

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR PARCIAL DE
DOIS NOVOS ISOLADOS DE GEMINIVIRUS
BIPARTIDOS NA REGIÃO DE UBERLÂNDIA

Wânia Rezende Lima

Monografia apresentada à
Coordenação do Curso de
Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de
Uberlândia, para a
obtenção do grau de
Bacharel em Ciências
Biológicas.

Uberlândia / MG.
Dezembro - 1997

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR PARCIAL DE
DOIS NOVOS ISOLADOS DE GEMINIVIRUS
BIPARTIDOS NA REGIÃO DE UBERLÂNDIA

Wânia Rezende Lima

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Monografia apresentada à
Coordenação do Curso de
Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de
Uberlândia, para a
obtenção do grau de
Bacharel em Ciências
Biológicas.

Uberlândia / MG.

Dezembro - 1997

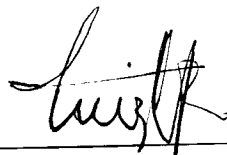
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR PARCIAL DE DOIS
NOVOS ISOLADOS DE GEMINIVIRUS BIPARTIDOS NA
REGIÃO DE UBERLÂNDIA-MG**

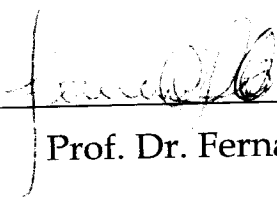
Wânia Rezende Lima

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA EM 11 / 12 / 97

Nota 100,0



Prof. Dr. Liuz Ricardo Goulart Filho



Prof. Dr. Fernando Cesar Juliatti



Prof. Dr. Vicente Militão Neto

Handwritten notes:
Análise de
sequência de
genoma de
geminivírus
bipartidos
isolados na
região de
Uberlândia-MG

Uberlândia, 17 de dezembro de 1997.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus pelo milagre de Ter me Concedido a vida.

Agradeço a você Prof. Luiz Ricardo, pela oportunidade de poder desenvolver esse trabalho sob sua orientação, e permissão para utilização do laboratório.

Agradeço aos Professores Juliatti e Vicente pela co-orientação e fornecimento das amostras de plantas.

Um enorme beijo a você Juliana, pelas jornadas que juntas passamos em casa e na escola, durante o tempo em que cursamos nossas disciplinas.

Um abraço forte a todos os meus amigos do laboratório, pois com vocês pude aprender muito do que eu não sabia; Juarez, Marta, Gismar, Warlei, Christiane, Cristina, Terezinha, Maurício Machain, Viviam, Maurício Borges, Miriam, Marcelo, Graciele, Bárbara, Soraia, Rosana, Ana Paula, Vicente, Leonardo, Waldesse, Alessandra, Adelmo, Eduardo, Gisele, Keilah, Alba, Sônia.

Um beijão com carinho a você meu amigo e companheiro, que esteve sempre a meu lado, mesmo nas situações mais difíceis, mostrando otimismo e perseverança. Obrigado a você pelos ensinamentos que contribuíram para a realização desse estudo. Kleber, lhe agradeço de todo o coração por tudo.

DEDICATÓRIA

*Dedico a meus pais Guilherma e
Alonso, que um dia se uniram pelo
amor para que eu pudesse nascer, e
gozar do prazer de viver.*

ÍNDICE

	Página
INTRODUÇÃO	2
MATERIAL E MÉTODOS	10
Material Biológico	10
Isolamento do DNA	10
PCR	11
LIS-SSCP-PCR	12
RFLP	13
RESULTADOS	14
PCR	14
LIS-SSCP-PCR	15
RFLP	15
DISCUSSÃO	16
LITERATURA CITADA	24

INTRODUÇÃO

No Brasil o tomate foi introduzido no final do século passado e hoje é uma atividade econômica importante em todo país, sendo uma hortaliça bastante consumida mundialmente. O *Lycopersicon esculentum* Mill originou-se no Equador e Norte do Chile, e se distribuiu ao longo da América do Sul e América Central (Filgueira, 1982). Com uma produção anual de cerca de 2,3 milhões de toneladas numa área de aproximadamente 65 mil hectares, o Brasil é considerado o oitavo maior produtor mundial e décimo primeiro em áreas plantadas e produtividade ($\cong 36,9$ t/h) (Makishima, 1991).

