptados a essas plantas. A ocorrência de ambos os vírus em uma mesma planta pode facilitar a recombinação interespecie, contribuindo para o processo evolutivo dessa família de fitovírus.

ABSTRACT

FERNANDES, Andreia Varmes, M. S., Universidade Federal de Viçosa, november of 1999. **Cloning and molecular characterization of two *Begomovirus* infecting *Sida rhombifolia*.** Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Committee Members: Francisco Murilo Zerbini Júnior and Maurílio Alves Moreira.

The *Geminiviridae* family comprises a group of plant viruses that are packaged as single-stranded circular DNA in virions. The species of this family fall into three genus, *Mastrevirus*, *Curtovirus* and *Begomovirus*, based on the insect vector, host range and genome organization which can be either monopartite or bipartite. We have detected geminivirus in *Sida rhombifolia* plants by PCR and Southern Blots. The virus from one of the *Sida* samples has been successfully propagated in *Nicotiana benthamiana* using a biolistic infection assay and developed a mottle symptom phenotype in these plants. I have cloned and sequenced the A-component of the *Sida rhombifolia* mottle geminivirus and showed by sequence comparison analysis that it is a new species of *Begomovirus* from West Hemisphere. The taxonomy of the new virus was confirmed by phylogenetic analysis and the virus was named SMOV, *Sida mottle virus*. However, attempts to clone its B component have not been succeeded. A

second sample of DNA from infected *Sida rhombifolia* showing mosaic symptoms was directly used to amplify the full genome of the virus with specific primers, which were designed from partial sequencing analysis. Sequence comparison and phylogenetic analyses of the cloned viral component classified the *Sida rhombifolia* mosaic geminivirus as new specie of the *Begomovirus* genus, also from the West Hemisphere, named SYMV, *Sida yellow mosaivc virus*. The cloned components of the viruses SMOV and SYMV failed to infect and develop symptoms in several plants, including *S. rhombifolia* and *N. benthamiana*. These results are consistent with the taxonomic classification of the new viruses, indicating that most likely these viruses are bipartite, even though previous results have failed to detect a SYMV B-component in infected *Sida*. Multiple infection assays demonstrated that the cloned SMOV-A component is infectious, if compatible movement functions are provided in trans. In fact, SMOV-A DNA was detected in young non-inoculated leaves of *N. benthamiana*, which were infected with the combination of TGMV-A, TGMV-B and SMOV-A. The detection of at least two new *Sida rhombifolia*-infecting geminivirus indicated that these viruses are well adapted to this host. Therefore, the possible co-existence of the two viruses in the same host may facilitate interspecies recombination, which has been proposed to contribute majority to the evolution and emergence of new species of geminivirus.

1. INTRODUÇÃO

Geminiviridae é uma família de fitovírus caracterizada por morfologia de capsídeo icosaédrico geminado, pequeno genoma de DNA circular de fita simples e vasta gama de hospedeiros. Esta família é classificada em três gêneros, de acordo com a sua gama de hospedeiros (mono ou dicotiledôneas), inseto-vetor (cigarrinha, ou mosca-branca) e organização do genoma (mono ou bissegmentado). Os geminivírus bissegmentados descritos apresentam bastante similaridade quanto à organização do genoma, sendo constituídos de dois componentes, designados A e B. O componente A codifica as proteínas virais requeridas para replicação, AC1 (Rap) e AC3 (Ren); transcrição do DNA viral, AC2 (TrAP); e encapsidação do genoma viral, AV1 (CP). O componente B codifica as proteínas BC1 (MP) e BV1 (NSP) envolvidas no movimento do vírus na planta. Ambos os componentes possuem região intergênica (IR), conhecida como região comum (RC), que inclui um segmento de 180 a 200 nucleotídios de seqüência altamente conservada entre os dois componentes da mesma espécie. Entre geminivírus diferentes, IR é completamente divergente, mas possui elemento conservado com potencial para formar uma estrutura em forma de grampo, que constitui um domínio funcional de replicação (LAZAROWITZ, 1992).

Geminivírus pertencem a um dos dois grupos de vírus de plantas descritos que replicam no núcleo de células de plantas infectadas, via intermediários de DNA. Além disso, os genes virais são transcritos pela RNA polimerase II e os RNAs virais, poliadenilados. Essas características fazem dos geminivírus excelentes sistemas para o desenvolvimento de vetores de expressão em plantas e para o estudo da regulação de genes e replicação de DNA de plantas (DAVIES e STANLEY, 1989; LAZAROWITZ, 1992).

Todos os geminivírus empregam a mesma estratégia geral para duplicar e expressar seus genomas. Por meio do mecanismo de replicação círculo-rolante, DNA viral fita simples é convertido em DNA fita dupla, que serve como moldes replicativos e transcrpcionais. A forma fita dupla é divergentemente transcrita na região intergênica 5', que também inclui a origem de replicação da fita positiva do vírion (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999).

O interesse por geminivírus não se restringe à sua potencialidade como modelo de estudo de processos celulares básicos, uma vez que esses vírus estão associados a epidemias devastadoras em plantações de tomate, feijão e pimenta nas Américas (SIMONE et al., 1990; HIDAYAT et al., 1993). Em alguns casos, a incidência de geminivírus pode ser tão severa, que certas culturas nem se desenvolvem, como é o caso da ação do *African cassava mosaic virus* (ACMV) e do *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) no hemisfério leste. Atualmente, os geminivírus transmitidos por mosca-branca se tornaram um dos maiores grupos de fitopatógenos nas regiões tropicais e subtropicais, ressaltando-se que o controle desses vírus depende exclusivamente do uso de inseticidas (ANDERSON e POLSTON, 1997). O aumento da incidência de geminivirose nessas regiões se deve, principalmente, à introdução de uma nova espécie de mosca-branca, *Bemisia argentifoli*, que coloniza solanáceas muito mais eficientemente que as espécies então existentes na América do Norte (ANDERSON e POLSTON, 1997). Além da expansão do inseto transmissor, a emergência de geminivírus em todo o mundo tem sido associada à coexistência de geminivírus em hospedeiros comuns, possibilitando a recombinação interespecie, como processo evolutivo. De fato, diversos geminivírus coexistem

em plantas de ervas daninhas e ornamentais, tal como *Sida rhombifolia*. Tais ervas daninhas são consideradas reservatórios naturais para geminivírus, a partir das quais as culturas economicamente importantes parecem ser infectadas (GILBERTSON et al., 1993; HOFER et al., 1997). Frequentemente, plantas de *Sida rhombifolia* são colonizadas por mosca-branca, um dos agentes transmissores dos geminivírus, o que provavelmente constitui a origem de várias epidemias de geminivírus (GILBERTSON et al., 1993). Recentemente, foram descritos três novos geminivírus que infectam *Sida rhombifolia* na América Central, sendo o vírus do mosaico dourado da *Sida* de Costa Rica (SiGMV-Co) capaz de infectar feijoeiros e tomateiros (HOFER et al., 1997). Essas observações evidenciam a importância em se caracterizar o complexo de geminivírus detectado previamente em *Sida rhombifolia* na região de Viçosa. Assim, os estudos aqui propostos visam à clonagem e à caracterização molecular desses novos vírus, bem como à análise de pseudo-recombinantes com componentes virais clonados de diferentes amostras de plantas sintomáticas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A família *Geminiviridae*

Geminivírus são transmitidos naturalmente por insetos-vetor, que podem ser mosca-branca (*Bemisia tabaci* e *argentifoli*), ou cigarrinha (*Cicadulina* spp.). Conforme inicialmente demonstrado para o vírus transmitido por mosca-branca, *Bean golden mosaic virus* (BGMV-PR) (GOODMAN, 1977), e para o *Maize streak virus* (MSV) transmitido por cigarrinha (HARRISON et al., 1977), os genomas de geminivírus consistem de DNA circular fita simples (ssDNA), podendo ser constituídos de uma ou duas moléculas com tamanhos entre 2,4 e $3,0 \times 10^3$ nucleotídios (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999). A família *Geminiviridae* está atualmente dividida em três gêneros, *Mastrevirus*, *Begomovirus* e *Curtovirus*, de acordo com o inseto transmissor, o tipo de hospedeiro e a organização do genoma (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999).

Os geminivírus pertencentes ao gênero *Begomovirus* são transmitidos por mosca-branca (STANLEY e GAY, 1983; FRISCHMUTH et al., 1990) e infectam dicotiledôneas. Os membros desse gênero possuem seus genomas constituídos de dois componentes, denominados DNA A e DNA B, embora algumas exceções, como o *Tomato leaf curl vírus* (TLCV-Au), cujo genoma é

monossegmentado, tenham sido descritas (BRIDDON et al., 1994). Nos *Begomovirus* bissegmentados, ambos os componentes são requeridos para infecção sistêmica de plantas (HAMILTON et al., 1983; KLINKENBERG e STANLEY, 1990; PADIDAM et al., 1995b). O DNA A codifica o gene da proteína do capsídeo e os genes envolvidos na replicação do genoma viral e na transativação dos genes vírion-senso, e o DNA B codifica duas proteínas de movimento. Os *Begomovirus* identificados no hemisfério ocidental, *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), BGMV e o *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV) são mais estreitamente relacionados do que aqueles vírus encontrados no hemisfério oriental, como o *Tomato yellow leaf curl virus* isolado de Israel (TYLCV-Is) e o ACMV. Todos os *Begomovirus* do hemisfério ocidental são bissegmentados e não codificam o gene denominado V1 (PALMER e RYBICK, 1998). O produto desse gene funciona como proteína de movimento (PADIDAM et al., 1995b) e, provavelmente, constitui um dos fatores que têm permitido alguns *Begomovirus* a dispensar seus DNA B em certos hospedeiros (RYBICKI, 1994).

Os *Curtovirus*, representados pelo vírus do encarquilhamento do ápice da beterraba (BCTV), ocupam posição intermediária entre os *Mastrevirus* e os *Begomovirus*, com a ressalva de que possuem genomas monossegmentados e são transmitidos por cigarrinha. Baseado em análises filogenéticas das seqüências virais, tem sido proposto que os *Curtovirus* surgiram como resultado de um evento de recombinação entre um ancestral *Mastrevirus* e um *Begomovirus* (RYBICKI, 1994).

Os *Mastrevirus*, representados pelo MSV, e o *Wheat dwarf virus* (WDV) são constituídos de genomas de componente único e, geralmente, infectam monocotiledôneas. Com exceção do *Tobacco yellow dwarf virus* da Austrália (TYDV-Au) (MORRIS et al., 1992) e do *Bean yellow dwarf virus* (BeYDV) (LIU et al., 1997), capazes de infectar plantas dicotiledôneas, todos os *Mastrevirus* são transmitidos por diferentes espécies de cigarrinhas.

O genoma viral codifica proteínas específicas envolvidas no início da replicação, transativação dos promotores dos genes vírion-senso, produção de ssDNA e funções de movimento do vírus (PALMER e RYBICK, 1998). Análise

comparativa de seqüência de diferentes genes virais revelou características conservadas entre todos os três gêneros da família *Geminiviridae*, assim como características que são gênero-específicas (RYBICKI, 1994). Os *Begomovirus* parecem ser mais complexos quanto à organização genômica e aos mecanismos regulatórios. Em alguns casos, a maior complexidade do genoma viral reflete o aparecimento de genes extras, com o objetivo de aumentar a eficiência de definidas funções virais. Nesses casos, tais genes extras codificam proteínas acessórias envolvidas em funções similares, comuns a todos os geminivírus. Por exemplo, o gene AC3 codificado pelo genoma de *Begomovirus* não possui homólogo em *Mastrevirus*. A proteína AC3 de *Begomovirus* aumenta a eficiência de replicação do vírus (ELMER et al., 1988; SUNTER et al., 1990).

Todos os geminivírus contêm uma região intergênica (IR) de onde se inicia a transcrição dos genes virais, nas fitas complementares e no vírion-senso (STANLEY e GAY, 1983; HAMILTON et al., 1984). A IR contém seqüências promotoras que são reconhecidas pela RNA polimerase II, responsável pela transcrição divergente dos genes, e também contém a origem de replicação da fita positiva. IR de todos os geminivírus contém uma seqüência repetida invertida que é capaz de formar uma estrutura em forma de grampo, requerida para replicação (OROZCO et al., 1996). Uma seqüência conservada de 9 nucleotídios, encontrada na alça da estrutura em forma de grampo, representa a seqüência em que a proteína iniciadora de replicação (AC1) induziu uma clivagem específica na fita positiva do genoma viral para iniciar a replicação círculo-rolante (LAUFS et al., 1995b; STANLEY, 1995).

2.2. Proteínas virais

A capacidade codificadora dos genomas virais varia entre os membros dos diferentes gêneros dos geminivírus. Os *Mastrevirus* codificam quatro genes com a capacidade de produção de polipeptídios maiores que 10 kDa, enquanto os *Curtovirus* e os *Begomovirus* codificam de seis a sete genes (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999).

Os *Begomovirus* consistem tipicamente de dois componentes, que são requeridos para infecção (STANLEY, 1983; HAMILTON et al., 1983). O componente A contém 5 genes, sendo 4 (*ac1*, *ac2*, *ac3* e *ac4*) codificados por seqüências sobrepostas na fita complementar e 1 gene (*ar1*) codificado pela fita do vírion. O componente B codifica 2 genes, 1 gene (*bc1*) na fita complementar e outro (*bv1*) na fita do vírion (ELMER et al., 1988; ETESSAMI et al., 1988 e 1991). O gene *ac1* codifica a proteína AC1, também denominada RAP (“Replication Associated Protein”), que é a única proteína viral, essencial e suficiente para conduzir o processo de replicação na presença de fatores do hospedeiro (HANLEY-BOWDOIN, 1989). Nos *Curtovirus*, o gene *c1* codifica a proteína homóloga a RAP, enquanto nos *Mastrevirus* o produto dos genes *c1* e *c2* desempenham a função análoga de RAP. A proteína RAP se localiza no núcleo de células de plantas infectadas (NAGAR et al., 1995), onde desempenha papel-chave na replicação e transcrição de geminivírus (LAUFS et al., 1995a). RAP confere reconhecimento vírus-específico de sua origem cognata de replicação e inicia replicação da fita positiva (HEYRAUD-NITSCHKE et al., 1995; LAUFS et al., 1995b; OROZCO e HANLEY-BOWDOIN, 1996). Além disso, RAP reprime sua própria expressão em nível de transcrição (SUNTER et al., 1993; EAGLE et al., 1994). RAP também induz a expressão do fator de síntese do DNA do hospedeiro, PCNA, em células que não se encontram em processo de divisão celular (NAGAR et al., 1995), possivelmente por meio de interações com a maquinaria do ciclo celular da planta. Foi também demonstrado que RAP de TGMV interage com um homólogo de proteína de retinoblastoma, recém-isolado de milho (ACH et al., 1997), e que a proteína de replicação dos *Mastrevirus* interage com proteínas de retinoblastoma de seres humanos (XIE et al., 1995; COLLIN et al., 1996).

Esses resultados indicaram que as proteínas de *Mastrevirus* e *Begomovirus* interagem com proteínas envolvidas no controle do ciclo celular do hospedeiro, promovendo a associação entre os ciclos de replicação dos DNA celular e viral.

A proteína RAP de geminivírus contém 3 seqüências de aminoácidos conservadas, que estão relacionadas a motivos encontrados em proteínas

iniciadoras do círculo-rolante em outros sistemas (ILYNA e KOONIN, 1992; KOONIN et al., 1991). Coerente com essa observação, a proteína RAP de TYLCV especificamente cliva uma seqüência conservada na alça da estrutura em forma de grampo, presente em todos os geminivírus, e, subseqüentemente, liga a fita positiva do DNA viral (LAUFS et al., 1995b). A atividade clivagem/ligação foi também detectada na proteína RAP de WDV e TGMV (HEYRAUD-NITSCHKE et al., 1995; OROZCO e HANLEY-BOWDOIN, 1996 e 1998). Recentemente, têm sido identificados os domínios e os aminoácidos que mediam as diferentes funções da proteína RAP. O N terminal da proteína RAP de WDV, TYLCV e TGMV é suficiente para suportar a clivagem e a ligação do DNA *in vitro* (HEYRAUD-NITSCHKE et al., 1995; OROZCO et al., 1997). Entretanto, muito pouco se sabe sobre o C terminal das proteínas RAP. A única atividade bioquímica que tem sido atribuída a essa região é atividade de hidrolisar ATP (DESBIEZ et al., 1995). Esse domínio de ATPase foi mapeado na proteína RAP do TGMV, a qual se localizava entre os aminoácidos 182 e 352 (OROZCO et al., 1997).

A proteína AC3/C3, designada REN (“Replication Enhancer”), aumenta o acúmulo de DNA viral de geminivírus do gênero do *Curtovirus* e *Begomovirus*, por meio de um mecanismo ainda não conhecido (ELMER et al., 1988; SUNTER et al., 1990). Essa proteína também se localiza no núcleo das células infectadas em níveis similares aos da proteína RAP (PEDERSEN et al., 1994; NAGAR et al., 1995), indicando que ela deve agir com RAP durante a iniciação da replicação do DNA viral. Têm sido demonstrado que a proteína AC3 de TGMV e BGMV, além de oligomerizar, interage com RAP (SETTLAGE et al., 1996). Interação com RAP deve ser necessária para recrutar AC3 para a origem, onde ela afeta algum aspecto da iniciação de replicação. Essa idéia é consistente com a observação de que AC3 não exhibe atividade de ligação ao DNA (DePAMPHILIS, 1988).

A proteína AC2/C2, também designada TrAP (“Transactivator Protein”), é uma proteína nuclear que, nos *Begomovirus*, transativa a expressão de genes da fita positiva do DNA viral, de maneira vírus não específica (SUNTER e BISARO

et al., 1991). Foi demonstrado que AC2 de TGMV transativa a expressão dos promotores dos genes da proteína do capsídeo e da proteína de movimento BV1 (SUNTER e BISARO et al., 1992). Em plantas transgênicas contendo versões completas e truncadas do promotor da proteína do capsídeo fundidas a genes repórteres, AC2 é requerida para expressão do gene repórter em ambos os tecidos do mesófilo e do floema (SUNTER e BISARO et al., 1997). Recentemente, foi identificado um elemento em cis envolvido na mediação da transativação do gene da proteína do capsídeo em *Pepper huasteco virus* (PHV) (MEDRANO et al., 1999). Quando essas seqüências regulatórias foram mutadas em seu contexto original (promotor truncado com 115 nucleotídios), esse promotor perdeu sua habilidade em ser transativado por AC2. Além disso, foi demonstrado que a infecção por ACMV é capaz de ativar um transgene que está sob o controle do promotor AV1 (HONG et al., 1996). No entanto, o mecanismo de atuação de AC2/C2 para ativação da transcrição permanece a ser elucidado. Embora AC2 de TYLCV e AC2 de *Pepper yellow mosaic virus* (PYMV) liguem a DNA fita simples com alta afinidade, tais proteínas ligam a DNA fita dupla com baixa afinidade. Acredita-se que seus domínios de ligação, que são ricos em cisteínas e histidinas, possuam um dedo de zinco para mediar sua ligação ao DNA (SUNTER e BISARO et al., 1992).

A proteína AC4, codificada pelo gene AC4 localizado no interior do gene AC1 e presente nos *Begomovirus* bissegmentados e monossegmentados e nos *Curtovirus*, é uma proteína de aproximadamente 10 kDa. Um mutante de TGMV, contendo um códon de terminação prematuro em AC4, possui um fenótipo indistinguível do selvagem quanto à sua capacidade de infectar sistemicamente *Nicotiana benthamiana*. Esses resultados indicam que, provavelmente, AC4 não representa um gene funcional (ELMER et al., 1988). Experimentos em plantas transgênicas, contendo fusões de genes repórteres a promotores de AC1, evidenciaram que AC4 fracamente regula o promotor de AC1 (GRONING et al., 1994; EAGLE et al., 1997), mas a significância desses resultados não está clara, uma vez que AC4 parece não exercer nenhuma função biológica durante a infecção (POOMA et al., 1996). Todavia, em *Curtovirus*, a ORF C4, homólogo

de AC4, funciona como determinante de patogenicidade e parece afetar a divisão celular do hospedeiro (STANLEY e LATHAM, 1992).