O Estado de Minas Gerais é o segundo maior produtor de tomate do país, com uma produção de 297.586 t. em 6.274 ha, antecedido do Estado de São Paulo, que contribui com cerca de 30% do tomate de mesa consumido no país com 883.480 t. e uma área plantada de 18.080 ha, (Agrianual, 1996). Outros Estados como Pernambuco, Goiás e Bahia também se destacam.

Várias viroses e outras doenças ameaçam diversas culturas no país de importância econômica, e com produtividade voltada para o consumo interno e externo. Com o objetivo de tentar solucionar esses problemas, estudos fitopatológicos e genéticos são realizados. No Brasil, a primeira virose a ser relatada foi em 1975 estando associada com a mosca-branca (*Bemisia* spp). No mesmo ano este vírus foi identificado e classificado como Tomato Golden Mosaic Vírus (TGMV). Contudo, em 1995 no município de Uberlândia, região do Triângulo Mineiro, foi observado a ocorrência de sintomas característicos semelhantes ao TGMV, causando mosaico amarelo, enrugamento e redução do tamanho das folhas jovens, e cloroses nas nervuras (Filgueira *et al.*, 1996), com sintomatologia severa podendo ocasionar a perda total dos frutos. Este novo grupo de geminivírus presente em tomateiro foi denominado inicialmente como TGV-Ud. Desde o seu aparecimento a sua incidência só tem aumentado na região. Já no segundo semestre de 1997, houve indícios de que esse novo isolado se encontrava por todas as regiões do Brasil, principalmente nas regiões de São Paulo, Distrito Federal, Ceará e Fortaleza.

Em 1993, o Centro Nacional de Pesquisas de Hortaliças (CNPQ)-EMBRAPA detectou plantas de tomates com sintomas de geminivirose. Amostras de mosca-branca encontradas em repolho e tomate, foram identificadas como sendo do "biótipo B" de *Bemisia tabaci* (Figura 1). Posteriormente esse suposto biótipo foi definido como uma nova espécie, *Bemisia argentifolii*. Essas duas espécies são morfologicamente semelhantes, sendo que *B. argentifolii* adaptou-se a um grande número de espécies de

plantas hospedeiras, além de se mostrar resistente aos inseticidas tradicionais.



Figura 1. a) Indivíduo adulto de mosca-branca (*Bemisia tabaci*) sugando a seiva; b) ninfas de *B. tabaci*.

O vírus não é capaz de se replicar no inseto vetor, assim o período de incubação e a quantidade de partículas no hospedeiro, dependem da permanência do inseto na cultura e do tempo de inoculação. O período latente na maioria desses vírus é superior a quatro horas, mas persistem até o fim do ciclo do inseto vetor. A transmissão da virose se dá pela passagem das partículas virais do intestino para a hemolinfa, em seguida para as glândulas salivares, e da saliva para a planta. Tanto o adulto quanto as ninfas possuem aparelho bucal do tipo picador-sugador.

A especificidade vírus-vetor parece ser dependente do gene da capa protéica, a única proteína estrutural em geminivírus. Os geminivírus que são transmitidos por cigarrinhas, possuem a sequência desse gene

diferente da sequência do mesmo gene em geminivírus transmitidos por mosca-branca (Brown e Birds, 1992).

Os primeiros vírus de fita simples a serem detectados foram os geminivírus (Goodman, 1977). Os geminivírus são agentes infecciosos, e são caracterizados pela morfologia da partícula germinativa consistindo de dois icosaédros incompletos (T=1) com um total de 22 capsômeros (Murphy *et al.*, 1995) e genoma circular de fita simples de DNA (Harrison, 1985; Lazarowitz, 1987; Davies e Stanley, 1989). Os membros do grupo dos geminivírus podem ser dividido em três distintos grupos, baseados na organização do genoma, no tipo de inseto-vetor, e no tipo de hospedeiro.

O vírus utiliza toda maquinaria celular da planta para replicar e transcrever proteínas de movimento, que são as mais importantes funções para estabelecimento no hospedeiro. O material genético do vírus é empacotado na forma de DNA circular de fita simples, com ocorrência de sobreposição de sequências codificadoras. As partículas virais e o DNA viral, estão localizados no núcleo das células infectadas (Rushing, *et. al.*, 1987). O subgrupo I possui o genoma formado apenas por um único componente, sendo transmitido obrigatoriamente por cigarrinhas. Os geminivírus deste subgrupo infectam monocotiledôneas em um espectro de hospedeiro bastante limitado. Os geminivírus do subgrupo II são constituídos de um único componente, e infectam dicotiledôneas com uma ampla variedade de hospedeiros. São transmitidos também por cigarrinhas. O subgrupo III é constituído basicamente por geminivírus de genoma composto por dois componentes, que hospedam dicotiledôneas com baixo

espectro. Estes vírus são transmitidos por mosca branca, embora também possa ser transmitido mecanicamente. A transmissão mecânica geralmente ocorre apenas em *Nicotiana benthiana*, sendo de difícil inoculação em *Lycopersicon esculentum*. Esta dificuldade se dá pelo fato do vírus possuir uma infecção sistêmica.