A proteína do capsídeo (AV1) dos geminivírus é a única proteína estrutural e está envolvida na transmissão do vírus por insetos. Essa função foi demonstrada em experimentos com vírus quiméricos, nos quais o gene da proteína do capsídeo de dois vírus, um transmitido por mosca-branca e outro por cigarrinha, foi trocado (BRIDDON et al., 1990). Essa estratégia resultou em uma mudança de especificidade do vetor. Por meio de análises comparativas de seqüências, destacando-se o genoma de uma estirpe de "abutilion mosaic virus" (AbMV) que não é transmitido por insetos-vetor, tem sido relatado que a região N terminal da capa protéica constitui o determinante de especificidade, particularmente alguns ou todos os cinco aminoácidos finais dessa região (WU et al., 1996). No entanto, nenhuma evidência bioquímica e genética suporta tais observações.

O componente B dos geminivírus bissegmentados codifica duas proteínas BV1 e BC1, que são consideradas duas proteínas de movimento, uma vez que na ausência delas os vírus são incapazes de se movimentarem na planta hospedeira (ELMER et al., 1988; ETESSAMI et al., 1988). Nos *Begomovirus* monossegmentados e nos vírus pertencentes aos *Mastrevirus* e *Curtovirus*, as proteínas de movimento são denominadas V1 e V2 (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999). Essas proteínas dividem as funções no transporte a curta distância de geminivírus. Subdivisão de funções entre as proteínas de movimento de geminivírus tem sido confirmada por meio de ensaios bioquímicos de interação proteína:DNA e da determinação da localização subcelular das proteínas BC1 e BV1 em células infectadas. Esses ensaios demonstraram que BC1 possui baixa afinidade por ácidos nucléicos e se localiza na periferia da célula, enquanto BV1 se liga fortemente ao DNA fita simples e se localiza no núcleo de células infectadas (PASCAL et al., 1994; SANDERFOOT et al., 1996). Mais recentemente, ROJAS et al. (1998) relataram que a atividade de ligação de BC1 e BV1 de BDMV ao DNA é dependente da forma e do tamanho do fragmento de DNA. Baseado nessas informações, estes últimos autores propuseram que o

mecanismo de interação entre proteínas de movimento e o DNA viral constitui fator de restrição evolucionária quanto ao tamanho do genoma de geminivírus.

2.3. Replicação e movimento

Geminivírus replicam seu genoma por meio do mecanismo círculo-rolante no núcleo de células de plantas infectadas (STANLEY et al., 1995). O papel da proteína RAP na replicação é análoga àquele do produto do gene *a* do bacteriófago ϕ X174 (ROGERS et al., 1986), que causa a clivagem da fita de polaridade positiva num sítio específico e então se liga, covalentemente, à extremidade 5' do DNA viral. O sítio de iniciação de replicação dos geminivírus foi precisamente mapeado *in vivo* em uma seqüência conservada de nove nucleotídios (TAATATT↓AC), que se localiza na alça da estrutura em forma de grampo de todos os geminivírus (STANLEY et al., 1995). A síntese da fita positiva de DNA inicia no interior dessa estrutura conservada, por meio da ação endonucleotídica de RAP que fornece 3'OH livre para DNA polimerase (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999).

A replicação de DNA dos geminivírus é dependente da maquinaria de replicação do hospedeiro e pode ser dividida em 2 fases: 1) a conversão da fita simples do vírion em fita dupla, que serve como molde para transcrição dos genes virais; e 2) a produção da fita simples de DNA do vírion a partir da fita dupla intermediária. Pouco se sabe sobre a síntese da fita negativa viral para formar o DNA fita dupla super-helicoidizado (LAUFS et al., 1995a). Um iniciador associado ao vírion foi encontrado encapsidado em geminivírus do gênero dos *Mastrevirus* (HAYES et al., 1988).

A proteína RAP media o reconhecimento da origem de replicação, por meio de interação específica com seu sítio de ligação na fita positiva do DNA viral, que consiste de um elemento de 13 pares de bases com duas seqüências repetidas diretas (FONTES et al., 1994b). O sítio de RAP é requerido não só para o reconhecimento da origem de replicação, como também para a regulação negativa da transcrição do seu gene *ac1/c1* (EAGLE et al., 1997). Ensaios

bioquímicos com a proteína RAP de TGMV demonstraram que ela se liga especificamente a DNA fita dupla e simples (FONTES et al., 1994a), hidrolisa ATP e catalisa a clivagem e ligação seqüência-específica do genoma viral (LAUFS et al., 1995b). As proteínas AC1 e AC3 (RAP e REN) estão envolvidas em várias interações proteína-proteína, sendo a interação AC1-AC1 pré-requisito para a ligação AC1-DNA (SETTLAGE et al., 1996). Coletivamente, essas observações indicaram que a origem de replicação de geminivírus é composta de pelo menos três domínios funcionais: 1) uma estrutura em forma de grampo, que é requerida para replicação, mas não contribui para o reconhecimento vírus específico da origem; 2) um sítio específico de ligação de alta afinidade para a proteína AC1; e 3) pelo menos um elemento adicional que contribui para o reconhecimento específico da origem por transativadores virais (FONTES et al., 1994a, b).

Os efeitos patogênicos dos geminivírus não são resultados da replicação, mas resultam da expansão sistêmica, no qual o vírus move localmente de célula a célula e à longa distância via floema. Os geminivírus *Squash leaf curl virus* (SLCV) e ACMV são limitados ao floema e, por serem bissegmentados, codificam duas proteínas requeridas para o movimento do vírus na planta, BC1 e BV1 (INGHAM et al., 1995). A proteína BV1, designada NSP (“Nuclear Shuttle Protein”), liga a DNA fita simples (ssDNA), localiza-se no núcleo de células de plantas infectadas e funciona como proteína que movimenta o ssDNA viral recentemente replicado do núcleo para o citoplasma (SANDERFOOT et al., 1996; PASCAL et al., 1994). A proteína BC1, denominada MP (“Movement Protein”) é diretamente responsável pelas propriedades de patogenicidade (PASCAL et al., 1993). Ensaio em protoplastos de tabaco evidenciaram que BC1 direciona o movimento viral por meio de uma interação cooperativa proteína-proteína com BV1, que a redireciona do núcleo para a periferia da célula (SANDERFOOT et al., 1995; SANDERFOOT et al., 1996). Estudos de tecidos de folhas de abóbora infectadas com SLCV evidenciaram a presença de túbulos únicos em floemas não-diferenciados, ausentes em plantas não-infectadas, ou em plantas inoculadas com SLCV contendo BC1 mutantes, defectivos em

movimento. Experimentos de marcação indicaram que BC1 está associada especificamente com esses túbulos. Assim também a proteína BiP, uma proteína residente no retículo endoplasmático, co-imunolocaliza com esses túbulos. Essas observações indicam que os túbulos foram derivados do retículo endoplasmático. Baseado nessas observações, foi proposto que BC1 de SLCV interage com RE para formar canais para o movimento intercelular do complexo genoma viral:BV1 (WARD et al., 1997). No entanto, experimentos de microinjeção em células de plantas evidenciaram que BC1 do vírus BDMV aumenta o limite de exclusão dos plasmodesmos como proteína clássica de movimento e medeia o movimento do genoma viral para a célula adjacente (NOUEIRY et al., 1994). Esses resultados indicam que o mecanismo de ação da proteína BC1 é independente de estruturas tubulares e que o movimento intercelular do vírus ocorre via plasmodesma. Embora esses resultados sejam aparentemente contraditórios, eles podem refletir a natureza sistêmica da infecção diferenciada no caso de 2 vírus tomados como modelo, SLCV e BDMV. Enquanto SLCV esteve limitado ao floema, BDMV foi encontrado em células do mesófilo (WANG et al., 1996).

2.4. Pseudo-recombinação entre *Begomovirus*

Um dos primeiros relatos sobre a ocorrência de pseudo-recombinantes entre geminivírus distintos foi feito por GILBERTSON et al. (1993). Esses experimentos de troca de componentes genômicos entre geminivírus bissegmentados fornecem uma ferramenta para estudar funções dos genes de geminivírus (VON ARMIN e STANLEY, 1992) e podem revelar relações filogenéticas. Pseudo-recombinantes infecciosos foram produzidos entre os geminivírus bissegmentados *Tomato mottle virus* (ToMoV) e BDMV, por meio de troca de seus componentes genômicos, via inoculação mecânica em plantas de *Nicotiana benthamiana*. Uma vez que esses pseudo-recombinantes não induziram sintomas tão severos como aqueles induzidos pelas combinações homólogas, acredita-se que as combinações heterólogas não devem interagir tão

eficientemente como as homólogas (GILBERTSON et al., 1993). As seqüências da região comum (RC) de DNA A e B de um geminivírus possuem alta homologia (>95%), e importantes seqüências regulatórias que agem em cis interagem com AC1, que é necessário para replicação do DNA (ELMER et al., 1988; FONTES et al., 1992). Distintos geminivírus bissegmentados com RCs similares podem formar pseudo-recombinantes infecciosos, como mostrado em BDMV e ToMoV (GILBERTSON et al., 1993). Diferentemente dessa situação, geminivírus com diferenças maiores que 25% em suas seqüências de nucleotídios da RC não formam pseudo-recombinantes infecciosos, como mostrado em TGMV e SLCV (LAZAROWITZ, 1991) e, ainda, nos vírus ACMV isolado do Quênia e isolado de Índia (STANLEY, 1995). Essas observações indicam que seqüências na RC correspondem a elementos em cis que são cruciais para que ocorra transreplicação (FONTES et al., 1994a). Outra explicação para a falha de pseudo-recombinação viável estaria relacionada com a incapacidade das proteínas de movimento, codificadas pelo componente B, de interagirem funcionalmente com o DNA A heterogênico de um pseudo-recombinante, bloqueando a infecção sistêmica (SUNG et al., 1995). No entanto, tal hipótese é menos aceitável, uma vez que foi demonstrado que tanto a proteína BV1 quanto a BC1 interagem com DNA dependente do tamanho e da forma específica (ROJAS et al., 1998). A falta de especificidade de seqüências nessas interações DNA: proteína indica que as proteínas de movimento não são vírus-específicas.

Experimentos de pseudo-recombinação realizados entre os vírus AbMV e *Sida golden mosaic virus* isolados da Costa Rica (SiGMV-Co), onde se verificou que o DNA A de AbMV e o DNA B de SiGMV-Co formaram pseudo-recombinantes viáveis numa limitada gama de hospedeiro, em comparação com as combinações homólogas (HOFER et al., 1997). Tais resultados indicaram que fatores codificados pelo hospedeiro são necessários para produção de um pseudo-recombinante viável. STENGER et al. (1994) observaram que recombinantes entre BCTV mostraram diferentes efeitos potogênicos e virulência em *N. benthamiana* e *Beta vulgaris* L., também indicando influências de fatores do hospedeiro. Recentemente, análises de infectividade de pseudo-recombinantes

entre os componentes A e B dos vírus *Cabbage leaf curl virus* (CLCV) e SLCV demonstraram que compatibilidade entre as origens de replicação não é suficiente para causar doença sistêmica entre diferentes geminivírus com distinta gama de hospedeiros. Embora as origens de replicação e as proteínas AC1 desses vírus sejam suficientemente similares (>80%) para permitir pseudo-recombinantes infecciosos, a infecção viável entre esses pseudo-recombinantes depende do hospedeiro. Conseqüentemente, nesse caso a gama de hospedeiros deve ser limitante, em nível de movimento (HILL et al., 1998). Coletivamente, tais observações indicaram que pseudo-recombinação entre geminivírus é um fenômeno complexo que envolve interações entre fatores do vírus e do hospedeiro, como também combinações entre os DNA virais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e obtenção de plantas sintomáticas

Plantas de *Sida rhombifolia* sintomáticas foram identificadas na região do estábulo da Universidade Federal de Viçosa, e suas folhas foram coletadas em N₂ líquido e armazenadas a -80°C até a extração de seu ácido nucléico.

Sementes de *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana xanthi*, *Solanum nigrum*, *Nicandra Physaloides* e *Sida* spp. e os cultivares de tomateiros Santa Clara, East Miller e LA 3474 foram germinados e transplantados para copos plásticos; 5 dias após o transplante, foram bombardeadas com os componentes genômicos virais clonados e o DNA total de plantas infectadas. Um dia posterior à inoculação, as plantas foram transplantadas para vasos maiores para permitir o crescimento das plantas.

3.2. Extração de DNA total de plantas infectadas

Tecidos congelados de plantas de *Sida rhombifolia* foram macerados em tampão de extração para isolamento de DNA total, segundo o método descrito por GILBERTSON et al. (1991a). Aproximadamente, 2 g de tecido foliar infectado foram macerados em nitrogênio líquido e homogeneizados com 10 mL

do tampão (Tris-HCl 10 mmol/L, pH 7,5, EDTA 10 mmol/L, SDS 1% (p/v), β -mercaptoetanol 0,14 mmol/L) até o congelamento da mistura. O material insolúvel foi removido por centrifugação a 15.000 x g por 15 minutos, e ao sobrenadante foi adicionado NaCl na concentração final de 1 mmol/L. Após incubação por 12 horas a 4°C sob leve agitação, a suspensão foi centrifugada a 75.000 x g por 1 hora. As proteínas foram extraídas com fenol:clorofórmio (1:1) e os ácidos nucléicos, precipitados por isopropanol 50% (v/v). Após a centrifugação a 16.000 x g por 15 minutos, os ácidos nucléicos foram lavados com etanol 70% (v/v), secados a vácuo e ressuspendidos em TE (Tris-HCl 10 mmol/L, pH 8,0, EDTA 1 mmol/L), contendo 50 μ g/ml de RNase. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos e estocadas a -20°C (SAMBROOK et al., 1989).

Para extração de DNA total de *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana xanthi*, tomateiros Santa Clara e LA 3474, o tecido infectado foi macerado em N₂ líquido e homogeneizado com 150 μ L de tampão de lise (EDTA 50 mmol/L, SDS 0,5% (p/v), NaCl 100 mmol/L, Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,6, β -mercaptoetanol 10 mmol/L), sob vigoroso vórtex por 2 minutos em temperatura ambiente. Adicionaram-se ao extrato 150 μ L de fenol, seguido de leve agitação e adição de 150 μ L de clorofórmio. O material insolúvel foi removido por centrifugação a 16.000 x g por 2 minutos e o sobrenadante, reextraído com 150 μ L de clorofórmio. Os ácidos nucléicos foram precipitados com 150 μ L de isopropanol por 12 horas à temperatura de -20°C. Após centrifugação por 5 minutos, o precipitado foi lavado com etanol 70% (v/v) e ressuspendido em tampão TNE (Tris-HCl 10 mmol/L, pH 7,6, NaCl 100 mmol/L, EDTA 1 mmol/L) contendo 10 μ g/mL de RNase. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos. Após incubação, a amostra foi extraída com fenol/clorofórmio (1:1) e o ácido nucléico, precipitado com etanol 70% (v/v) por 10 minutos a -20°C. O precipitado foi lavado com etanol 70% (v/v), secado a vácuo e ressuspendido em água.

3.3. Propagação do vírus via biolística

Uma das amostras de DNA total extraída de plantas infectadas foi utilizada para propagação do vírus em *Nicotiana benthamiana* pelo método biolístico. Nesses ensaios, 25 µL da amostra de DNA total extraído de *Sida rhombifolia* foram precipitados em micropartículas de tungstênio na presença de CaCl₂ 1 mol/L, espermidina 13 mmol/L e etanol 70% (v/v), que foram depositadas em seis membranas carreadoras. Em seguida, estas membranas foram colocadas no acelerador de partículas, recobertas com DNA extraído das plantas infectadas e aceleradas a 920 psi contra plantas de *Nicotiana benthamiana*. Um dia após o bombardeamento, as plantas foram transplantadas para vaso para permitir seu crescimento, transferidas para casa de vegetação e observadas quanto ao aparecimento de sintomas.

3.4. Diagnóstico das plantas sintomáticas

3.4.1. Amplificação por PCR

Os oligonucleotídios degenerados PAL1v1978 e PAR1c496, específicos para o componente A e PCRC1 e PBL1v2040, específicos para o componente B, conforme descrito por ROJAS et al. (1993), foram utilizados em PCR (Quadro 1). Esses oligonucleotídios amplificam um fragmento de 1,1 Kb no componente A, que compreende parte de AC1, a região comum, e parte de AV1; e de 0,6 Kb no componente B, que compreende parte da proteína BC1 até o primeiro nucleotídeo da região comum.

As condições de amplificação foram otimizadas para permitir a detecção do vírus, seguindo-se as seguintes condições de reações: incubação inicial de 1 minuto a 94°C, seguido por 30 ciclos consecutivos de 94°C por 45 segundos para desnaturação, 50°C por 1 minuto para anelamento e extensão por 1 minuto e 30 segundos a 72°C.

Quadro 1 – Oligonucleotídios degenerados para o componente A ou B

| Oligonucleotídio | Seqüência | Região amplificada |
|------------------|------------------------------------|---|
| PAL1v1978 | 5'GCATCTGCAGGCCCACTYGTCTTYCCNGT3 | Parte de AR1, a região comum e uma parte de AL1 |
| PAR1c496 | 5'GCATCTGCAGGCCCACTYGTCTTYCCNGT3' | |
| PCRC1 | 5'CTAGCTGCAGCATATTTACRARWATGCCA3' | Parte de BL1 até o primeiro nucleotídio da região comum |
| PBL1v2040 | 5'GCCTCTGCAGCARTGRGRTCKATCTTCATA3' | |

* As regiões sublinhadas correspondem ao sítio da endonuclease de restrição *Pst*I.

* Os oligonucleotídios nas posições degeneradas são representados por uma única letra do código da ambigüidade da IUPAC: R=A, G; W=A, T; K=G, T; Y=C, T; e N=A, C, G, T.

As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador MJ RESEARCH Peltier Thermal Cycler 200. Após os ciclos, as reações foram submetidas a um período adicional de polimerização de 10 minutos a 72°C. Cada reação continha 30-50 ng de DNA extraído de plantas, 1 unidade de Taq DNA polimerase e 20 pmols de cada oligonucleotídio em um volume de final de 25 µL. A estimativa do tamanho dos produtos de amplificação por eletroforese em gel de agarose possibilitou o diagnóstico.

3.4.2. Análise de “Southern blot”

Sondas específicas para o componente A foram preparadas a partir do plasmídeo recombinante pTG1,3A, que contém uma cópia e meia do componente A de TGMV; para o componente B, a partir do plasmídeo recombinante pTG 1,4 Kb, que contém uma cópia e meia do componente B do TGMV (HAMILTON et al., 1984). O plasmídeo pTG 1,3A foi digerido com *Xho*I e *Eco*RI (GIBCO/BRL), liberando um fragmento de 1,1Kb, que corresponde a uma sonda específica para o componente A de geminivírus em reações de hibridização. O plasmídeo

pTG1,4B foi digerido com *Pst*I, liberando um fragmento de 0,6 Kb, que corresponde a uma sonda específica para o componente B de geminivírus bipartidos. Os produtos da digestão foram separados em eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, e os fragmentos específicos foram purificados do gel por meio do “Kit Prep-A-Gene” (BIO RAD), conforme recomendações do fabricante.

Aproximadamente, 50 ng de cada fragmento purificado foram marcados com [³²Pα-] dCTP pela técnica de oligonucleotídios aleatórios, utilizando-se o “Kit Rediprime” (AMERSHAN). Os fragmentos radiomarcados foram utilizados como sonda em reações de hibridização.

Amostras de DNA total, obtido de plantas sintomáticas a assintomáticas, não digerido ou digerido com diversas enzimas de restrição, foram separadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Após depurinação, desnaturação e neutralização, o DNA foi transferido, por capilaridade, para membrana de náilon e imobilizado por luz ultravioleta (SAMBROOK, 1989).

A membrana foi pré-hibridizada por 30 minutos a 60°C em solução de SSC (Solução Saturada de Citrato de Sódio) 6X (SAMBROOK, 1989), Ficoll tipo 400 0,2% (p/v), polivinilpirolidina (PVP) 0,2% (p/v), albumina sérica bovina (BSA) 0,2% (p/v), SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) 1% (p/v), pirofosfato de sódio 1% (p/v) e 1,2 µg de DNA de esperma de salmão por, no mínimo, 2 horas. A reação de hibridização foi conduzida a 60°C por 12 horas no mínimo, em solução de SSC 6X, Ficoll tipo 400 0,06% (p/v), polivinilpirolidina (PVP) 0,06% (p/v), albumina sérica bovina (BSA) 0,06% (p/v), SDS 0,7% (p/v), EDTA 1,3 mmol/L, Tris-HCl 13 mmol/L, pH 7,5, contendo 50 ng de sonda marcada e 800 µg de DNA de esperma de salmão. Após a hibridização, a membrana foi lavada 2 vezes, por 30 minutos, com solução de SSC 1X, SDS 0,1% (p/v) e pirofosfato de sódio 0,02% (p/v) e 1 vez com solução de SSC 0,1X, SDS 0,1% (p/v) e pirofosfato de sódio 0,02% (p/v). Os sinais de hibridização foram revelados por auto-radiografia, conduzida a -80°C, utilizando-se “Lightning-Plus Intensifying Screen” (SIGMA).

3.5. Clonagem do genoma viral diretamente do DNA extraído de *Sida rhombifolia*

3.5.1. Clonagem dos fragmentos parciais do genoma viral

Fragmento do genoma viral foi amplificado a partir de DNA total de *Sida rhombifolia* sintomática com os oligonucleotídios degenerados PAL1v1978 e PAR1c496 (Quadro 1), usando-se a enzima Pfu DNA polimerase.

Em seguida, os produtos de amplificação foram digeridos com *Pst*I e submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0%. A banda com tamanho correspondente a 1,1 Kb foi cortada do gel, e o DNA contido nessa região foi purificado pelo “Kit Prep-A-Gene” (BIO RAD). O fragmento viral purificado e dessalinizado, pelo método de adsorção em sílica, foi clonado no sítio *Pst*I do vetor pUC118, previamente digerido e defosforilado, obtendo-se o clone pUFV 65.

3.5.2. Seqüenciamento e análises comparativas de seqüências

A seqüência de nucleotídios dos fragmentos virais clonados foi determinada pelo método de terminação de cadeia por dideoxynucleotídio (SANGER et al., 1997), com o uso do "AutocycleTM Sequence Kit" (Pharmacia) e o seqüenciador “Automated Laser Fluorescente” (ALF), seguindo-se as recomendações do fabricante.

As análises comparativas de seqüências no banco de dados foram feitas, usando-se o programa BLASTN (ALTSCHUL et al., 1990).

3.5.3. Construção de oligonucleotídios específicos

A seqüência parcial do genoma viral foi utilizada para desenhar oligonucleotídios que possibilitassem a amplificação do componente genômico viral completo. Os oligonucleotídios foram construídos de maneira que o sítio da

enzima de restrição *BamHI*, identificado na seqüência parcial do genoma viral, flanqueasse o fragmento amplificado, contendo extensão de seqüência aleatória de seis nucleotídios. O sítio *BamHI*, conservado no produto de amplificação, foi utilizado como sítio de clonagem. Esses "oligonucleotídios" específicos foram denominados F65RBAMF e R65RBAMR, e as regiões de anelamento estão destacadas na Figura 3 e identificadas no Quadro 2.

3.5.4. Amplificação e clonagem do componente genômico completo

A amplificação do componente genômico viral foi conduzida, utilizando-se DNA total extraído de *Sida rhombifolia* infectada, "oligonucleotídios" desenhados (item 3.5.3) e *Taq* DNA polimerase. O volume final da reação foi de 100 µL, contendo os dNTPs e oligonucleotídios nas concentrações finais de 2,5 µmol/L e 0,4 pmol/µL, respectivamente. O DNA viral foi amplificado por 35 ciclos de PCR nas condições de desnaturação, anelamento e polimerização de 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 55°C e 2 minutos a 72°C, respectivamente. Após os 35 ciclos, 1 µL da enzima Pfu DNA polimerase foi adicionada ao volume de reação para completar o ciclo de polimerização. Após amplificação, o volume total de reação foi separado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. O fragmento amplificado, de aproximadamente 2,6 Kb, foi purificado do gel, utilizando-se o "Kit Prep-A-Gene" (BIO RAD).

Para clonagem do genoma completo, a amostra purificada de DNA viral foi digerida com *BamHI* e dessalinizada através do "Kit Prep-A Gene" (BIO RAD), conforme recomendações do fabricante. O vetor pUC 118 foi submetido à digestão com a enzima de restrição *BamHI* e defosforilado com 1 U de fosfatase alcalina. As reações de defosforilação foram conduzidas com a enzima fosfatase alcalina de intestino de bezerro (PROMEGA), Tris-HCl 0,05 mmol/L, pH 9,0, MgCl₂ 1 mmol/L, por 1 hora a 37°C. Após a defosforilação, o vetor foi separado em gel de agarose 1% e a forma linear, cortada e purificada do gel.

A reação de ligação do fragmento ao vetor foi conduzida de acordo com técnicas-padrão de clonagem molecular em plasmídios (SAMBROOK et al.,

1989). O fragmento de DNA a ser clonado e o vetor foram utilizados na proporção 3:1, em um volume final de 15 µL, em presença de 0,5 U da enzima T4 DNA ligase (GIBCO/BRL), Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,5, MgCl₂ 7 mmol/L DTT (ditiotreitól) e 1 mmol/L. As reações foram incubadas a 14°C por 24 horas. Após o período de incubação, 7,5 µL da reação de ligação foram usados para transformar 200 µL de células competentes *E. coli*, estirpe JM 109, preparadas de acordo com SAMBROOK et al. (1989).

Para transformar as células competentes, a mistura contendo a suspensão de células e a reação de ligação foi mantida a 0°C por 30 minutos. Após um choque térmico de 1 minuto de 42°C, foi adicionado 1 mL de meio LB, seguido por incubação a 37°C por 1 hora. Em seguida, as células foram concentradas por centrifugação, ressuspensas em 100 µL de meio LB e distribuídos em placas contendo meio LB e ampicilina 100 µg/mL, para seleção das colônias transformantes.

3.5.5. Diagnóstico dos clones

O DNA plasmidial, isolado de bactérias recombinantes utilizando o “Kit Flexiprep” (PHARMACIA), foi digerido com a endonuclease de restrição *Bam*HI e separado por eletroforese em gel de agarose 1%, para diagnóstico inicial do clone. A confirmação do clone foi obtida por análise de hibridização utilizando sonda heteróloga específica para o componente A dos geminivírus bipartidos, nas condições descritas no item 3.4.2, exceto o fato de que a hibridização foi conduzida a 55°C por 14 horas. A revelação foi feita por autoradiografia e o clone recombinante positivo, armazenado a -80°C em 40% (v/v) de glicerol. O clone, contendo um inserto de aproximadamente 2,6 Kb amplificado a partir de DNA de planta de *Sida rhombifolia* sintomática, foi denominado pUFV 153.

3.6. Clonagem do vírus transmitido por meio de biolística para *N. benthamiana*

3.6.1. Estratégia de clonagem

DNA total de folhas jovens completamente expandidas de plantas de *N. benthamiana* com sintomas foi, aproximadamente 16 dias após a inoculação, extraído conforme o item 3.2. A integridade do DNA foi verificada em eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. O diagnóstico molecular da infecção viral foi feito por PCR, usando-se o conjunto de "oligonucleotídeos" PAL1v1978/ PAR1c496 e PCRC1/ PBL12040 (Quadro 1). Os produtos amplificados de 1,1 Kb e 0,6 Kb foram clonados em pUC 118, obtendo-se os clones pUFV 97 e pUFV 106, respectivamente. A análise da seqüência parcial do clone pUFV 97 revelou a presença do sítio da enzima de restrição *NcoI*. Esse sítio de restrição foi usado para clonagem do componente A viral, uma vez que se dispunha de um vetor pUC 118 mutado na região 3' do sítio múltiplo de clonagem, gerando um sítio da enzima *NcoI*. DNA total de *N. benthamiana* infectada foi submetida à digestão com 2 U da enzima *NcoI* por µg de DNA durante 12 horas a 37°C. Em seguida, a amostra digerida foi dessalinizada por meio do "Kit Prep-A-Gene" da BIO RAD, conforme especificações do fabricante. O vetor pUC118 mutado com o sítio *NcoI* e denominado pUC 120 foi digerido com enzima de restrição *NcoI* e defosforilado com 1U de fosfatase alcalina. O procedimento de clonagem foi seguido conforme descrito em 3.5.4.

3.6.2. Diagnóstico do clone

O DNA recombinante, selecionado entre as bactérias transformantes, foi liberado do vetor por reação de digestão com a enzima de restrição *NcoI*. Os possíveis clones virais foram inicialmente selecionados pelo tamanho do inserto de aproximadamente 2,6 Kb, e o diagnóstico definitivo foi feito por meio de

“Southern blot”. A membrana contendo o fragmento de DNA recombinante foi hibridizada com sonda específica para o componente A e, posteriormente, reibridizada com sonda específica para o componente B. A revelação foi feita por auto-radiografia, conforme descrito anteriormente. O clone contendo o componente A viral completo foi denominado pUFV 135.

3.7. Caracterização molecular dos genomas virais

3.7.1. Estratégia de seqüenciamento de pUFV 153 e pUFV 135

Para obtenção do mapa de restrição dos clones pUFV 153 e pUFV 135, o DNA recombinante foi submetido à digestão com diversas enzimas de restrição, nas condições recomendadas pelo fabricante. Os mapas de restrição dos clones pUFV 153 e pUFV 135 estão mostrados nas Figuras 1 e 2, respectivamente. Essas informações possibilitaram a clonagem de uma série de subclones sobrepostos, que facilitaram o seqüenciamento das fitas-senso e anti-senso dos geminivírus clonados.

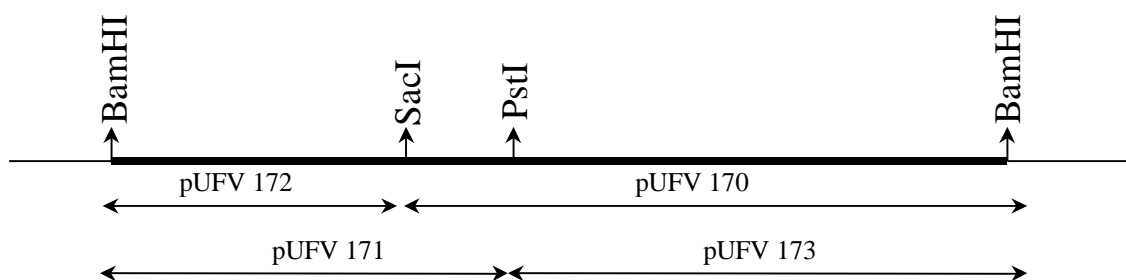


Figura 1 – Mapa de restrição do clone pUFV 153. O inserto viral é delimitado pelo sítio único de clonagem *BamHI*. As posições dos sítios das enzimas de restrição são indicadas. As linhas inferiores representam os fragmentos de DNA que foram subclonados, sendo as denominações dos subclones mostradas acima de cada fragmento.

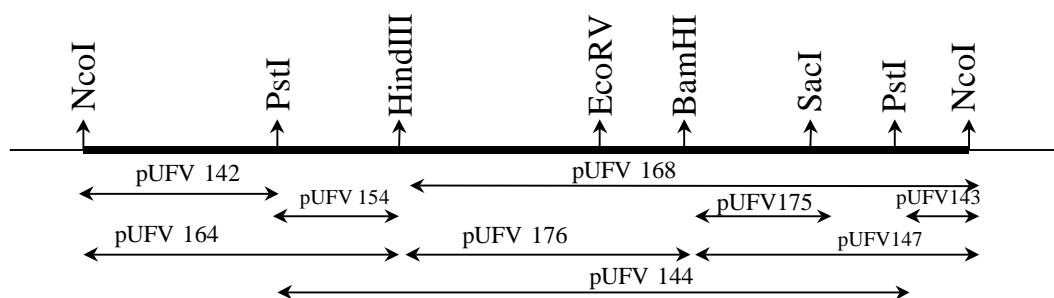


Figura 2 – Mapa de restrição do clone pUFV 135. O inserto viral é delimitado pelo sítio único de clonagem *NcoI*. As posições dos sítios das enzimas de restrição são indicadas. As linhas inferiores representam os fragmentos de DNA que foram subclonados, sendo as denominações dos subclones mostradas acima de cada fragmento.

3.7.1.1. Obtenção e descrição dos subclones de pUFV 153

Os fragmentos de DNA de pUFV 153, subclonados em pUC 118, estão esquematizados na Figura 1. O fragmento *SacI* de aproximadamente 2,0 Kb foi isolado do DNA recombinante pUFV 153 e ligado ao vetor pUC 118, previamente digerido com *SacI* e defosforilado, resultando no subclone pUFV 170. O subclone pUFV 172 foi obtido por meio da liberação do fragmento *SacI* (2,0 Kb) de pUFV 153 e recircularização *in vitro*. O fragmento *PstI* de 1,1 Kb foi liberado de pUFV 153 e clonado em pUC 118, gerando o subclone pUFV 171. O subclone pUFV 173 foi obtido por meio da liberação do fragmento *PstI* de 1,1 Kb e recircularização *in vitro*.

3.7.1.2. Oligonucleotídios específicos para pUFV 153

De posse de seqüências parciais dos subclones do clone pUFV 153 (Figura 1), oligonucleotídios iniciadores foram sintetizados para completar o seqüenciamento do genoma completo do geminivírus clonado, conforme descrito no Quadro 2.

Quadro 2 – Oligonucleotídios específicos para o clone pUFV 153

| Oligonucleotídio | Seqüência | Região de anelamento |
|------------------|---------------------------------|--------------------------|
| 171R 265 | 5' CTTACAATTTGACTGCCAGTC 3' | Posição 265 de pUFV 153 |
| 153F 353 | 5' CACAGAGTTGCCGAGACCCCA 3' | Posição 353 de pUFV 153 |
| 153F 966 | 5'CGTTCCCGACGAGATGCAAGAGTGG 3' | Posição 966 de pUFV 153 |
| 153R 495 | 5' CGTGATCGTTTCCAGGTCATGC 3' | Posição 495 de pUFV 153 |
| 173F 235 | 5' CTCTGACAGCTTCTGGAACGAC 3' | Posição 235 de pUFV 153 |
| R65RBAMR | 5'GCCTAGGATCCCGCCTTAGGATTTTCG3' | Região de 2,6 Kb corres- |
| F65RBAMF | 5'GCCTAGGATCCCTCATGGCGCCAG3' | pondendo ao genoma viral |

3.7.1.3. Obtenção e descrição dos subclones de pUFV 135

O mapa de restrição do clone pUFV 135 é apresentado na Figura 2 e esquematiza os fragmentos de DNA subclonados nos vetores pUC 120 e pUC 118. O DNA recombinante pUFV 135 foi digerido com *Pst*I, liberando três fragmentos. Os fragmentos *Pst*I de tamanho 1,8 Kb e 0,65 Kb foram clonados separadamente em pUC 118, resultando nos subclones pUFV 144 e pUFV 142, respectivamente. O subclone pUFV 143 foi obtido por meio da liberação dos fragmentos *Pst*I de 1,8 Kb (pUFV 144) e 0,65 Kb (pUFV 142) e recircularização *in vitro*. O fragmento *Bam*HI/*Sac*I de 0,4 kb foi clonado em pUC 118 nos sítios *Bam*HI/*Sac*I, gerando pUFV 175, enquanto o fragmento *Bam*HI/*Hind*III de 0,70 Kb foi clonado em pUC 118, produzindo o subclone pUFV 176. Um fragmento de 1,05 Kb, liberado de pUFV 135 através da digestão com *Hind*III, foi clonado em pUC 118 no sítio *Hind*III, criando pUFV 164, enquanto o subclone pUFV 168 foi obtido por meio da liberação do fragmento *Hind*III (1,05 Kb) e recircularização *in vitro*. O subclone pUFV 164 foi digerido com *Pst*I e *Hind*III, liberando um fragmento de aproximadamente 0,4 Kb, que foi clonado nos sítios *Pst*I/*Hind*III de pUC 118 e obtendo pUFV 154. O clone pUFV 147 foi obtido pela liberação do fragmento *Bam*HI (1,8 Kb) de pUFV 135 e recircularização *in vitro*, gerando um inserto *Bam*HI/*Nco*I de 0,9 Kb. O fragmento *Bam*HI/*Sac*I de 0,4 Kb foi clonado nos sítios *Bam*HI/*Sac*I de pUC 118, obtendo-se o clone pUFV 175.

3.7.2. Reações de seqüenciamento

As reações de seqüenciamento foram realizadas em seqüenciador automático Perkin-Elmer, modelo 377, utilizando-se o "Perkin-Elmer ABI-Prism Thermocycle Sequencing Dye Terminator Kit", segundo as instruções do fabricante.

As seqüências obtidas a partir desses subclones foram posicionadas ao longo do genoma viral, por meio de comparação com outros geminivírus já caracterizados, utilizando-se o programa BLASTN (ALTSCHUL et al., 1990). As seqüências que apresentavam sobreposição foram montadas, utilizando-se o programa CAP "Assembly Machine" (HUANG, 1992). As estratégias de seqüenciamento permitiram o seqüenciamento completo de pUFV 153 e pUFV 135.

3.7.3. Similaridades e análises filogenéticas

As seqüências abertas de leitura (ORFs) foram identificadas, utilizando-se o programa "ORF finder"; com o uso do programa "CLUSTAL" (DnaStar), foi possível determinar a massa molecular das proteínas codificadas por estas ORFs.

As seqüências de nucleotídios dos clones e de aminoácidos deduzidas para seus possíveis genes foram comparadas com vários outros geminivírus, cujas seqüências estão disponíveis no GenBank (Quadro 3). Essa análise comparativa de seqüências permitiu a construção de árvores filogenéticas, utilizando-se o programa DnaStar, permitindo também posicionar os clones pUFV 135 e pUFV 153 entre os três gêneros *Curtovirus*, *Mastrevirus* e *Begomovirus*. As seqüências dos DNA A dos *Begomovirus* e componentes únicos do *Curtovirus* e *Mastrevirus* foram alinhadas pelo método "Clustal algorithm" (DNA "Star program"). Utilizando esse mesmo programa, fez-se o alinhamento das seqüências de aminoácidos codificadas pelas potenciais ORFs individuais dos genomas clonados.