Os três grupos da família *Geminiviridae*, possuem uma conservação no que se refere a organização e função do genoma (Lazarowitz, 1992). O genoma dos geminivírus, codifica uma única proteína essencial para replicação, um único polipeptídeo que compõe a capa protéica, e proteínas envolvidas no movimento célula-a-célula do vírus no hospedeiro, além de proteínas reguladoras. A maioria dos geminivírus possuem uma região altamente conservada, que forma um grampo, cuja alça possui sequências TAATATTAC que é evolutivamente conservada.

O membro ao qual demos importância, devido ao fato do isolado TGV-Ud ainda não ter sido caracterizado molecularmente, pertence ao subgrupo III dos geminivírus, e foi denominado de vírus do mosaico dourado do tomate (TGMV). Ele pode ser transmitido naturalmente pela mosca branca, *Bemisia tabaci* (Homoptera: *Aleyrodidae*), sendo restritos a hospedeiros de dicotiledônea. Alguns podem ser transmitidos mecanicamente por inoculação ou ainda transferido via *Agrobacterium tumefaciens* ou por biolística, usando métodos do DNA recombinante (Murphy, et al., 1995).

O genoma do TGMV é dividido em dois componentes de DNA, genoma A e B com aproximadamente o mesmo tamanho, ambos sendo

necessários para que ocorra a infecção pelo TGMV (Bisaro *et al.*, 1982; Hamilton *et al.*, 1983, 1984) (Figura 2). Os dois DNAs genômicos A e B diferem em seqüências nucleotídicas, exceto para uma região comum altamente conservada de aproximadamente 230 nucleotídeos. Essa região contém seqüências requeridas para a replicação do DNA viral, e duas pequenas regiões homólogas de 13 e 33 nucleotídeos de comprimento (Hamilton *et al.*, 1984; Revington *et al.*, 1989).

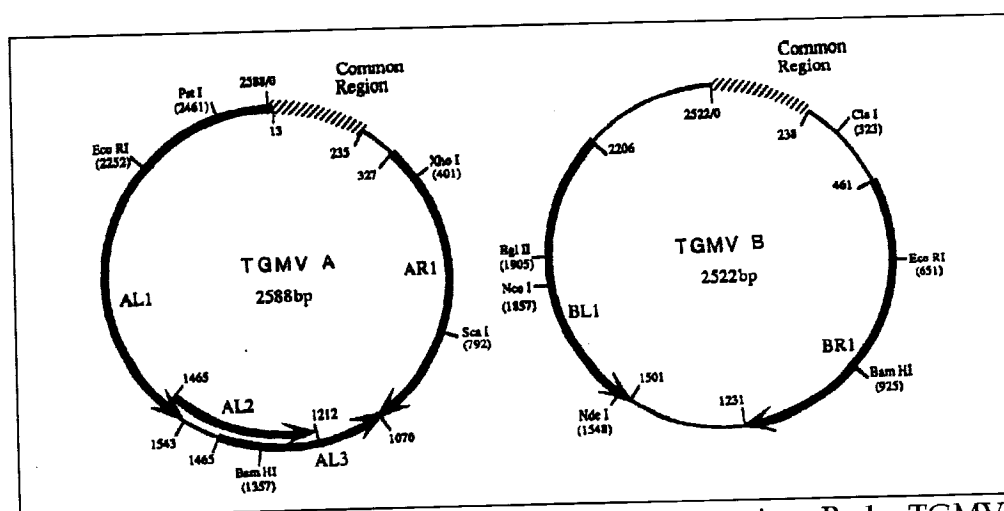


Figura 2. Esquema ilustrativo dos componentes A e B do TGMV. Common Region - Região comum; AL1 - Região codificadora responsável pela replicação do DNA viral; BL1 e BL2 - Regiões associadas com infecção.