Quadro 3 – Sequências de geminivírus comparadas

| Nome geminivírus: abreviações | Referência | Nº de acesso no GenBanK |
|--|------------------------------|-------------------------|
| Mastrevírus | | |
| Transmitido por cigarrinha, infecta monos | | |
| <i>Digitaria streak virus</i> , Vanuatu, DSV | DONSON et al. (1987) | M23022 |
| <i>Maize streak virus</i> , Kenia, MSV | HOWELL (1984) | X01089 |
| <i>Wheat dwarf virus</i> , Tchecoslovaquia, WDV | MACDOWELL et al. (1985) | X02869 |
| Transmitido por cigarrinha, infecta dicots | | |
| <i>Tobacco yellow dwarf virus</i> , Austrália, TYDV | MORRIS et al. (1992) | M81103 |
| <i>Bean yellow dwarf virus</i> , Africa Sul, BeYDV | LIU et al. (1997) | Y11023 |
| Curtovírus | | |
| Transmitido por cigarrinha, infecta dicots | | |
| <i>Beet curly top virus</i> , Califórnia, BCTV | STANLEY et al. (1986) | X04144 |
| <i>Tomato pseudo-curly top virus</i> , TPCTV | BRIDDON et al. (1996) | X84735 |
| <i>Horseradish curly top virus</i> , HrCTV | KLUTE et al. (1996) | U49907 |
| Begomovírus | | |
| Transmitido por mosca-branca, infecta dicots, isolado do Ocidente | | |
| <i>Bean dwarf mosaic virus</i> , Colômbia, BDMV | GILBERTSON et al. (1991a) | M88179 |
| <i>Bean golden mosaic virus</i> , Brazil, BGMV-Br | GILBERTSON et al. (1991a) | M88686 |
| <i>Pepper huasteco virus</i> , México, PHV | TORRES-PACHECO et al. (1993) | X70418 |
| <i>Squash leaf curl virus</i> , Califórnia, SLCV | LAZAROWITZ e LAZDINS (1991) | M38183 |
| <i>Tomato golden mosaic virus</i> , TGMV | HAMILTON et al. (1984) | K02029 |
| <i>Tomato mottle virus</i> , Flórida, ToMoV | ABOUZID et al. (1992) | L14460 |
| <i>Sida golden mosaic virus</i> , Costa Rica, SiGMV | HOFER et al. (1997) | X99550 |
| Transmitido por mosca-branca, infecta dicots, isolado do Oriente | | |
| <i>Tomato yellow leaf curl virus</i> , Sardênia, TYLCV-Sar | KHEYR-POUR et al. (1991) | X61153 |
| <i>Tomato yellow leaf curl virus</i> , Silícia, TYLCV-Si | CRESPI et al. (1995) | Z28390 |
| <i>African cassava mosaic virus</i> , Kenia, ACMV | STANLEY e GAY (1983) | J02057 |

3.8. Análise da infectividade dos genomas clonados

3.8.1. Clonagem dos clones pUFV 135 e pUFV 153 em 1,5 cópia

Para aumentar a eficiência de recombinação do vírus nos ensaios de infectividade do genoma clonado, seus DNA completos foram clonados em repetições parciais entre duas origens de replicação. O clone pUFV 135 foi linearizado com a enzima de restrição *NcoI* a 37°C, por duas horas. O produto da digestão foi separado por eletroforese em gel de agarose e o fragmento em torno de 2,6 Kb, purificado do gel. Simultaneamente, o subclone pUFV 147, com inserto de 0,9 Kb flanqueado pelos sítios *BamHI* e *NcoI*, foi digerido com a enzima de restrição *NcoI* e defosforilado com 1 U de fosfatase alcalina a 37°C, por 2 horas. O fragmento de 2,6 Kb liberado de pUFV 135 foi ligado ao subclone pUFV 147 previamente digerido com *NcoI* e defosforilado, resultando no clone pUFV 213, que contém 1,5 cópia do genoma viral de pUFV 135.

Para obtenção de 1,5 cópia de pUFV 153, foi utilizado o subclone pUFV 172 que contém um inserto do genoma viral de 0,6 Kb, flanqueado pelos sítios *BamHI* e *SacI*. O genoma viral completo foi liberado de pUFV 153 com *BamHI* e clonado no sítio *BamHI* de pUFV 172 previamente digerido com a mesma enzima e defosforilado. O clone resultante contém 1,5 cópia do genoma viral e foi denominado pUFV 214.

3.8.2. Inoculação por biolística

DNA plasmidial dos clones pUFV 213 e pUFV 214 foram isolados, utilizando-se o “Plasmid Midi Kit” (QIAGEN), conforme recomendações do fabricante. A concentração e a pureza do DNA foram avaliadas pela razão de absorvância a 260 e 280 nm. Aproximadamente, 10 µg de DNA dos clones pUFV 213 e pUFV 214 foram inoculados em plantas através do método biolístico, conforme descrito no item 3.3. Após a inoculação, as plantas foram

mantidas em casa de vegetação e observadas quanto ao aparecimento de sintomas. O resultado de infecção foi confirmado por PCR e “Southern-blot”.

3.8.3. Inoculação via extrato vegetal

A inoculação via extrato vegetal foi também utilizada como método de transmissão para a determinação da gama de hospedeiros. Plantas bombardeadas que desenvolveram sintomas virais típicos foram analisadas por PCR e “Southern blot”; uma vez detectada a presença de DNA de geminivírus, suas folhas foram utilizadas como fontes de inóculo do vírus. Folhas jovens infectadas e completamente expandidas foram coletadas de plantas sintomáticas, maceradas em almofariz, na presença de solução-tampão fosfato de potássio 0,1 mol/l, pH 7,2, contendo sulfito de sódio a frio (4°C), numa proporção de 1:5 (folha : tampão). Pulverizou-se o abrasivo carborundum (600 mesh) nas folhas das plantas sadias a serem inoculadas, e o extrato em tampão foi corrido sem pressão sobre essas folhas. As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação e observadas quanto ao aparecimento dos sintomas.

3.8.4. Análise de pseudo-recombinação

Os clones pUFV 213 e 214 foram misturados com um DNA B, denominado pUFV 283, clonado de amostra de DNA total extraído de folhas de plantas de tomate sintomáticas e com DNA B de TGMV e BGMV. Essas combinações foram bombardeadas e inoculadas via extrato vegetal, como descrito em 3.3 e 3.7, respectivamente, em plantas indicadoras (descritas em 3.1), para verificar a ocorrência de replicação cruzada e o movimento sistêmico entre os componentes clonados de diferentes vírus.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O DNA total extraído de plantas infectadas de *Sida rhombifolia* apresentou sintoma de mosaico e foi utilizado como fonte direta de geminivírus para clonagem de componentes virais, conforme descrito a seguir (item 4.1). Alternativamente, DNA de *Sida* foi utilizado como inóculo em ensaios de transmissão para *Nicotiana benthamiana*, por meio de biolística. Em seguida, DNA extraído de plantas infectadas de *Nicotiana benthamiana*, que desenvolveram sintoma de mosqueado, foi usado como fonte do vírus para clonagem de componentes virais, conforme descrito no item 4.2.

4.1. Clonagem molecular do vírus detectado em *Sida rhombifolia*

Uma estratégia para clonagem de componentes genômicos de geminivírus, baseada em amplificação por PCR, foi demonstrada por PATEL et al. (1993). Para amplificação do genoma viral completo foram utilizados oligonucleotídios com seqüências que se sobrepõem em um sítio de uma enzima de restrição do genoma viral. Essa estratégia envolve, inicialmente, a amplificação por PCR de 1 fragmento de 1,1 Kb do DNA A do geminivírus com oligonucleotídios degenerados específicos para o componente A, PAL1v1978 e PAR1c496 (Quadro 1), a partir de DNA total extraído de tecido de planta infectada por

geminivírus. Em seguida, o fragmento de 1,1 Kb foi clonado e sua seqüência de nucleotídios, determinada. A análise da seqüência de nucleotídios permitiu identificar um sítio de uma enzima de restrição no genoma viral, e as seqüências que flanqueavam esse sítio foram usadas para desenhar oligonucleotídios que amplificassem o componente genômico do geminivírus. A estratégia descrita foi utilizada para clonagem do componente genômico do vírus que infecta *Sida rhombifolia*. O sítio GGATCC da enzima *BamHI* foi identificado na seqüência parcial de nucleotídios do clone pUFV 65, que corresponde a um fragmento de 1,1 Kb do genoma viral amplificado pelos oligonucleotídios degenerados para o componente A e clonado em pUC 118, como mostrado na Figura 3.

A estratégia de clonagem descrita está esquematizada na Figura 4. As seqüências que seguem esse sítio foram utilizadas para construção dos oligonucleotídios F65RBAMF e R65RBAMR, empregados em reação de PCR com *Taq* polimerase, a fim de se obter um produto de amplificação com tamanho em torno de 2,6 Kb. O resultado da amplificação do DNA A do vírus a partir do extrato de DNA de uma planta de *Sida rhombifolia* infectada é apresentado na Figura 5. Uma banda de aproximadamente 2,6 Kb (linha 2), correspondendo ao tamanho do genoma completo de geminivírus, foi amplificada nas reações contendo o extrato de DNA, sendo nenhum produto inespecífico produzido na ausência dos oligonucleotídios (linha 1). A região do gel, correspondendo à banda de 2,6 Kb, foi purificada e clonada no vetor pUC 118. As colônias transformantes foram diagnosticadas inicialmente com base no tamanho do fragmento liberado após digestão com *BamHI*, sendo o clone com tamanho em torno de 2,6 Kb selecionado (Figura 6-A). A identidade do referido clone foi confirmada por meio de hibridização, utilizando-se sonda heteróloga específica para o componente A (Figura 6-B). O clone contendo seqüências homólogas ao componente A de TGMV foi denominado pUFV 153.

Testes moleculares, baseados em PCR, utilizando-se oligonucleotídios degenerados para os componentes A e B de *Begomovirus* e diferentes temperaturas de anelamento e hibridizações com sondas heterólogas específicas para os componentes A ou B desses mesmos vírus, não foram suficientes para

```
GAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGGCTTTCTGTACATGGG  
CCTGTAAACCCATTTCAMAGGCCCTAGTNGGTTTTAGGCCTCCACCTCCACGAGGAG  
AGAAATTGGAAGAGCGGCTTACCTTTRARGTTCCCGCCATCTGGCGCCATGAGGGGA  
TCCCGCTTAGGATTTCGAATTAAGACTGACGTCATGCTTGCTTTAGTTTTATAGGG  
GCCATAAACTTAGGGMCCAAGTATTAACACAGTTATCTAAGCTCCTCAGGCGCAC  
TATAATTGGTCAGACAAAAGTTAAABCCTTTAATTTGAATTAMMGGAGAACATCGC  
GCGASCAGGGGGGGCTCCTCGGGAGCSSGGGGAGAGAGAYCCAGCGGSCACCA  
GAGCGCCACGTGDAGGGAKGGGAAAACCTCGCNcRGGCATCCGGTAATATTATVGC  
GATGDGCCGMCACGTGTCCATCAAAAATTATATTGGAGTCTGCWATAA
```

Figura 3 – Seqüência parcial do genoma viral amplificado pelos oligonucleotídios degenerados PAL1v1978 PAR1c 496 e clonados no sítio *Pst*I, mostrado em negrito, de pUC118. Essa seqüência corresponde ao seqüenciamento parcial do clone pUFV 65, utilizando-se o oligonucleotídio M13 reverso. O sítio GGATCC, que corresponde ao sítio da enzima *Bam*HI, está destacado em negrito. As seqüências de anelamento dos oligonucleotídios F65RBAMF e R65BAMR estão sublinhadas.

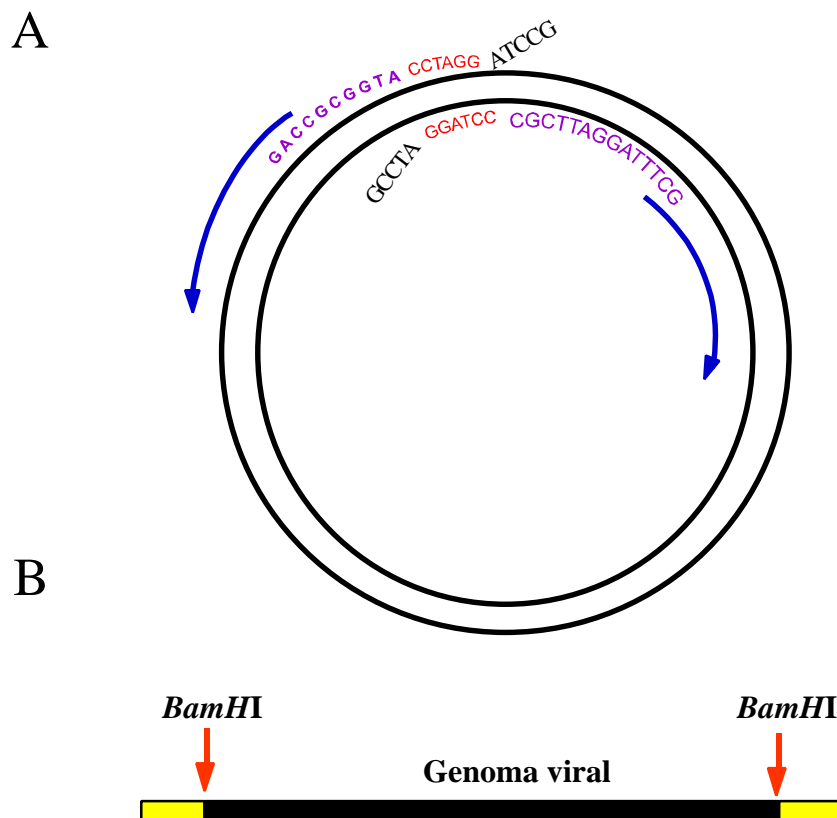


Figura 4 – Estratégia de clonagem do componente genômico viral. Em A, posições de anelamento e sentido de extensão dos oligonucleotídios no genoma do vírus. O sítio da enzima de restrição *Bam*HI (GGATCC) é utilizado para flanquear o produto de amplificação entre os oligonucleotídios, o qual corresponde ao genoma inteiro. Em B, seqüências em preto correspondem ao genoma viral e em amarelo, às seqüências laterais que foram introduzidas no produto de amplificação. Os sítios da enzima *Bam*HI são indicados pelas setas.

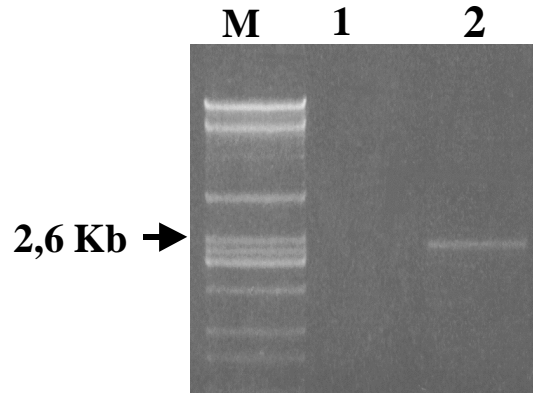


Figura 5 – Amplificação do DNA viral extraído de *Sida rhombifolia*. DNA total extraído de *Sida rhombifolia* foi submetido à reação de PCR, utilizando-se oligonucleotídios específicos (R65RBAMR e F65RBAMF) para amplificação do componente genômico viral. A linha (linha 2) corresponde à banda amplificada pelos oligonucleotídios R65RBAMR e F65RBAMF, com tamanho de aproximadamente 2,6 Kb, como indicado no padrão de peso molecular, M. Nenhum produto específico foi produzido na ausência desses oligonucleotídios (linha 1). As condições de anelamento foram 55°C durante 2 minutos, utilizando-se 40 pmols de oligonucleotídios.

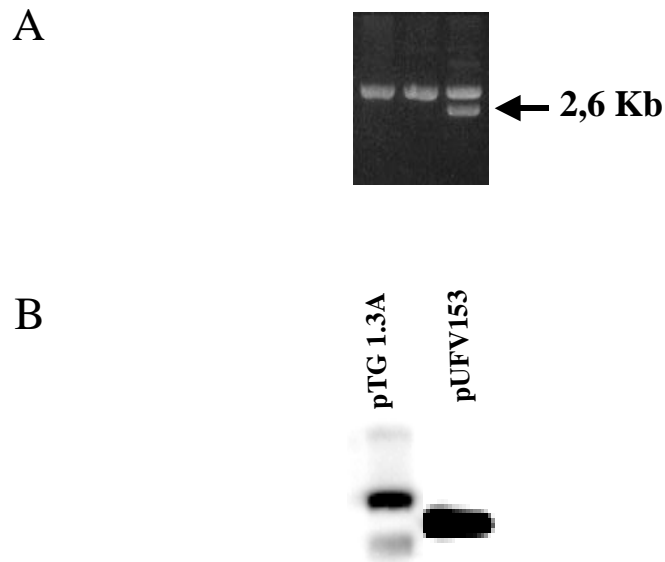


Figura 6 – Diagnóstico do clone pUFV 153. O DNA recombinante foi digerido com a enzima *Bam*HI e o fragmento de 2,6 Kb (A), separado em gel de agarose 0,8%, transferido para membrana de náilon e hibridizado com sonda heteróloga específica para o componente A (pUFV 153). Controle positivo é representado por pTG 1,3 A circular.

detectar molecularmente o componente B nessa amostra de DNA extraído de *Sida sp.* sintomática (dados não mostrados). Assim, não houve qualquer tentativa para clonagem de um componente B desse geminivírus.

4.2. Clonagem molecular do vírus de *Sida* a partir de *Nicotiana benthamiana* infectada por biolística

A fim de determinar um sítio único de enzima de restrição que pudesse ser utilizado para clonagem do genoma completo do geminivírus de *Sida rhombifolia* propagado em *Nicotiana benthamiana*, o DNA total extraído de *Nicotiana benthamiana* infectada foi utilizado como molde para reação em PCR, com o uso de oligonucleotídios degenerados para o componente A e o componente B. O fragmento de 1,1 Kb amplificado do componente A foi clonado no sítio *Pst*I do vetor pUC118 e sua seqüência de nucleotídios, determinada (Figura 7). O sítio CCATGG, que corresponde à enzima de restrição *Nco*I, foi identificado no genoma viral. Assim, para o procedimento de clonagem do componente genômico, foi escolhida a enzima *Nco*I como possível sítio único no componente viral, e o vetor pUC 118 foi mutado na extremidade 3' do sítio múltiplo de clonagem, criando-se um sítio para a enzima *Nco*I. Entre os transformantes, um clone foi selecionado por apresentar tamanho de inserto compatível com o tamanho dos componentes genômicos de geminivírus (Figura 8-A). Diagnóstico por “Southern blot” demonstrou que o clone possuía inserto homólogo ao do componente A de geminivírus (Figura 8-B), denominado pUFV 135.

Nenhum sítio de enzima de restrição de 6 pares de base foi, no entanto, identificado na seqüência de nucleotídios do fragmento de 0,6 Kb desse vírus, que foi amplificado com oligonucleotídios específicos para o componente B (dado não mostrado). Além disso, todas as tentativas de clonagem do componente B, usando-se indiscriminadamente as enzimas do sítio múltiplo de clonagem de pUC, falharam em clonar um fragmento de 2,6 Kb, homólogo ao componente B de geminivírus.

```
GCAGCTCCAGGCGTTAAATGCTCCNNGNATAAACACACGGCTCTCAAATCATT  
GGGAGAAGTTGCCTGAGAAATATCTTTTTTCAGTTTCCAATCTAAATTCTAATTTAG  
ATAGGATTTTCTTAAAGGCTCCGGAGCCATGGACTCCGCCGTTTTCACTTTCCTC  
CTTCACTAACGTTCCCGTCGAGATGCAAGAGTGGGTGGACGATTATTTTGGGAGG  
GGTTCNGCTGCGCGGCCATTGAGACCTATGAGTTTGATAGTCGAAGGTGATTCAA  
GGACTGGGAAGACAATGTGGGCCTGCAGGTCGAC
```

Figura 7 – Sequência parcial do genoma viral amplificado pelos oligonucleotídios degenerados PAL1v1978 e PAR1c496. O sítio CCATGG em negrito corresponde ao sítio da enzima de restrição *NcoI*, que foi utilizado como sítio de clonagem molecular do componente genômico A do vírus que infecta *Sida rhombifolia*, causando sintoma mosqueado.