Análises de plantas transgênicas contendo seqüências iguais repetidas dos componentes do genoma A e B demonstrou que o DNA A (2588 nucleotídeos), contém toda informação viral necessária para a replicação e encapsulação do DNA viral (Rogers *et al.*, 1986; Sunter *et al.*, 1987), enquanto DNA B 2522 nucleotídeos (Mac Doweel; Coutts e Buck, 1986), codifica funções necessárias para o movimento do vírus para a planta infectada ou entre células (Rogers *et al.*, 1986; Sunter *et al.*, 1987).

O DNA do TGMV se acumula no núcleo das células de plantas infectadas, podendo ser registradas unidades de comprimento e formas concataméricas de DNA de fita simples e dupla (Hamilton, Bisaro e Buck, 1982; Rushing *et al.*, 1987; Stomka, Buck e Coutts, 1988). A presença da fita dupla sugere que o TGMV emprega uma estratégia de multiplicação, semelhante àquelas empregadas apenas por DNA de fita simples contendo colifases (e.g., fago ØX174). Nessa fase o hospedeiro converte o DNA de fita simples infecciosa em dupla fita. Esse é então amplificado, e depois serve como 'template' para ambas transcrição viral e síntese de DNA fita simples. Juntos, o DNA A e B contém 6 quadros de leitura aberta (ORFs), que podem codificar proteínas maiores que 10 KDa. Esses ORFs divergem de uma região comum, e os transcritos surgem do DNA de dupla fita intermediário, em sentido bidirecional (Sunter, Gardiner e Bisaro, 1989; Hanley-Bowdoin *et al.*, 1989). O genoma A possui 4 ORFs, que apresenta síntese no sentido da direita. A transcrição da ORF AR1 produz uma proteína do capsídio viral de 28.7 KDa. (Kallender *et al.*, 1988). No sentido da esquerda ocorre transcrição nas ORFs AL1 (40.3 KDa.), AL2 (14.9 KDa.) e AL3 (15.7 KDa.).

Análises mutacionais do AL1 demonstraram que ele é essencial para a replicação do DNA viral (Elmer *et al.*, 1988). No entanto, a proteína do capsídio, bem como os produtos da ORFs AL2 e AL3, não são necessários para a síntese do vírus (Elmer *et al.*, 1988; Gardiner *et al.*, 1988). O genoma B do TGMV possui 2 regiões que codificam as proteínas BR1 (29.3 KDa.) e BL1 (26.4 KDa.), ambas necessárias para a infecção (Brough e

Nelson, 1988). As ORFs BR1 e BL1 também divergem da região comum e são transcritas em sentidos opostos (Sunter, Gardiner e Bisaro, 1989). A replicação do componente A pode ser comprometida pela ausência do componente B, pois não é capaz de se replicar sozinho por um longo período (Rogers *et al.*, 1986).

Culturas de tomates podem ser totalmente infectadas, com isso há uma queda brusca na produtividade. Ao isolar e multiplicar o vírus do mosaico dourado do tomateiro, poderemos caracterizá-lo geneticamente e determinar a herança genética da resistência ao vírus. O objetivo desse trabalho foi analisar molecularmente amostras de plantas infectadas com sintomatologia de mosaicismo, semelhante à apresentada por plantas infectadas com TGMV. Caso fosse comprovada a presença do isolado, ensaios de SSCP e RFLP seriam realizados com a meta de verificar polimorfismos dentro da população.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO. A monografia foi desenvolvida no Laboratório de Genética Molecular. As populações de mosca-branca, vírus, e plantas foram mantidas na Casa de Vegetação do Departamento de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (UFU)/MG, e na Escola Agrotécnica de Uberlândia/MG.

ISOLAMENTO DO DNA. O DNA do isolado foi purificado de acordo com o método CTAB (Doyle e Doyle, 1987). As amostras de folhas jovens de tomateiro infectado, foram trituradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em Tampão de Extração [CTAB 1%, NaCl 0,7M, Tris-HCl 50mM (pH 8,0), EDTA 50 mM (pH 8,0)]. Os homogeneizados foram então incubados em banho-maria a 65^o C durante 90 minutos, sendo agitados levemente a cada 15 minutos. O passo seguinte foi a adição de clorofórmio-

álcool isoamílico (24:1), e centrifugação a 4.000 rpm durante 15 minutos em uma centrifuga Himac CR21 (HITACHI). A fase sobrenadante foi lavada novamente com clorofórmio-álcool isoamílico e centrifugada. A fase superior limpa foi misturada com 2/3 do volume de isopropanol gelado para precipitação dos ácidos nucleicos. A solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi removida e sobre o pelete foi adicionado etanol 70% para lavagem. Uma nova centrifugação a 10.000 rpm foi realizada, a fase líquida removida, e o pelete ressuspendido com 200 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM (pH 8,0) contendo RNase a uma concentração final de 20 µg/ml. A avaliação da qualidade do DNA por eletroforese foi realizada em gel de agarose 0,8%, corado com Brometo de Etídio (0,5 µg/ml), em um aparato de eletroforese Horizon 20-25 (Life Technologie). As imagens foram registradas em um equipamento de fotodocumentação modelo ImageMaster VDS (Pharmacia). Aliquotas de 4,0 µl (≅ 200 ng de DNA) da solução do DNA foram utilizadas para amplificação do DNA viral em reações da PCR de 25 µl.

PCR COM PRIMERS DEGENERADOS. Os primers degenerados descritos na literatura [Genoma A: PAL1v1978: 5'-GCATCTGCAGGCCACATYGTCTTYCCNGT-3', PAR1c496: 5'-AATACTGCAGGGCTTYCTRTACATRGG-3'; Genoma B: PCRc1: 5'-CTAGCTGCAGCATATTTACRARWATGCCA-3', PBL1v2040: 5'-GCCTCTGCAGCARTGRTCKATCTTCATACA; Y = C, T; W = A, T; K = G, T; N = A, C, G, T; CTGCAG = sítio de restrição da enzima *Pst*I para clonagem; (Rojas *et al.* 1993)] foram adquiridos junto a empresa Gibco BRL

(Life Technologies), e a concentração de trabalho foi ajustada para 4 pmol/ μ l. Os deoxinucleotídeos (dNTPs) foram adquiridos da empresa Pharmacia, e a concentração da solução de trabalho foi de 10 mM. A *Taq* DNA Polimerase foi obtida do Centro de Biotecnologia (CENBIOT)-UFRS. As condições de reação foram: dNTP a 0,2 mM cada, 12 picomoles de cada primer, MgCl₂ a 3,5 mM, 2,5 μ l de Tampão da PCR (Tris-HCl 100 mM (pH 8,3), KCl 0,5 mM, 0,01% gelatina), 200 ng de DNA, e água filtrada em NANOpure (Barnstead). A reação foi realizada em um termociclador PTC 100 (MJ Research, Inc), de acordo com o programa de termociclagem a seguir: 1 ciclo de 95^o C por 2 minutos, 35 ciclos de 94^o C por 1 minuto, 55^o C por 1 minuto, 72^o C por 1 minuto, e um ciclo de extensão final de 72^o C por 5 minutos. A amplificação dos fragmentos de DNA será mostrada por eletroforese em gel de agarose 1,4%, em Tampão TBE 0,5X [TBE 10X: Tris 108 g, Ácido bórico 55 g, EDTA 0,5 M (pH 8,0), e água para um volume final de 1 litro], e corado em brometo de etídio a uma concentração final de 0,5 μ g/ml.

LIS-SSCP-PCR. Um microlitro do produto amplificado foi adicionado em 20 μ l da solução de LIS (Sacarose 10%, Azul de bromofenol 0,01%, Xileno cianol 0,01%) e homogeneizado. A mistura foi incubada por 10 minutos a 97^o C, e 10 μ l da mistura foi aplicado em gel de poliacrilamida 6% (Acrilamida-bisAcrilamida - 49:1), com espaçadores de 0,5 milímetros (Maruya, 1996). Um aparato de eletroforese foi montado, e as amostras foram corridas em tampão TBE 1X dentro dos limites de um sistema de temperatura e amperagem constantes de 4^o C e 15 mA, respectivamente,

durante 6 horas. Os géis foram corados pelo método de "Silver Staining" (Coloração com Prata).

RFLP (Polimorfismo através do Comprimento dos Fragmentos da Restrição). Foram testadas 8 enzimas de restrição, *Bgl* I, *Mbo* I, *Bam*H I, *Sst* I, *Kpn* I, *Sal* I, *Hha* I e *Hind* III, fornecidas pela Gibco BRL (Life Technologie). Vinte microlitros do produto amplificado foi digerido com 4 U (unidades) de enzima, e Tampão de Digestão 1X específico para cada enzima. O volume final da reação foi de 30 μ l, e a digestão ocorreu a 37° C durante 4 horas. Os produtos digeridos foram revelados em gel de agarose 1,6%, e corado com brometo de etídio 0,5 μ g/ml. As imagens foram registradas em um aparelho de fotodocumentação ImageMaster VDS (Pharmacia).