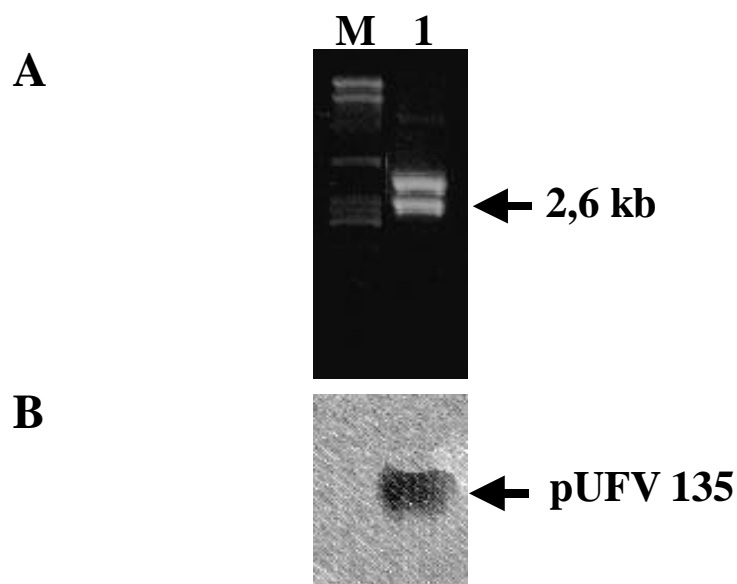


Figura 8 – Diagnóstico do clone pUFV 135. O DNA recombinante foi digerido com a enzima *NcoI* e o fragmento de 2,6 Kb, separado em gel de agarose 0,8% (A) e transferido para a membrana de náilon e hibridizado com sonda heteróloga específica para o componente A (B). A migração eletroforética de padrões de fragmentos de DNA é mostrada em M.

4.3. Seqüenciamento dos componentes genômicos do vírus de *Sida rhombifolia* mosqueado e do vírus de *Sida rhombifolia* do mosaico amarelo

Os dois componentes virais clonados (pUFV 153 e pUFV 135) foram subclonados em fragmentos menores, a fim de facilitar o seqüenciamento do genoma viral. Assim, o clone pUFV 153 foi digerido com as enzimas de restrição *SacI* e *PstI*. Da digestão com *SacI*, pUFV 153 liberou dois fragmentos, um de 0,6 Kb e outro de 2,0 Kb, e a digestão com *PstI* liberou dois fragmentos: um de 1,2 Kb e o outro de 1,3 Kb (Figura 9). Uma vez que as regiões internas dos subclones não foram estendidas pelos oligonucleotídios universais M13F e M13R, o seqüenciamento foi completado, utilizando-se oligonucleotídios sintetizados a partir de seqüências parciais obtidas, conforme demonstrado na Figura 9.

A digestão de pUFV 135 com as enzimas *PstI*, *SacI*, *HindIII*, *EcoRV* e *BamHI* e com as combinações *BamHI/SacI*, *HindIII/BamHI*, *HindIII/PstI* e *PstI/NcoI* forneceu fragmentos de tamanhos variados, que foram subclonados em pUC118 (Figura 10). O seqüenciamento dos subclones com os oligonucleotídios universais permitiu a obtenção da seqüência completa do clone pUFV 135. As seqüências dos componentes virais clonados pUFV 153 e pUFV 135 são apresentadas nas Figuras 11 e 12, respectivamente.

Análise comparativa de seqüências revelou que os geminivírus pUFV 135 e pUFV 153 possuem maior homologia de seqüência com geminivírus do gênero *Begomovirus*, porém não alcançando 90% de identidade de seqüência com nenhum geminivírus já caracterizado (Quadro 4). Entre os membros desse gênero, homologia de seqüência superior a 90% constitui critério de classificação dos vírus como estirpes, enquanto a identidade de seqüência entre componentes virais inferior a 90% é suficiente para classificação em espécies (RYBICKI, 1994). Baseado nesse critério taxonômico, tanto o clone pUFV153 quanto o pUFV 135 podem ser considerados componentes de novos geminivírus ainda não caracterizados. Assim, os novos geminivírus foram denominados de acordo com

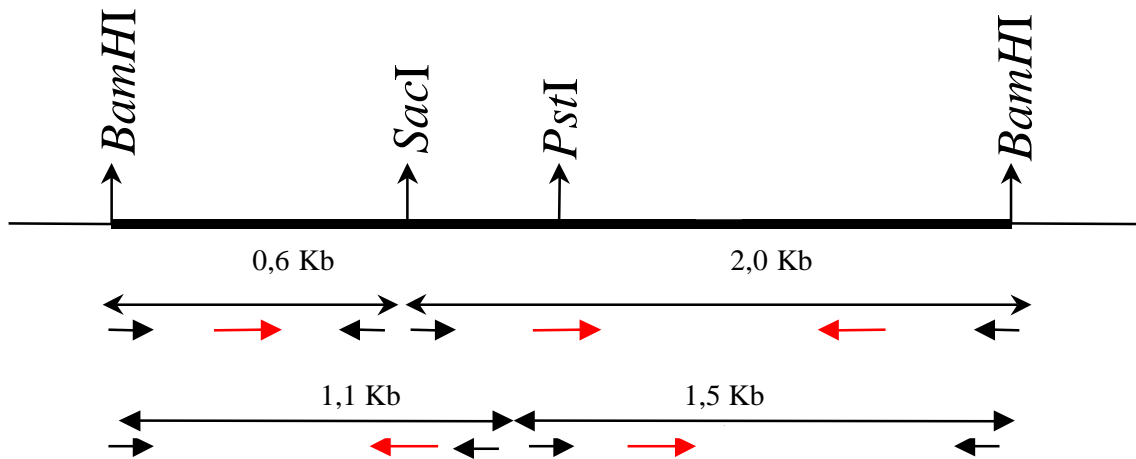


Figura 9 – Estratégia de seqüenciamento do componente A do vírus de *Sida rhombifolia* do mosaico amarelo. As setas bidirecionais indicam os subclones obtidos e os respectivos tamanhos, as setas unidirecionais indicam a direção do seqüenciamento e as setas vermelhas posicionam os oligonucleotídios sintetizados para completar o seqüenciamento.

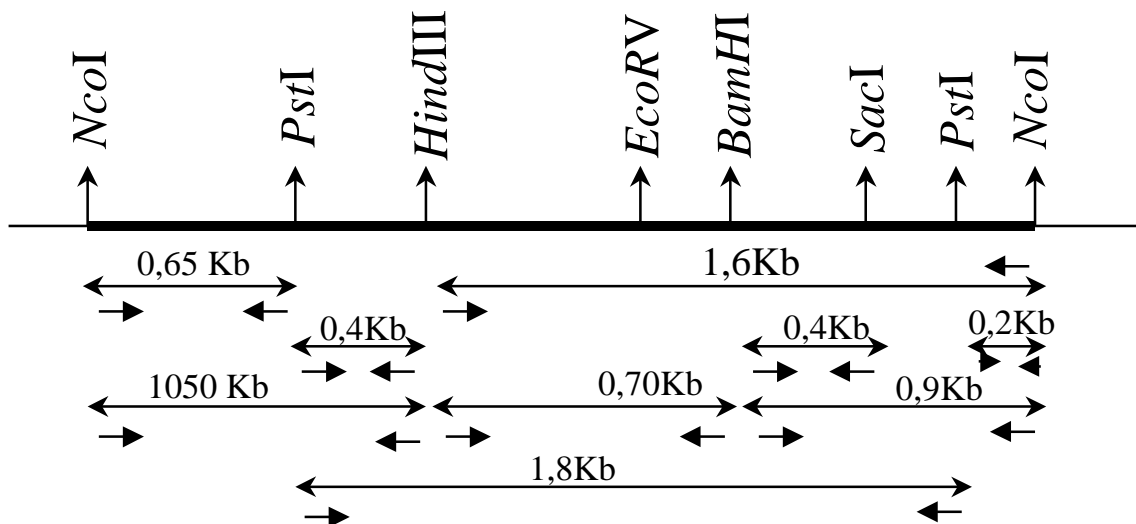


Figura 10 – Estratégia de seqüenciamento do componente A do vírus de *Sida rhombifolia* mosqueado. As setas bidirecionais indicam os subclones obtidos e os respectivos tamanhos; as setas unidirecionais indicam a direção do seqüenciamento.

| | | | | | | |
|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| ACCGGATGGC | <u>CGGCGCGATT</u> | <u>TTCCCCCCCC</u> | <u>TCACGTGGCG</u> | <u>CTCTGGTGGC</u> | <u>CGCTCGATCT</u> | <u>CTCTCTCCCC</u> |
| <u>CGCTCCCGAG</u> | <u>GAGCCCCCCC</u> | <u>TGCTCGCGCG</u> | ATGTTCTCCT | TTAATTCAAA | TTAAAGGATT | TAACTTTTGT |
| CTGACCAATT | ATAGTGCGCC | TGAGGAGCTT | AGATAACTGT | GTTAATACTT | GGTCCCTAAG | TTTTATGGCC |
| CCTATAAAAC | TAAAGCAAGC | ATGACGTCAG | TCTTTAATTC | GAAATCCTAA | GCGGGATCCC | TCATGGCGCC |
| AGATGGCGGG | AACCTCAAAG | GTAAGCCGCT | CTTCCAATTT | CTCTCCTCGT | GGAGGTGGAG | GCCCCAAACC |
| CACTAGGGCC | TTTGAATGGG | TTAACAGGCC | CATGTACAGG | AAGCCCAGGA | TATATCGGAC | GATCAGAACG |
| CCTGATGTTT | CTAGAGGCTG | TGAAGGGCCC | TGTAAGGTCC | AGTCCTACGA | GCAACGTCAC | GATATTTCCC |
| ATGTTGGGAA | GGTGATGTGT | ATATCTGATG | TGACACGCGG | TAACGGTATT | ACTCACCGTG | TCGGTAAGCG |
| TTTCTGTGTT | AAGTCTGTGT | TATATTTTAG | GCAAGATATG | GATGGACGAA | AATATCAAGC | TCAAGAACAC |
| ACGAACAGTT | GCATGTTCTG | GTTGGTCCGG | GACCGTAGAC | CGTATGGCAC | ACCAATGGAT | TTCGGCCAGG |
| TGTTCAACAT | GTTTGACAAC | GAGCCAGTA | CTGCAACCGT | GAAGAACGAT | CTTCGTGATC | GTTTCCAGGT |
| CATGCACAAG | TTCTATGCCA | AGGTCACGGG | TGGACAGTAT | GCCAGCAATG | AGCAGGCGCT | GGTCAAGCGG |
| TTTTGGAAGG | TCAACAATCA | TGTGGTCTAC | AATCACCAGG | AAGCTGGCAA | GTACGAGAAT | CACACGGAGA |
| ACGCATTGCT | ACTTTATATG | GCATGTACCC | ATGCCTCTAA | CCCTGTGTAT | GCAACGCTCA | AGATTCGAAT |
| CTATTTCTAC | GATTTCGATCA | CGAATTAATA | AATTTTGAAT | TTTATTTTCAT | GATTTTCCAG | TACATATCTG |
| ACATATGATC | TGTCAGTTGC | AAAATAAACA | GCTCTAAGTA | CATTATTAAG | CGTAATAACG | CCTAATTGGT |
| CTAAATACAT | CATGACTAAC | TGTCTAAACC | TAATCAAATA | AGTCGTTCCA | GAAGCTGTCA | GAGATGTCTG |
| CCAGACTTGG | AAGTTCAGGA | ATGCCTTGTG | GAGACCCAAT | GCTCTCCTGA | GGTGTGGTGT | GAACCGTATC |
| TGTACGTGGT | ACACTCTGGT | CGTCGTGTAC | AACAGGTCCT | CTACGTGGTA | TATCTTGAAA | TACAGGGGAT |
| TTGTTATCTC | CCCAGATATA | GACGCCATTC | TCTGCTTGAG | GCACAGTGAT | GAGTTCCTC | GGTGCCTGAA |
| TCCCATCGTT | GCTGCAGTTG | ATGTGGACGT | ATATGGAGCA | CCCGCACGCT | AGATCAATCC | TTCTACGGCG |
| AGTTCCTCTC | CTCTTCGCCG | CTCTGTGTCT | TGGTTTGATA | GAGGGGGGAG | TCGAGGAAGA | TGAATTTAGC |
| ATTGTGGAGT | GTCCACGACT | TTAGACCTGC | ATTCTCCTCT | TTGTCGAGGA | ACTCTTTATA | ACTGACTCCC |
| TCCCCAGGAT | TGCAGAGCAC | GATTGATGGG | ATTCCACCTT | TAATTTGAAC | TGGCTTTCCG | TACTTACAAT |
| TTGACTGCCA | GTCTTTTTGA | GCACCAATCA | GCTCCTTCCA | GTGCTTTAAC | TTTAGATATT | GCGGAGTGAC |
| ATCATCAATG | ACGTTATAAT | CCACTTCGTT | TGAGTAAACC | CTATTATTGA | AGTCCAGATG | TCCACTTAAG |
| TAATTATGTG | GGCTAATGCA | CGAGCCACA | TCGTCTTTCC | CTGTCTTGA | ATCACCTTCC | ACTATCAAAC |
| TCATAGGTCT | CAATGGCCGC | GCAGCGGAAC | CCCTCCCAA | ATAATCATCC | GCCCACTCTT | GCATCTCGTC |
| GGGAACGTTA | GTGAAGGAGG | AGAGTGGAAA | CGGAGGAACC | CACGGCTCCG | GAGCCTTTTT | GAATAACTTC |
| TGGACATGCG | TTTGTACTTT | ATCCAGATGT | AAGACGTAAT | CCCTCGGTTG | CTCTTCTTTC | AAAATCTGCA |
| ATGCTTGTTT | CGCAGATTGA | GCATTTAGAA | CTTTCGCATA | CGTATCGTTG | GCAGTTTGGC | AACCTCCTCT |
| AGCTGATCGT | GGATCGATTT | GGAAACTCC | AAAATCAATG | AAGTCTCCGT | CTTCTCCAC | GTATTTTTTA |
| ACGTCTGACG | AGCTCTTAGC | TCCCTGAATG | TTCGGATGGA | AATGTGTTGA | CCTGGAAGGG | GAGACGAGGT |
| CGAAGAACCT | GTTGTTCTTG | CAATTGTAAT | TCCCTTCGAA | CTGGATAAGC | ACGTGGAGGT | GAGGGCTCCC |
| ATCTTCGTGC | AATTCCCTTG | AAACACGGAT | GAATTTCTTA | CTGGTAGGGG | TGTTCAACTC | TTTCAATTGG |
| GAAAGTGCTT | CCTCTTTGGT | CAAGGAGCAC | TTGGGATATG | TAAGAAAATA | GTTTTTGGA | TTTATTCTAA |
| AGGCCCTTGG | AGAAGGCATA | TTTGCAGAAA | TGAAGTGGGG | TCTCGGCAAC | TCTGTGATAT | GAAGTGGGGA |
| CTGGGGTCTT | ATTTATAGCA | GACTCCATAT | AATTTTTGAT | GGACACGTGG | CGGCCATCCG | CTATAATATT |
| Sítio de ligação de AC1 | | TATA box | | G-box | | |

Figura 11 – Sequência completa de nucleotídeos do componente A do vírus do mosaico amarelo de *Sida rhombifolia* (SYMV). Posição +1 é o nonanucleotídeo de início de replicação da fita do vírion, localizada no nonanucleotídeo (em vermelho) conservado em todos os geminivírus e que se encontra na alça da estrutura em “harpin”; sequências inversas de pareamento são sublinhadas. Cis elementos que contribuem para a função da origem de replicação estão sublinhadas com suas denominações especificadas abaixo de cada elemento de sequência. A provável região comum (RC) de SYMV está destacada em itálico e negrito.

ACCGGATGGC **CGCGCGATTT** **TCCCCCCCC** **CTCACGTGGC** **GCTCTGGTGG** **CCGCCCGATC** **CCCTTCTCCC**
CCGCTCCCCG **GGTGGCCCCC** **TTGCTCGCGC** GATGTTCTCC TTTAATTTAA ATTAAGGAT TTAACCTTCCG
TCTGACCAAT TATAGTGC GC CTGAGGAGCT TAGATAACTG TGTTAAGACT TGGTCCCTAA GTTTTATGAC
CCCTATAAAA CTAAAGCAAG CGTGAAGTCA GTCTTTAATT CGAAAGGCCT AAGCGGGATC CCTCATGGCG
CCAGATGGCG GGAACCTCAA AGGTAAGCCG CTCTTCCAAT TTCTCTCCTC GTGGAGGTAT AGGCCCAAAG
TTCAACAAGG CCTCTGAATG GGTAAACAGG CCCATGTATA GGAAGCCCAG GATATATCGG ACGATCAGAA
CGCTGATGT TCCTAGAGGC TGTGAAGGGC CCTGTAAGGT CCAGTCCTAC GAGCAACGTC ACGATATCTC
CCATGTTGGG AAGGTGATGT GTATATCTGA TGTGACACGC GGTAACGGTA TTAATCACC GTCGGTAAG
CGTTTCTGTG TTAAGTCTGT GTATATACTA GGTAAGATAT GGATGGACGA GAATATCAAG CTCAAGAACC
ACACGAACAG TTGCATGTTT TGTTGGTCC GGGACCGTAG ACCGTATGGC ACACCAATGG ATTTCCGGCCA
GGTGTTC AAC ATGTTTGACA ACGAGCCCAG CACTGCAACC GTGAAGAACG ATCTCCGTGA TCGTTTCCAG
GTCATGCACA AGTTCATGC CAAGGTCACG GGTGGACAGT ATGCCAGCAA TGAGCAGGCG CTGGTCAAGC
GGTTTTGGAA GGTCACAAT CATGTGGTCT ACAACCACCA GGAAGCTGGC AAGTACGAGA ATCACACGGA
GAACGCATTA TTATTGTATA TGGCATGTAC CCATGCCTCT AAACCCTGTG TATGCAACGC TGCAGATTCG
AATCTATTTT TACGAGTCGA TCACCAATTA ATAAAGCTTG AATTTTATTT CATGATTTTC CAGTACATGT
CTGACATATG ATCTGTGAGT CGCAAATAA ACAGCCCTAA GTACATTATT AAGCGTGATG ACGCCTAATT
GGTCTAAATA CATCATGACT AAACGTCTAA ACCTAATCAA ATAAGTCGTT CCAGAAGCTG TCAGAGATGT
CGTCCAGACT TGAAGTTCA GGAATGCCTT GTGGAGACCC AATGCTCTCC TGAGGTTGTG GTTGAACCGT
ATCTGTACGT GGTACACTCT GGTGCTGCTG TACAACAGGT CCTCTACGTG GTATATCTTG AAATACAGGG
GATTTGTTAT CTCCAGATA TAGACGCCAT TCTCTGCTTG AGGCACAGTG ATGAGTTCCC CGGTGCCTGA
ATCCATTGTT GCTGCAGCTG ATGTGGACGT ATATGGAGCA CCCGCACTCT AGATCAATCC TTCTACGGCG
AGTTCCTCTC TTCTTCGCCG CCCTGTGCTG TGGTTTGATA GAGGGGGGAG TCGAGGAATA TGAATTTAGC
ATTGTGGAGT GTCCACGACT TTAGACCTGC ATTCTCTTCT TTGTGAGGA ATTCTTTATA ACTGACTCCC
TCCCAGGAT TGCAGAGCAC GATTGATGGT ATTCCACCTT TAATTTGAAC TGGCTTTCCG TAACTTAACA
ATTTGACTGC CAGTCTTTTT GAGCACCAAT CAGCTCCCTT CCAGTGCTTT AACTTTAGAT ATTGGGGTGT
GACATCATCG ATGACGTTGT ATTCCACTTC GTTTGAATAG ACCTTAGAAT TGAAGTCCAG ATGTCCACTC
AAGTAATTAT GTGGGCCTAA CGAACGAGCC CACATTGTCT TCCCTGTCT TGAATCACCT TCGACTATCA
AACTCATAGG TCTCAATGGC CGCGCAGCTG AACCCCTCCC AAAATAATCG TCCGCCACT CTTCATCTC
GACGGGAACG TTAGTGAAGG AGGAAAGTGA AAACGGCGGA GTCCATGGCT CCGGAGCCTT TAAGAAAATC
CTATCTAAAT TAGAATTTAG ATTGTGAAAC TGAAAAAGAT ATTTCTCAGG CAACTTCTCC CTAATGATTT
GGAGAGCCGT GTGTTTATCC GGATCATTAA ACGGCTCAGC TGCAGCGTCA TTAGCTGTCT GTTGTCTCC
CCTTGAACCT CTTCGTCGA CCTGGAACCTG TCCCATTCC CACTGTATCT CCCGTCCTTG TAAATGTATG
ACTTGACGTC GGAGCTCCAT TAGCTCCTGT ATGTTCCGGAT GGAAATGTGC TGACCTAGTT GGGGATACCA
GGTCGAACAG TCGGTTATTT GTGACTTGGG TTTTTCCTTC CAATTGCAAC AAGATGTGGA GGTGAGGTTG
CCCATCTTCA TGAAGCTCTC TGCATATTTT GATGAATTTT TTATTGGAGG GTAATTGAAT AGCTTGCAAT
TGGGAAAGTG CCTCCTCTTT TGTAAGAGGG CACTGTGGAT ATGTAAGGAA AATGTTTTTA GCCTGCACTC
TAAAACGACG TGGTTTGGAT GGCATTTTTG TAAATAAGGC TGGTACTCCG **GTTGAGAGCT** **CGCTCATAAG**
TCTCTATGAA **ATTGGAGTAT** **GGAGTACAAT** **ATATAGTAGG** **AGTTCCTAAG** **GGGCACGTGG** **CGGCCATCCG**
TCTAATATT Sítio de ligação TATA box G-box
de AC1