RESULTADOS

PCR. As ampliações das amostras de DNA extraídas das plantas infectadas, produziram fragmentos tanto para as ampliações com os primers do genoma A, quanto para as ampliações geradas com os primers do genoma B. Os produtos gerados a partir do Componente A do vírus, demonstraram dois fragmentos de tamanho diferente para parte das amostras analisadas. Um desses produtos revelou uma banda no gel de agarose 1,5% de aproximadamente 1260 pares de base (bp), enquanto que o outro gerou uma banda de cerca de 1220 bp. Em relação ao Componente B, o mesmo perfil foi observado, mas os fragmentos produzidos apresentaram pesos próximos a 450 e 410 bp (Figuras 3a, 3b). Embora a grande maioria das amostras de plantas infectadas tenha amplificado um único fragmento, algumas plantas das cultivares Saladinha e Pacific, apresentaram os dois fragmentos (Figura 5a). As amostras de plantas sadias foram usadas como controles negativos para a execução das reações da PCR. Após a

identificação de dois padrões distintos de amplificação, as amostras foram separadas em dois grupos de acordo com o peso molecular [WL1 (A450; B1250) e WL2 (A410; B1200)].

LIS-SSCP-PCR. O perfil eletroforético das amostras dos produtos amplificados e desnaturados, revelou o aparecimento de um padrão esperado de bandas para os Componentes A e B do grupo WL2, entretanto um perfil com 4 bandas, e não 2, foi observado para ambos os Componentes do grupo WL1 (Figuras 4a, 4b). A análise do SSCP das amostras amplificadas referentes às cultivares Saladinha e Pacific, demonstrou o aparecimento de 4 bandas (Figura 5c).

RFLP. Entre as oito enzimas selecionadas, somente a *Mbo* I e *Hha* I conseguiram digerir os produtos amplificados dos Componentes A e B de ambos os grupos WL1 e WL2 (Figura 6). A Tabela 1 apresenta os fragmentos produzidos após restrição e seus devidos pesos moleculares.

WL1			WL2		
<i>Mbo</i> I	<i>Hha</i> I	<i>Mbo</i> I + <i>Hha</i> I	<i>Mbo</i> I	<i>Hha</i> I	<i>Mbo</i> I + <i>Hha</i> I
180	260	170	280	280	280
170	150	100	130	130	260
100	40	90			130
					20

Tabela 1. Apresentação do tamanho dos fragmentos digeridos com as enzimas *Hha* I e *Mbo* I para os dois grupos WL1 e WL2.

DISCUSSÃO

O uso da PCR para diagnosticar viroses em plantas, tem demonstrado ser altamente sensível e específica. As ampliações das amostras das plantas testadas, produziram, com sucesso, fragmentos para ambos os genomas. Como os primers utilizados são específicos para sequências nucleotídicas altamente conservadas dos componentes A e B dos geminivírus, os perfis de bandagem diagnosticou a presença dos dois componentes. Isso sustenta a hipótese de que o vírus que infectou a população de plantas amostradas, corresponde a algum representante do subgrupo III dos geminivírus. De acordo com o produto gerado pela PCR para o componente B (ainda não foi caracterizado nenhum vírus do grupo dos geminivírus portando somente o componente B, pois o componente B não consegue se replicar sem o componente A), a partir de plantas de *Phaseolus vulgaris* infectados com BGMV (Vírus do Mosaico Dourado do Feijoeiro - Geminivírus/subgrupo III), ficou comprovado que o vírus se diferia do BGMV (Figuras 3a e 3b).

Comparações entre o comprimento do produto do TGMV-BZ gerado com esse mesmo par de primer, deduzido a partir da sequência

extraída do GenBank (Figuras 7 e 8), também afastou a possibilidade do isolado detectado ser desse grupo, porque o tamanho do fragmento do seu componente B foi de 510 bp, portanto 60 bp maior. O componente A do TGMV, pela sequência deve amplificar um produto de 1140, aproximadamente 80 bp menor. Diante dessas evidências, possivelmente esse novo isolado ter sido originado do TGV-Ud.