Figura 12 – Sequência completa de nucleotídeos do componente A do vírus mosqueado de *Sida rhombifolia* (SMoV). Posição +1 é o nucleotídeo de início de replicação da fita do vírion, localizado no nonanucleotídeo (em vermelho) conservado em todos os geminivírus e que se encontra na alça da estrutura em grampo; as sequências inversas de pareamento são sublinhadas. Cis elementos que contribuem para a função da origem de replicação estão sublinhados e suas denominações, especificadas abaixo de cada elemento de sequência. A provável região comum (RC) de SMoV está destacada em itálico e negrito.

Quadro 1 – Identidade de seqüência de nucleotídios entre pUFV 135, pUFV 153 e geminivírus do gênero *Begomovirus*

| | 135 | 153 | PHV | SLCV | TGMV | ToMoV | BDMV | SiGMV-CR | BGMV-Br |
|-----------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-----------------|----------------|
| 135 | * | 86% | 67% | 68% | 75% | 70% | 72% | 72% | 69% |
| 153 | 86% | * | 67% | 69% | 73% | 71% | 73% | 72% | 69% |
| PHV | 67% | 67% | * | 61% | 68% | 64% | 68% | 68% | 65% |
| SLCV | 68% | 69% | 61% | * | 67% | 64% | 65% | 66% | 64% |
| TGMV | 75% | 73% | 68% | 67% | * | 70% | 70% | 70% | 67% |
| ToMoV | 70% | 71% | 64% | 64% | 70% | * | 82% | 81% | 74% |
| BDMV | 72% | 73% | 68% | 65% | 70% | 82% | * | 85% | 75% |
| SiGMV-CR | 72% | 72% | 68% | 66% | 70% | 81% | 85% | * | 74% |
| BGMV-Br | 69% | 69% | 65% | 64% | 67% | 74% | 75% | 74% | * |

o hospedeiro original e o tipo de sintoma causado. O clone pUFV 153 isolado de *Sida rhombifolia* com sintoma de mosaico amarelo foi designado vírus do mosaico amarelo de *sida*, SYMV (*Sida yellow mosaic virus*). Embora não seja conhecido o sintoma induzido pelo vírus clonado pUFV 135, decidiu-se nomeá-lo, provisoriamente, de SMoV (*Sida mottle virus*). A confirmação da denominação depende da inoculação de *Sida* sp. com o vírus e da confirmação do sintoma.

As prováveis RCs do clone pUFV 135 e do clone pUFV 153 foram identificadas por análise comparativa de seqüência com RCs definidas de geminivírus previamente caracterizados (Figura 13). Por meio dessa análise foi possível identificar cis elementos conservados que contribuem para o reconhecimento da origem de replicação de geminivírus. Particularmente relevante é a presença da seqüência conservada TAATATTAC, que corresponde à alça da estrutura em grampo, cujas seqüências inversas de pareamento estão destacadas como “stem” na Figura 13. Essa seqüência conservada corresponde ao sítio de clivagem seqüência-específica da proteína AC1 para início de replicação do vírus e está destacada em vermelho nas Figuras 11 e 12. O nucleotídio 5', resultante da clivagem da cadeia-senso da forma replicativa do vírus por AC1, é apresentado como o nucleotídio +1 na seqüência dos componentes virais (Figuras 11 e 12). Esse esquema de numeração dos nucleotídios dos componentes de geminivírus tem sido utilizado recentemente. Os demais cis elementos em

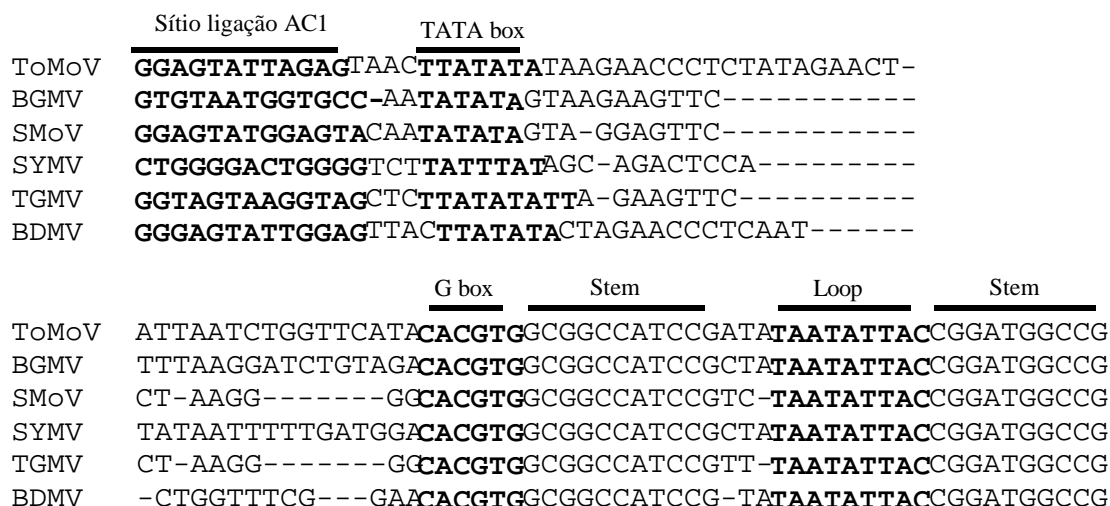


Figura 13 – Análise comparativa de seqüência da região comum de SMoV, SYMV e *Begomovirus* indicados. As seqüências comparadas são delimitadas pelo “stem-loop”, e o sítio de AC1 está presente na região comum. Os cis elementos evolucionariamente conservados são identificados acima das seqüências alinhadas. As seqüências foram alinhadas pelo método Clustal (DnaStar).

potencial, como sítio de ligação da proteína AC1, e a seqüência TATA do promotor do gene de AC1, uma seqüência conservada rica em G e denominada G box, foram identificados na região comum de SMoV e SYMV (Figura 13). Estas seqüências conservadas têm sido caracterizadas como domínios funcionais envolvidos na replicação e, ou, transcrição do promotor de AC1 de TGMV (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999).

4.4. Organização do genoma de SMoV e SYMV

Análises de seqüências dos componentes genômicos clonados de SMoV e SYMV evidenciaram que a organização genética desses componentes são semelhantes à organização dos componentes A de geminivírus bissegmentados caracterizados (Figura 14). As ORFs representadas nos esquemas dos genomas virais são designadas de acordo com a nomenclatura que identifica os genes virais pelas fitas de DNA sentido complementar (C) e sentido do vírion (V). Há 4

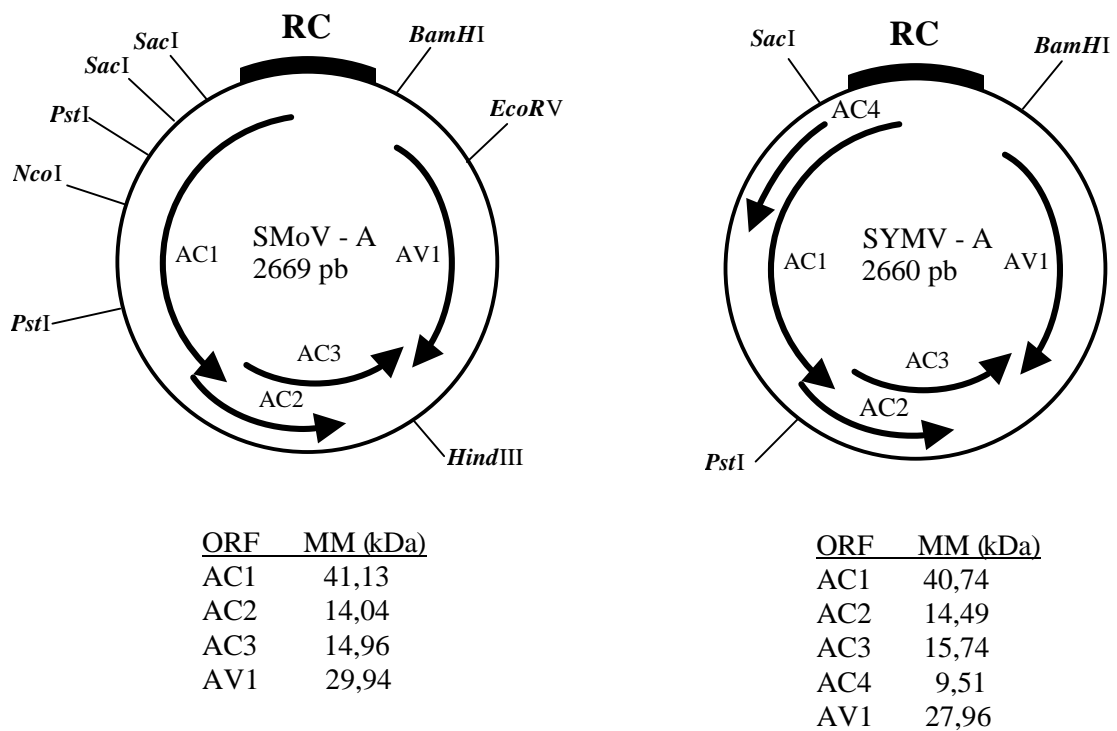


Figura 14 – Mapas dos componentes genômicos A de SMoV e SYMV. As ORFs iniciando com o códon ATG e codificando proteínas maiores que 10 kDa (exceto para AC4 de SYMV) são mostradas. RC representa a região comum para ambos os componentes e contém uma estrutura em forma de grampo conservado em todos os geminivírus. As tabelas mostram a capacidade codificadora de cada ORF. As posições de algumas endonucleases de restrição são indicadas. MM representa a massa molecular de cada proteína.

ORFs no componente A do SMOV e 5 ORFs em SYMV-A que potencialmente codificam polipeptídios com massa molecular superior a 10 KDa. As ORFs AC1, AC2 AC3 e AV1 deduzidas pela seqüência do componente A de SMOV e de SYMV são conservadas nos *Begomovirus* do ocidente. Entretanto, a ORF AC4, ausente em SMOV, não é conservada dentro desse grupo. Por exemplo, o vírus de enrolamento da folha da abóbora (SLCV) não possui em seu genoma uma ORF que codifica uma proteína homóloga a AC4 (HILL et al., 1998). No Quadro 5, é sumarizada a posição das ORFs no genoma dos vírus SMOV e SYMV, sendo a posição inicial de cada ORF correspondente ao primeiro nucleotídio do códon ATG, e a posição final é indicada pelo último nucleotídio de cada códon de terminação. No Quadro 6, mostra-se a homologia em nível de ácido nucléico de cada ORF dos componentes As dos vírus SMOV e SYMV. De acordo com a organização do genoma desses geminivírus, as seqüências de nucleotídios que compõem cada ORF identificada possuem maior porcentagem de homologia com as respectivas ORFs de geminivírus pertencentes ao gênero *Begomovirus* (Quadro 6). Esses resultados indicaram que os componentes virais clonados de SMOV e SYMV são conservados em seqüência e organização com o componente A de *Begomovirus* do Ocidente. Além disso, as seqüências de nucleotídios de SMOV-A e SYMV-A não codificam uma ORF relacionada com V2, típica de *Begomovirus*, as quais possuem componentes únicos.

Quadro 5 – Seqüências abertas de leitura (ORF) capazes de codificar proteínas maiores que 10 kDa e deduzidas da seqüência de nucleotídios de SMOV e SYMV, respectivamente

| ORF | Fase | Início | Códon de terminação | Aminoácidos |
|-----|------|--------|---------------------|-------------|
| AV1 | 3+ | 285 | 1061 | 258 |
| | 1+ | 283 | 1008 | 241 |
| AC1 | 2- | 2587 | 1463 | 374 |
| | 2- | 2539 | 1463 | 358 |
| AC2 | 3- | 1542 | 1153 | 129 |
| | 3- | 1542 | 1150 | 130 |
| AC3 | 1- | 1406 | 1008 | 132 |
| | 1- | 1406 | 1005 | 133 |

Quadro 6 – Identidade de seqüência de nucleotídios entre as potenciais ORFs de SMoV e SYMV, respectivamente, e geminivírus do gênero *Begomovirus*

| | AV1 | AC1 | AC2 | AC3 |
|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | SMoV / SYMV | SMoV / SYMV | SMoV / SYMV | SMoV / SYMV |
| BDMV | 94% / 87% | 68% / 75% | 72% / 62% | 79% / 75% |
| BGMV | 93% / 87% | 68% / 70% | 73% / 62% | 79% / 79% |
| TGMV | 89% / 84% | 72% / 71% | 75% / 62% | 81% / 62% |
| SiGMV | 93% / 86% | 69% / 74% | 68% / 59% | 82% / 80% |

4.5. Classificação dos componentes SMoV-A e SYMV-A, utilizando-se comparações de seqüências

Os genomas e ORFs de alguns geminivírus foram comparados para obtenção de árvores filogenéticas com o objetivo de classificar taxonomicamente os vírus SMoV-A e SYMV-A de *Sida rhombifolia*. As seqüências foram alinhadas, usando-se o método “Clustal” de múltiplo alinhamento de seqüências (MegAlign) disponível no programa DnaStar. Inicialmente, as seqüências completas de nucleotídios de SMoV-A e SYMV-A foram comparadas com 20 geminivírus pertencentes aos gêneros dos *Mastrevirus* e *Curtovirus* e componentes A dos *Begomovirus*. As seqüências dos vírus foram escolhidas aleatoriamente, de modo que um pequeno grupo de vírus fosse representativo de um ramo filogenético. As relações entre os 22 componentes virais são apresentadas como uma árvore filogenética na Figura 15. A árvore tem distintos ramos para os *Mastrevirus* (BeyDV, TYDV, WDV, DSV e MSV) e os *Curtovirus* (BCTV, HrCTV e TPCTV) e uma separação entre os *Begomovirus* dos hemisférios ocidental e oriental. Os componentes SMoV-A e SYMV-A ocupam uma posição entre os *Begomovirus* bissegmentados do hemisfério ocidental, havendo entre eles uma homologia de 86%. A posição filogenética de SMoV-A e SYMV-A indica que esses vírus, provavelmente, necessitam de um componente B para se movimentarem e causarem infecção sistêmica em seus hospedeiros naturais. A distribuição de homologia da seqüência de aminoácidos das proteínas AC1s (Figura 16) foi similar àquela observada na seqüência

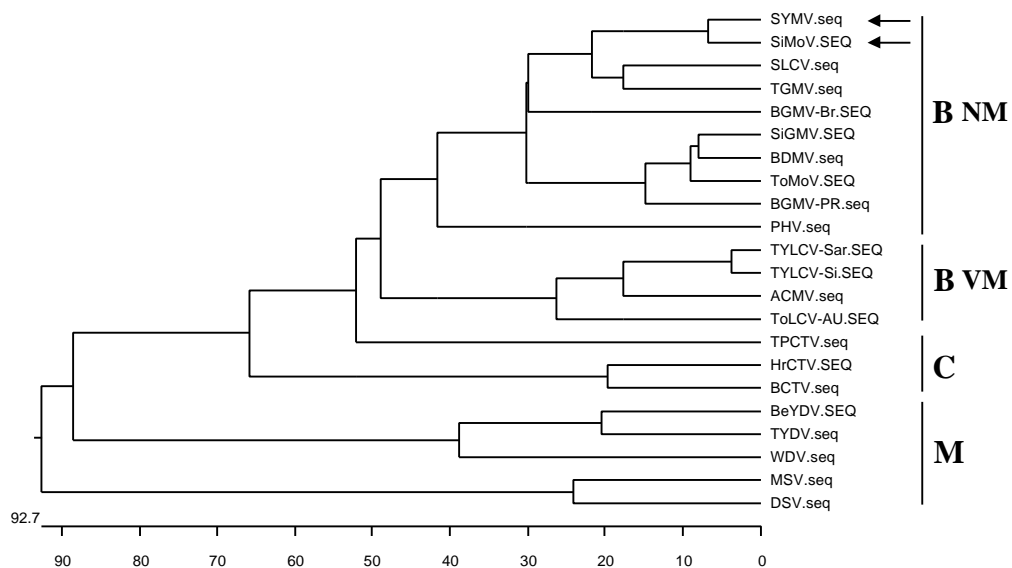


Figura 15 – Árvore filogenética obtida do alinhamento da seqüência de nucleotídios completa de componentes únicos de *Curtovirus* (C), *Mastrevirus* (M) e componentes A de *Begomovirus* (B). Os componentes de SMOV-A e SYMV-A, indicados pelas setas, se agrupam entre os componentes A de *Begomovirus* do hemisfério ocidental, não possuindo similaridade suficiente para se agrupar entre os demais geminivírus.