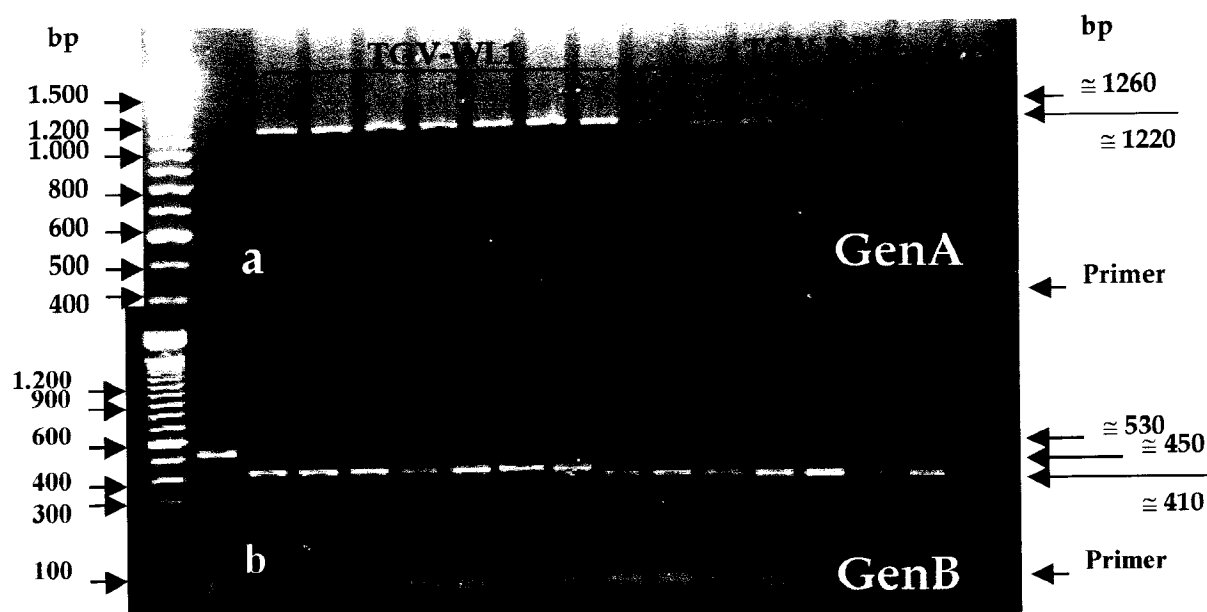


Figura 3. Perfil eletroforético dos produtos amplificados pelos primers degenerados. a) Fragmentos do componente A para os dois grupos WL1 e WL2 e seus respectivos pesos moleculares. b) Fragmentos do componente B dos dois grupos. A coluna BGMV representa o fragmento amplificado do BGMV.

O padrão de bandas mostrou notoriamente a presença de dois fragmentos de tamanho distintos. As plantas que eram infectadas com o vírus que gerou uma banda de 1260 bp (genoma A) e 450 bp (genoma B), foram colocadas em um grupo representativo do isolado denominado de

TGV-WL1. Outras plantas que apresentaram um perfil que continha uma banda de 1220 bp (genoma A) e 410 bp (genoma B) foram colocadas em outro grupo chamado de TGV-WL2. Embora esses dois padrões de bandagem foram observados na maioria das amplificações, separadamente em cada planta, duas amostras das cultivares Pacific e Saladinha amplificaram tanto o perfil de bandas do isolado TGV-WL1 quanto do WL2 (Figura 5a). Isso sugeriu que pudesse estar havendo infecção pelos dois isolados em uma única planta.

A técnica do LIS-SSCP-PCR tem sido bastante utilizada para identificar alterações nas sequências gênicas, devido a sua grande capacidade de detectar mutações de ponto. As análises feitas com os produtos amplificados dos isolados TGV-WL1 e TGV-WL2, com o objetivo de avaliar a homogeneidade das populações do vírus, revelaram que dentro da sequência nucleotídica amplificada as populações possuem sequência conservada. Através das observações eletroforéticas foi possível constatar essa homogeneidade, pois as amostras de cada isolado originaram bandas com nítida uniformidade (Figuras 4a e 4b). Para o isolado TGV-WL2, o número de bandas geradas foi coerente com o esperado, ou seja, duas bandas para cada fragmento. No entanto, o número de bandas observado para o isolado TGV-WL1, divergiu do padrão esperado formando quatro bandas para cada produto amplificado. A possível explicação para esse fenômeno, pode talvez ser encontrada através de ensaios moleculares aplicados no sentido de encontrar uma forma replicativa alternativa dos vírus desse isolado.