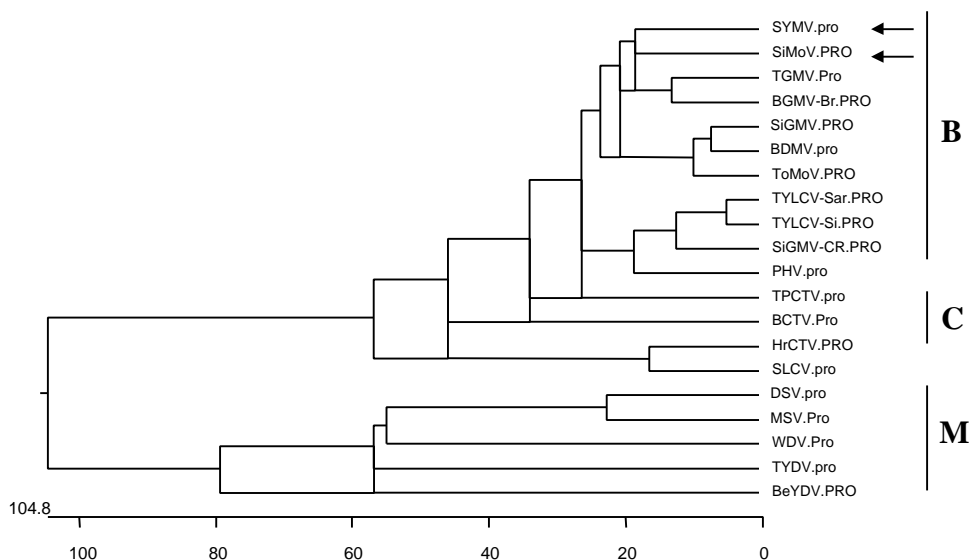


Figura 16 – Árvore filogenética obtida do alinhamento de seqüência de aminoácidos das proteínas AC1/C1 de *Curtovirus* (C), *Mastrevirus* (M) e *Begomovirus* (B). As proteínas AC1 de SMOV e SYMV possuem homologia suficiente para se agruparem entre as Rap dos *Begomovirus* do Ocidente.

completa de nucleotídios dos componentes A (Figura 15). Assim, também, a filogenia da proteína do capsídeo (Figura 17) e das proteínas AC2 e AC3 (Figuras 18 e 19, respectivamente) classificou os novos vírus como espécies distintas do gênero *Begomovirus*, sendo relacionada com *Begomovirus* do hemisfério ocidental.

4.6. Análise de infectividade dos genomas virais clonados

O componente A dos vírus SMoV e SYMV, clonados em 1,5 cópia do genoma viral, foi precipitado sobre partículas de tungstênio para propagação via biolística, com a finalidade de testar a infectividade dos componentes virais clonados. As plantas *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana glutinosa*, tomateiros dos cultivares LA 3474, East Miller e Santa Clara, *Solanum nigrum*, *Nicandra physaloides*, *Datura stramonium* e *Sida sp.* foram inoculadas via biolística. Os clones virais (1,5 de SMoV e SYMV) não foram capazes de produzir infecção sistêmica em nenhum dos hospedeiros testados quando inoculados sozinhos.

Esses resultados são consistentes com a classificação dos novos vírus como *Begomovirus* bissegmentados e indicam que ambos os componentes virais clonados necessitam de um componente B cognato para infecção e desenvolvimento de sintomas. Assim, diversas combinações entre SMoV-A ou SYMV-A e componentes B de outros geminivírus foram avaliadas quanto à capacidade de pseudo-recombinação em ensaios de infectividade. Tanto SMoV-A quanto SYMV-A não foram capazes de formar pseudo-recombinantes com TGMV-B e BGMV-B, conforme julgado pela total ausência de sintomas em *Nicotiana benthamianas* e *Sida sp.* inoculadas. Além disso, diagnóstico baseado em PCR não detectou os componentes virais nessas plantas inoculadas. Assim, também, as plantas indicadoras bombardeadas com a combinação SYMV e pUFV 283, que consiste de um componente B de um novo geminivírus que infecta tomateiro (GALVÃO, R. e FONTES, E.P.B. (comunicação pessoal¹), não desenvolveram sintomas de infecção e não acumularam DNA viral.

¹ Pesquisadores da UFV.

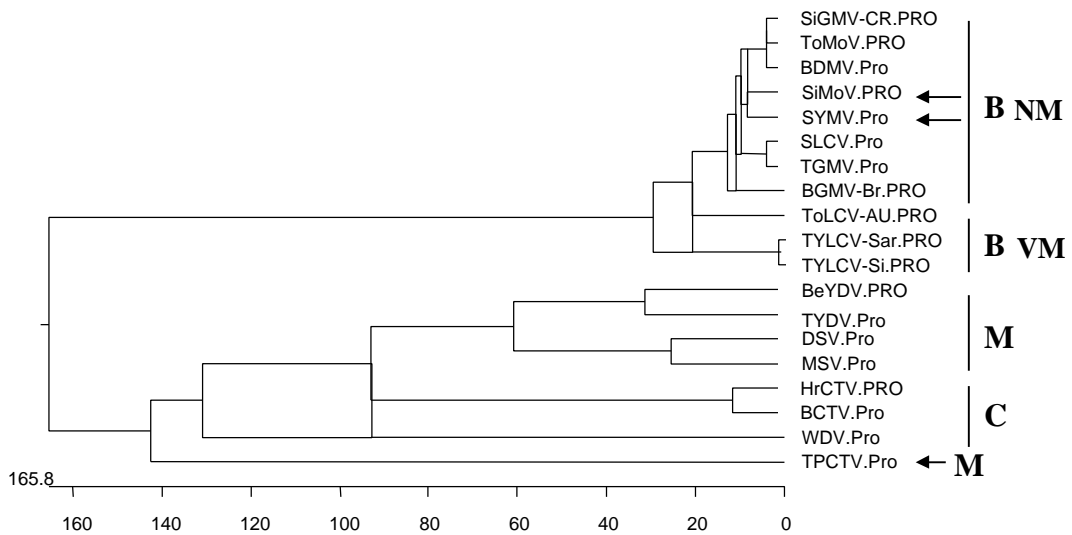


Figura 17 – Árvore filogenética obtida do alinhamento de seqüência de aminoácidos das proteínas AV1/V1 de *Curtovirus* (C), *Mastrevirus* (M) e *Begomovirus* (B). As proteínas AV1 de SMOV e SYMV se agrupam entre as do capsídeo de *Begomovirus* do Oriente.

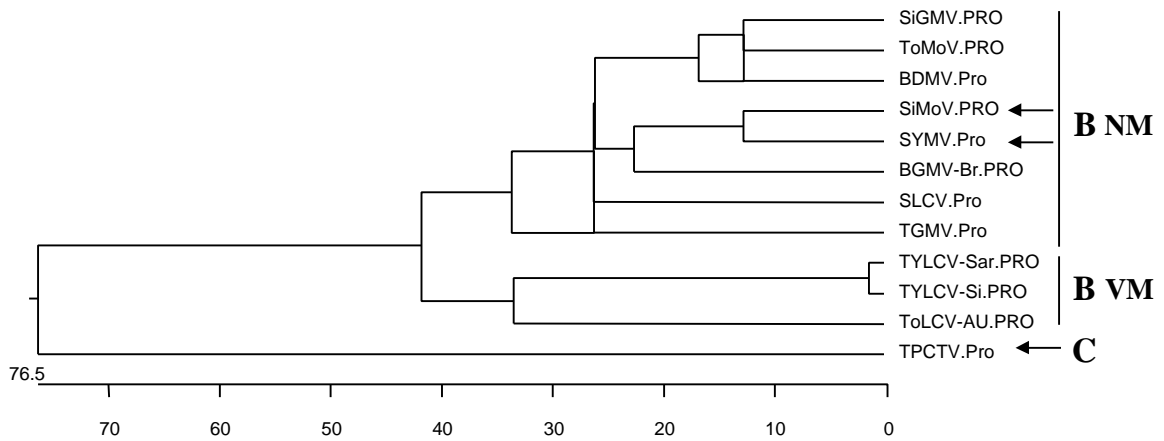


Figura 18 – Árvore filogenética obtida do alinhamento da seqüência de aminoácidos das proteínas AC2 de *Curtovirus* (C) e *Begomovirus* (B). As proteínas AC2 de SMOV e SYMV se agrupam entre as proteínas AC2 de *Begomovirus* do ocidente, coerentemente com o alinhamento obtido da seqüência de nucleotídios completa dos componentes SMOV-A e SYMV-A (Figura 15).

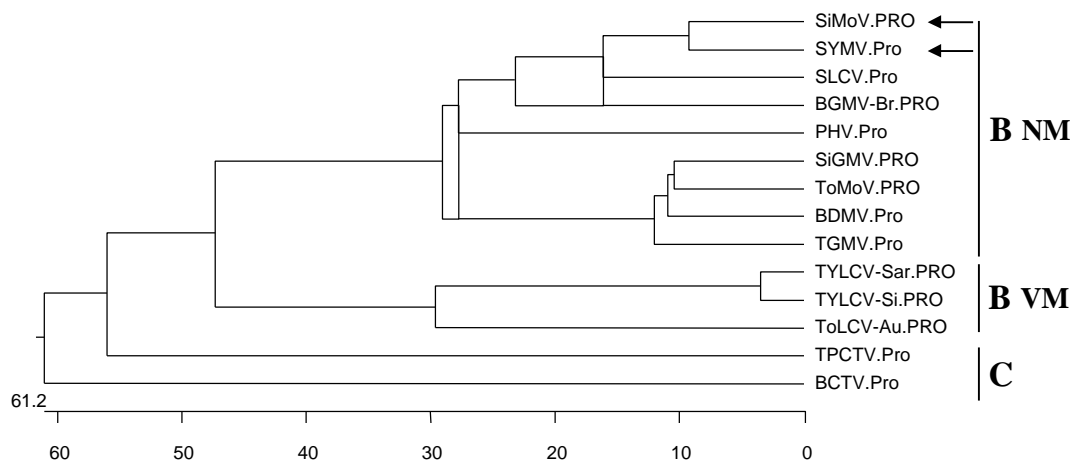


Figura 19 – Árvore filogenética obtida do alinhamento da seqüência de aminoácidos das proteínas AC3 de *Curtovirus* (C) e *Begomovirus* (B). As proteínas AC3 de SMoV e SYMV se agrupam entre as proteínas AC3 de *Begomovirus* do Ocidente, coerentemente com o alinhamento obtido da seqüência de nucleotídios completa dos componentes SMoV-A e SYMV-A (Figura 15).

Provavelmente, as combinações usadas não formaram pseudo-recombinantes, ou as funções de movimento fornecidas à SYMV-A não foram eficientes para promover o deslocamento do vírus na planta, pelo menos naquelas testadas.

Alternativamente, esses resultados indicaram que SYMV-A não é funcional para replicação e transativação. A amplificação por PCR do genoma viral para clonagem pode ter gerado uma mutação que impediu a replicação do SYMV-A. Ensaio em protoplasto possibilitarão determinar a capacidade de replicação do componente A de SYMV clonado. Em contraste, *Nicotiana benthamiana* bombardeada com a combinação SMoV e pUFV283 apresentou sintoma típico de infecção por geminivírus, cujo diagnóstico de infecção foi confirmado por “Southern-blot”, usando-se sondas específicas para SiMo-A e pUFV 283.

O fragmento de *Bam*HI/*Pst*I de SYMV, que se hibridiza com SMoV (Figura 20, linha 6) em médias condições de adstringência (60°C) e não se hibridiza com TGMV (Figura 20, linhas 3 e 4) e com BGMV (Figura 20, linhas 2 e 3), foi utilizado como sonda. O resultado da hibridização indicou a presença da

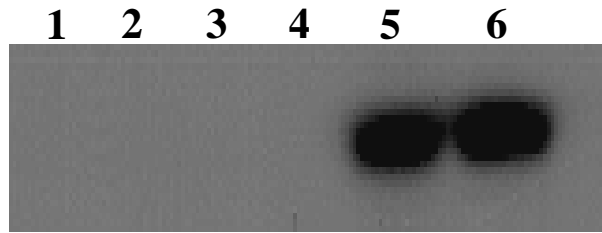


Figura 20 – Identificação de sonda vírus-específica. DNAs plasmidiais de TGMV-A (linha 1), TGMV-B (linha 2), BGMV-A (linha 3), BGMV-B (linha 4), SYMV (linha 5) e SMOV (linha 6) foram separados em gel de agarose, transferidos para membrana de náilon e hibridizados com pUFV 173 em médias condições de adstringência (60°C).

forma replicativa de SMOV no DNA total de *Nicotiana benthamiana* infectada com SMOV e pUFV 283 (Figura 21, linha 3), mas não no DNA total de *Nicotiana benthamiana* sadia (Figura 21, linha 2) e *Nicotiana benthamiana* infectada com TGMV (Figura 21, linha 1). Entretanto, o componente B derivado de pUFV 283 não foi detectado em *Nicotiana benthamiana* infectada com a combinação SMOV e pUFV 283, usando-se sonda específica para esse componente (dado não mostrado). Apesar disso, o acúmulo de um componente B de *Begomovirus* nessas plantas infectadas foi confirmado por PCR (Figura 22, linha 2). A clonagem e o seqüenciamento do fragmento amplificado indicaram a presença de TGMV-B nessas plantas infectadas. Similarmente, TGMV-A foi detectado por PCR (Figura 22, linha 1) e por seqüenciamento do produto amplificado (dado não mostrado). Provavelmente, a contaminação dessas plantas com TGMV foi devida à alta incidência de moscas brancas na casa de vegetação e à presença de plantas infectadas com TGMV, usadas como controle.

Coletivamente, esses resultados indicam que SMOV não é capaz de formar pseudo-recombinante com pUFV 283, mas o componente B de TGMV é capaz de promover o seu movimento sistêmico, desde que TGMV-A seja fornecido em trans para garantir propagação de TGMV-B. Além disso, esses resultados indicaram, biologicamente, que o componente A de SMOV clonado é funcional, com a capacidade de se auto-replicar em *Nicotiana benthamiana*.

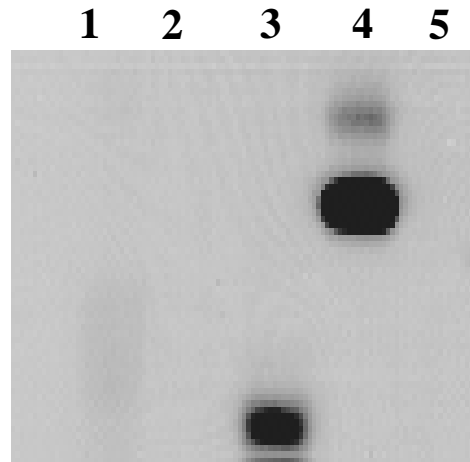


Figura 21 – Detecção molecular de SMOV-A em plantas bombardeadas. DNA total extraído de *Nicotiana benthamiana* bombardeada com TGMV (linha 1), *Nicotiana benthamiana* sadia (linha 2), *Nicotiana benthamiana* bombardeada com SMOV e pUFV 283 (linha 3), DNA plasmidial de SMOV (linha 4) e DNA plasmidial de pUFV283 (linha 5) foram separados por eletroforese, transferidos para membranas de náilon e hibridizados com a sonda específica para SMOV e pUFV 173.

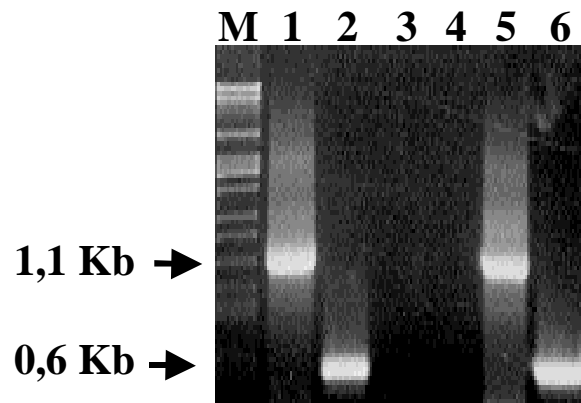


Figura 22 – Amplificação de DNA viral extraído de *Nicotiana benthamiana* infectada via biolística com SMOV e pUFV 283. DNA total de *Nicotiana benthamiana* infectada com SMOV e pUFV 283 (linhas 1 e 2), com TGMV (linhas 5 e 6) e sadias (linhas 3 e 4) foi submetido à reação de PCR, usando-se oligonucleotídios específicos para o componente A (linhas 1, 3 e 5) e componente B (linhas 2, 4 e 6) de *Begomovirus*. O tamanho dos fragmentos amplificados é indicado na esquerda. M corresponde a padrões de DNA.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Duas amostras de *Sida rhombifolia* com sintomas típicos de infecção viral foram analisadas por PCR e “Southern blot”, a fim de identificar o agente causador dos sintomas. Ambas as amostras amplificaram fragmentos de tamanhos específicos na presença de oligonucleotídios degenerados para o componente A de geminivírus do gênero *Begomovirus* e se hibridizaram com o componente A de TGMV. Entretanto, apenas uma das amostras de *Sida* infectada amplificou um fragmento específico na presença de oligonucleotídios degenerados para o componente B de *Begomovirus*. Essa amostra foi utilizada para propagação do vírus em *Nicotiana benthamiana*, resultando no desenvolvimento de um sintoma caracterizado como mosqueado.

Para clonagem dos componentes genômicos virais, duas estratégias foram utilizadas. O componente A do vírus propagado em *N. benthamiana* foi clonado no sítio da enzima de restrição *NcoI* (pUFV 135), identificado no fragmento parcial do genoma viral clonado. Para isso, DNA total de *N. benthamiana* infectada foi digerido com *NcoI* e indiscriminadamente clonado no sítio *NcoI* de pUC 118. O clone pUFV 135 foi isolado por meio de hibridização com a sonda heteróloga, que corresponde ao componente A de TGMV. A outra amostra de *Sida rhombifolia* infectada, apresentando sintoma tipo mosaico, foi utilizada para clonagem direta do componente A identificado, utilizando-se oligonucleotídios

específicos para amplificação do genoma viral completo, flanqueado pelo sítio da enzima *BamHI* e posteriormente utilizado para clonagem.

A identidade dos dois componentes virais clonados foi confirmada por meio de “Southern blot”, usando-se sondas heterólogas específicas para o componente A. Os resultados de análise de seqüências forneceram evidências conclusivas de que os dois genomas virais clonados correspondem a componentes As de dois novos *Begomovirus* bissegmentados. A porcentagem de homologia desses genomas virais clonados com geminivírus já caracterizados foi inferior a 90%, o que permitiu classificá-los como novas espécies. Ambos os vírus clonados possuem organização genômica similar aos componentes As de *Begomovirus* bissegmentados. Além disso, análises filogenéticas, utilizando-se comparação de seqüências, classificaram os dois componentes clonados como *Begomovirus* do hemisfério ocidental. Assim, os novos geminivírus foram denominados vírus do mosaico amarelo de *Sida*, SYMV e vírus mosqueado de *Sida*, SMoV.

Além da análise de seqüência, ensaios biológicos de infectividade comprovaram a natureza bissegmentada dos novos geminivírus identificados. A análise de infectividade dos genomas virais clonados foi feita por biolística, utilizando-se plantas indicadoras. Nenhum dos componentes SYMV-A e SMoV-A foram capazes de infectar *N. benthamiana* e *Sida sp.* sozinhos. No entanto, na presença de TGMV-A e TGMV-B, SMoV-A foi capaz de movimentar sistemicamente em *N. benthamiana*, uma vez que SMoV-A foi detectado por “Southern blot” nas folhas apicais dessas plantas infectadas. No entanto, TGMV, BGMV ou um componente B de um novo geminivírus clonado detectado em tomateiros não foram capazes de complementar as funções de movimento de SYMV-A e promover o deslocamento do vírus na planta. Esses resultados indicam que as funções de movimento de SYMV são vírus-específicas e que os componentes Bs heterólogos usados não exibem os determinantes de especificidades requeridas para complementar a infectividade de SYMV. Alternativamente, os resultados da presente pesquisa evidenciaram que o componente A de SYMV-A clonado não é funcional para replicação ou transativação, pelo menos nas plantas indicadoras testadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUZID, A.M., POLSTON, J.E., HIEBERT, E. The nucleotide sequence of tomato mottle virus, a new geminivirus isolated from tomatoes in Florida. **Journal of General Virology**, v. 73, p. 3225-3229, 1992.
- ACH, R. A., DURFEE, T., MILLER, A. B., TARANTO, P. HALEY-BOWDOIN, L., ZAMBRISKI, P. C. E., GRUISSEM, W. RRBI and RRB2 encode retinoblastoma-related protein that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein. **Molecular and Cellular Biology**, v. 17, p. 5077-5086, 1997.
- ALTSCHUL, S., F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, W. E., LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ANDERSON, P. K., POLSTON, J. E. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. **Plant Disease**, v. 81, p.99, 1997.
- BRIDDON, R.W., BEDFORD, I.D., TSAI, J., 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.
- 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., TSAI, J. H., BEDFORD, I., MARKHAM, P. G.. Analysis of tomato pseudo-curly top geminivirus. **Phytopathology**, v. 84, p. 1156, 1994.
- COLLIN, S., FERNANDÉZ-LOBATO, M., GOODING, P., MULLINEAUX, P. M., FENOLL, C. The two nonstructural proteins from wheat dwarf virus involved in gene expression and replication are retinoblastoma-binding protein. **Virology**, v. 219, p. 324-329, 1996.
- CRESPI, S., NORIS, E., VAIRA, A., ACCOTTO, G. Molecular characterization of cloned DNA from a tomato yellow leaf curl virus isolate from Sicily. **Phytopathology Medit**, v. 34, p. 93-99, 1995.
- DAVIES, J. W., STANLEY, J. Geminivirus genes and vectors. **Trends in Genetics**, v. 5, p. 77-81, 1989.
- DePAMPHILIS, M. L. Transcriptional elements as components of eucaryotic origins of DNA replication. **Cell**, v. 52, p. 635-638, 1988.
- 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 Of The United States Of America**, v. 92, p. 5640-5644, 1995.
- DONSON, J., ACCOTTO, G.P., BOULTON, M.I., MULLINEAUX, P.M., DAVIES, J.W. The nucleotide sequence of a geminivirus from *Digitaria sanguinalis*. **Virology**, v. 160, p. 161-169, 1987.
- EAGLE, P. A., HANLEY-BOWDOIN, L. *cis* Elements that Contribute to Geminiviruses Transcriptional Regulation and the Efficiency of DNA replication. **Journal of general Virology**, v. 71, p. 6947-6955, 1997.
- EAGLE, P. A., OROZCO, B. M., HANLEY-BOWDOIN, L. A DNA sequence required for geminivirus replication also mediates transcriptional regulation. **The Plant Cell**, v. 6, p. 1157-1170, 1994.
- ELMER, J. S., BRAND, L., SUNTER, G., GARDINER, W., BISARO, D. M., ROGERS, S. G. Genetic analysis of the tomato golden mosaic virus. II. The product of the AL1 coding sequence is required for replication. **Nucleic Acids Research**, v.16, p.7043-7060, 1988.
- ETESSAMI, P., CALLIS, R., ELLWOOD, S., STANLEY, J. Delimitation of essential genes of cassava latent virus DNA 2. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 4811-4828, 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.
- 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, 1994b.
- FONTES, E. P. B., GLADFELTER, H. J., SCHAFFER, R. L., PETTY, I. T. D., HANLEY-BOWDOIN, L. Geminivirus replication origins have a modular organization. **The Plant Cell**, v. 6, p. 405-416, 1994a.
- FONTES, E. P. B., LUCKOW, V. A., HANLEY-BOWDOIN, L. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. **The Plant Cell**, v. 4, p. 597-608, 1992.
- FRISCHMUTH, T., ZIMMAT, G., JESKE, H. The nucleotide sequence of abutilon mosaic virus reveals prokaryotic as well as eukaryotic features. **Virology**, v.178, p. 461-467, 1990.
- FULTON, T. M., CHUNWONQSE, Z. E., TANKSLEY, S. D. Microprep protocol for extractions of DNA from tomato and other herbaceous plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 13, p. 207-209, 1995.
- 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 acceleratio. **Phytopathology**, v. 81, p. 980-985, 1991a.
- GILBERTSON, R. L., ROJAS, M. R., RUSSEL, D. E., MAXWELL, D.P. The use of the assymetric polimerase chain reaction and DNA sequencing to determine genetic variability among isolates of bean golden mosaic geminivirus in the Dominic Republic. **Journal of General Virology**, v. 72, p. 2843-2848, 1991b.
- GILBERTSON, R. L., PAPLOMATAS, E. J., GRIECO, P. D., PATEL, V. P., MAXWELL, D. P. Agroinfection of bean, tobacco, and tomato with two bipartite geminiviruses isolated from tomato. **Phytopathology**, v. 83, p.1350, 1993.
- GOODMAN, R. M. Infectious DNA from a whitefly-transmitted virus of *Phaseolus vulgaris*. **Nature**, v.266, p.54, 1977.

- GRONING, B. R., HAYES, R. J., BUCK, K. W. Simultaneous regulation of tomato golden mosaic virus coat protein and all gene expression: expression of the al4 gene may contribute to suppression of the all gene. **Journal of General Virology**, v. 75, p. 721-726, 1994.
- HAMILTON, W. D. O., BISARO, D. M., COUTTS, R. H. A., BUCK, K. W. Demonstration of the bipartited nature of the genome of a single-stranded DNA plant virus by infection with the cloned DNA components. **Nucleic Acids Research**, v. 11, p. 7387-7396, 1983.
- HAMILTON, W. D., STEIN, V. E., COUTTS, R. H. A., BUCK, K. W. Complete nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of tomato golden mosaic virus: potential coding regions and regulatory sequences. **EMBO Journal**, v. 3, p. 2197-2205, 1984.
- HANLEY-BOWDOIN, L., ELMER, J. S., ROGERS, S. G. Functional expression of the leftward open reading frames of the component of tomato golden mosaic virus in transgenic tobacco plants. **The Plant Cell**, v. 1, p. 1057-1067, 1989.
- HANLEY-BOWDOIN, L., SETTLAGA, 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. 1, p. 71-106, 1999.
- HARRISON, B. D., BARKER, H., BOCK, K. R., GUTHRIE, E. J., MEREDITH, G., ATKINSON, M. Plant viruses with circular single-stranded DNA. **Nature**, v. 270, p. 760, 1977.
- HAYES, R. J., BROUGH, C. L., PRINCE, V. E., COUTTS, R. H. A., BUCK, K. W. Infection of *Nicotiana benthamiana* with uncut cloned tandem dimers of tomato golden mosaic virus DNA. **Journal of General Virology**, v. 69, p. 209-218, 1988.
- 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.
- HIDAYAT, H., GILBERTSON, R. L., HANSON, S. F., MORALES, F. J., AHLQUIST, P., RUSSELL, D. R., MAXWELL, D. P. Complete nucleotide sequences of the infectious clones DNAs of bean dwarf mosaic geminivirus. **Phytopathology**, v. 83, p. 181-187, 1993.

- HILL, E. J., STRANDBERG, J. O., HIEBERT, E., LAZAROWITZ, S. G. Asymmetric infectivity of pseudo-recombinants of cabbage leaf curl virus and squash leaf curl virus: implications for bipartite geminiviruses evolution and movement. **Virology**, v. 250, p. 283-292, 1998.
- HOFER, P., ENGEL, M., JESKE, H., FRISCHMUTH, T. Nucleotide sequence of a new bipartite geminivirus isolated from the common weed *Sida rhombifolia* in Costa Rica. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 1785-1790, 1997.
- HONG, Y., SAUNDERS, K., HARTLEY, M. R., STANLEY, J. Resistance to geminivirus infection by virus-induced expression of diathin in transgenic plants. **Virology**, v. 220, p. 119-127, 1996.
- HOWELL, S.H. Physical structure and genetic organisation of the genome of maize streak virus (kenyan isolate). **Nucleic Acids Research**, v.12, p. 7359-7375, 1984.
- HUANG, X. A contig assembly program based on sensitive detection of fragment overlaps. **Genetics**, v. 14, p. 18-25, 1992.
- ILYNA, T. V., KOONIN, E. V. Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes and archaebacteria. **Nucleic Acid Research**, v. 20, p. 3279-3285, 1992.
- INGHAM, D. J., PASCAL, E., LAZAROWITZ, S. G. Both bipartite geminivirus movement proteins define viral host range, but only BL1 determines viral pathogenicity. **Virology**, v. 207, p. 191-204, 1995.
- KHEYR-POUR, A., BENDAHMANE, M., MATZEIT, V., ACCOTTO, G.P., CRESPI, S., GRONENBORN, B. Tomato yellow leaf curl virus from sardinia is a whitefly-transmitted monopartite geminivirus. **Nucleic Acids Research**, v.19, p. 6763-6769, 1991.
- KLINKENBERG, F. A., STANLEY, J. Encapsidation and spread of African cassava mosaic virus DNA A in the absence of DNA B when agroinoculated to *Nicotiana benthamiana*. **Journal of Virology**, v. 71, p. 1409-1412, 1990.
- KLUTE K, A., NADLER, S.A., STENGER, D.C. Horseradish curly top virus is a distinct subgroup II geminivirus species with rep and C4 genes derived from a subgroup III ancestor. **Journal General Virology**, v. 77, p. 1369-1378, 1996.

- KOONIN, E. V., MUSHEGIAN, A. R., RYABOV, E. V., DOLJA, V. V. Diverse groups of plant RNA and DNA viruses share related movement proteins that may possess chaperone-like activity. **Journal of General Virology**, v. 72, p. 2895-2904, 1991.
- LAUFS, J., SCHUMACHER, S., GEISLER, N., JUPIN, I., GRONENBORN, B. Identification of the nicking tyrosine of geminivirus rep protein. **FEBS Lett**, v. 377, p. 258-262, 1995b.
- LAUFS, J., TRAUT, W., HEYRAUD, F., JOUANNEAU, F., GRONENBORN, B., MICHELSON, I., GAFNI, Y., CZOSNEK. Transgenic tomato plants expressing the tomato yellow leaf curl virus capsid protein are resistant to the virus. **BioTechnology**, v. 12, p. 500-504, 1994.
- LAUFS, J., TRAUT, W., HEYRAUD, F., MATZEIT, V., ROGERS, S. G., SCHELL, J., GRONENBORN, B. In vitro cleavage and joining at the viral origin of replication by the replicator initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 92, p. 3879-3883, 1995a.
- LAZAROWITZ, S.G., LAZDINS, I. B. Infectivity and complete nucleotide sequence of the cloned genomic components of a Bipartite squash leaf curl geminivirus with a broad host range phenotype. **Virology**, v. 180, p. 58-69, 1991.
- LAZAROWITZ, S. G., WU, L. C., ROGERS, S. G., ELMER, J. S. Sequence-specific interaction with the viral AL1 protein identifies a geminivirus DNA replication origin. **The Plant Cell**, v. 4, p. 799-809, 1992.
- LAZAROWITZ, S. G. Geminiviruses: genomes structure and gene function. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 11, p. 327-349, 1992.
- LIU, L., VAN TONDER, T., PIETERSEN, G., DAVIES, J.W., STANLEY, J. Molecular characterization of a subgroup I geminivirus from a legume. **Journal General Virology**, v.78, p. 2113-2117, 1997.
- MACDOWELL, S.W., MACDONALD, H., HAMILTON, W.D.O., COUTTS, R.H.A., BUCK, K.W. The nucleotide sequence of cloned wheat dwarf virus DNA. **EMBO Journal**, v. 4, p. 2173-2180, 1985.
- MEDRANO, R. R., GONZÁLEZ-GUEVARA., R. G., ASTORGA-ARGUELLO, G. R., FONNEGRA, M. Z., ESTRELLA-HERRERA, L. R., BUSTAMANTE, R. F. R. Identification of a sequence element involved in AC2-mediated transactivation of the pepper huasteco virus coat protein gene. **Virology**, v. 253, p. 162-169, 1999.

- MORRIS, B. A. M., RICHARDSON, K. A., HALEY, A., ZHAN, W., 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.
- NAGAR, S., PEDERSEN, T. J., CARRICK, K. M., HANLEY-BOWDOIN, L., ROBERTSON, D. A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. **The Plant Cell**, v. 7, p. 705-719. 1995.
- NOUEIRY, A. O, LUCAS, W. J., GILBERTSON, R. L., Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmatal transport. **Cell**, v. 76, p. 965-932, 1994.
- OROZCO, B. M., HANLEY-BOWDOIN, L. A DNA structure is required for geminivirus origin function. **Journal of Virology**, v. 270, p. 148-158, 1996.
- 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., MILLER, A. B., SETTLAGE, S. B., HANLEY-BOWDOIN, L. Functional domains of a geminiviruses replication protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 2448-24456, 1997.
- PADIDAM, M., BEACHY, R. N., FAUQUET, C. M. Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 249-263, 1995a.
- PADIDAM, M., BEACHY, R. N., FAUQUET, C. M. Tomato leaf curl geminivirus from India has a bipartite genome and coat protein is not essential for infectivity. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 25-35, 1995b.
- PALMER, K. E., RYBICK, E. P. The molecular biology of mastrevirus. **Advances. Virus Research**, v. 50, p. 183-234, 1998.
- PASCAL, E., GOODLOVE, P. E., WU, L. C., LAZAROWITZ, S. G. Transgenic tobacco plants expressing the geminivirus BL1 protein exhibit symptoms of viral disease. **The Plant Cell**, v. 5, p. 795-807, 1993.
- PASCAL, E., SANDERFOOT, A. A., WARD, B. M., MEDVILLE, R., TURGEON, R., LAZAROWITZ, S. G. The geminivirus BR1 movement protein binds single-stranded DNA and localizes to the cell nucleus. **The Plant Cell**, v. 6, p. 995-1006, 1994.

- PATEL, V. P., ROJAS, M. R., PAPLOMATAS, E. P., GILBERTSON, R. L. Cloning biologically active geminivirus DNA using PCR and overlapping primers. **Nucleic Acid Research**, v. 21, p. 1325-1326, 1993.
- PEDERSEN, T. J., HANLEY-BOWDOIN, L. Molecular characterization of the AL3 protein encoded by a bipartite geminivirus. **Virology**, v. 202, p. 1070-1075, 1994.
- POOMA, W., GILLETTE, W. K., JEFFREY, J. L., PETTY, I. T. D. Host and viral factors determine the dispensability of coat protein for bipartite geminivirus systemic movement. **Virology**, v. 218, p. 264-268, 1996.
- ROGERS, S. G., BISARO, D. M., FRALEY, R. T., HOFFMANN, N. L., BRAND, L., ELMER, J. S., LLOYD, A. M. Tomato golden mosaic virus A component DNA replicates autonomously in transgenic plants. **Cell**, v. 45, p. 593-600, 1986.
- ROJAS, M. R. **Ms thesis**. Madison: USA, University of Wisconsin, 1992. 123 p.
- ROJAS, M., 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., NOUEIRY, A. O, LUCAS, W. J., GILBERTSON, R. L. Bean Dwarf Mosaic Geminivirus movement proteins recognize in a form- and size-specific manner. **Cell**, v. 95, p. 105-113, 1998.
- RYBICKI, E. P. A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of geminiviridae. **Archives of Virology**, v. 139, p. 49-77, 1994.
- SAMBROOK, J., FRISTSCH, E. F., MANIATIS, T. **Molecular cloning-a laboratory manual**. 2^a ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 202 p.
- SANDERFOOT, A. A., INGHAM, D. J., LAZAROWITZ, S. G. A viral movement protein as a nuclear shuttle: The geminiviruses BR1 movement protein contains domains essential for interaction with BL1 and nuclear localization. **Plant Physiology**, v. 110, p. 23-33, 1996.
- 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. **The Plant Cell**, v. 7, p. 1185-1194, 1995.

- SANGER, F., NICKLEN, S. E., COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-termination inhibitor. **Proceeds Natural Academic Science USA**, v. 74, p. 5463-5467, 1997.
- SAUNDERS, K., LUCY, A., E., STANLEY, J, DNA forms of the geminivirus african cassava mosaic virus consistent with a rolling circle mechanism of replication. **Nucleic Acid Research**, v. 18, p. 2325-2330, 1991.
- SETTLAGE, S. B., MILLER, B. HALEY-BOWDOIN, L. Interactions between geminiviruses replication proteins. **Journal of Virology**, v. 70, p. 6790-6795, 1996.
- SIMONE, G. W., BROWN, J. K., HIEBERT, E., CULLEN, R. E. New geminiviruses epidemic in Florida tomatoes and peppers. **Phitopathology**, v.80, p.1063, 1990.
- STANLEY, J., GAY, M.R. Nucleotide sequence of cassava latent virus DNA. **Nature**, v. 301, p. 260-262, 1983.
- STANLEY, J., MARKHAM, P.G., CALLIS, R. J., PINNER, M. S. The nucleotide sequence of an infectious clone of the geminivirus beet curly top virus. **EMBO Journal**, v 5, p.1761-1767, 1986.
- STANLEY, J. Analysis of african cassava mosaic virus recombinants suggests strand nicking occurs withn the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. **Virology**, v. 206, p. 707-712, 1995.
- STANLEY, J. Infectivity of the cloned geminivirus genome requires sequences from both DNAs. **Nature**, v.305, p.643-645, 1983.
- STANLEY, J. The molecular determinants of geminiviruses pathogenesis. **Seminars Virology**, v. 2, p. 139-149, 1991.
- STANLEY, J., LATHAM, J. R. A symptom variant of beet curly top geminivirus produced by mutation of open reading frame C4. **Virology**, v. 190, p. 506-509, 1992.
- STENGER, D. C. Complete nucleotide sequence of the hypervirulent CFH strain of beet curly top virus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 7, p. 154-157, 1994.
- SUNG, Y. K., COUTTS, R. H. A. Pseudorecombination and complementation between potato yellow mosaic geminiviruses and tomato golden mosaic geminiviruses. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 2809-2815, 1995.

- SUNTER, G., BISARO, D. M. Regulation of a geminiviruses coat protein promotor by AL2 protein (TrAP): evidence for activation and derepression mechanism. **Virology**, v.232, p. 269-280, 1997.
- 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, M. Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. **The 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.
- SUNTER, G., HARTITZ, M. D., HORMUDZI, S. G., BROUGH, C. L., BISARO, D. M. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required for coat protein accumulation while ORF AL3 is necessary for efficient DNA replication. **Virology**, v. 179, p. 69-77, 1990.
- TORRES-PACHECO, I., GARZON-TIZNADO, J.A., JIMENEZ, B., HERRERA-ESTRELLA, L., RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. Complete nucleotide sequence of pepper huasteco virus: analysis and comparison with bipartite geminiviruses. **Journal of General Virology**, v.74, p. 2225-2231, 1993.
- VON ARMIM, A., STANLEY, J. Determinants of tomato golden mosaic virus symptom development located on DNA B. **Virology**, v. 186, p. 286-293, 1992.
- WANG, H. L., GILBERTSON, R. L., LUCAS, W. J. Spatial and temporal distribution of bean dwarf mosaic geminiviruses in *Phaseolus vulgaris* and *Nicotiana benthamiana*. **Phitopathology**, v. 86, p. 1204-1214, 1996.
- WARD, B. M., MEDVILLE, R., LAZAROWITZ, S. G. The geminiviruses BL1 movement protein is associated with endoplasmatic reticulum-derived tubules in developing phoem cells. **Journal of Virology**, v. 71, p. 3726-3733, 1997.
- WU, Z. C., HU, J. E., ULLMAN, D. E., HIEBERT, E. Complete nucleotide sequence of a non vector-transmitted strain of abutilion mosaic geminiviruses in Hawaii. **Molecular plant pathology**, v. 86, p. 608-613, 1996.
- XIE, Q., SUAREZ-LOPEZ, P.E., GUTIEREZ, C. Identification and analysis of retinoblastoma binding motif in the replication of a plant DNA virus; requeriment for efficient viral DNA replication. **EMBO Journal**, v. 14, p. 4073-4082, 1995.