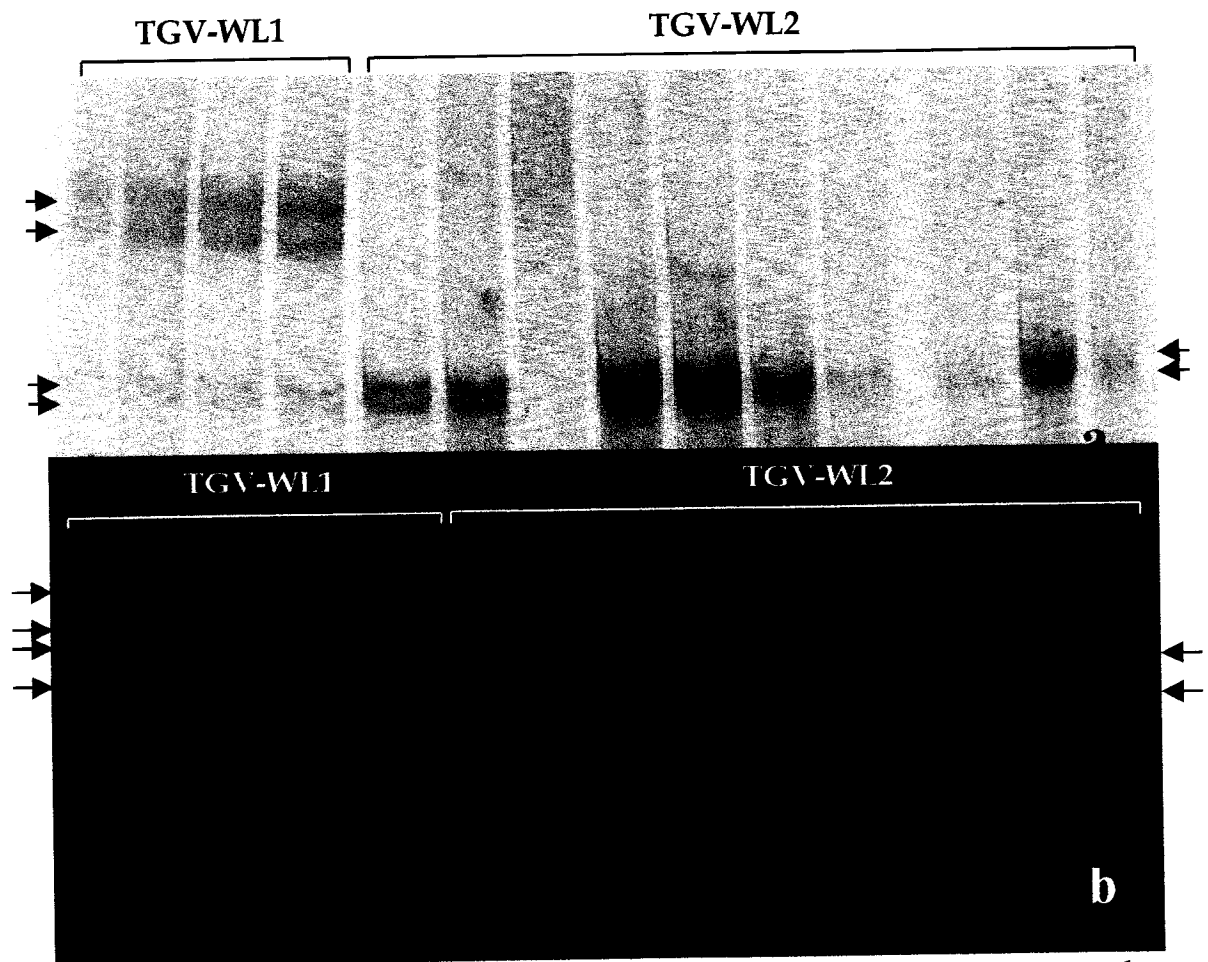


Figura 4. Géis de LIS-SSCP-PCR dos produtos amplificados a partir das amostras de DNA dos isolados TGV-WL1 e TGV-WL2. a) Perfil do SSCP dos produtos desnaturados do componente A; b) padrão de bandas do SSCP para o componente B.

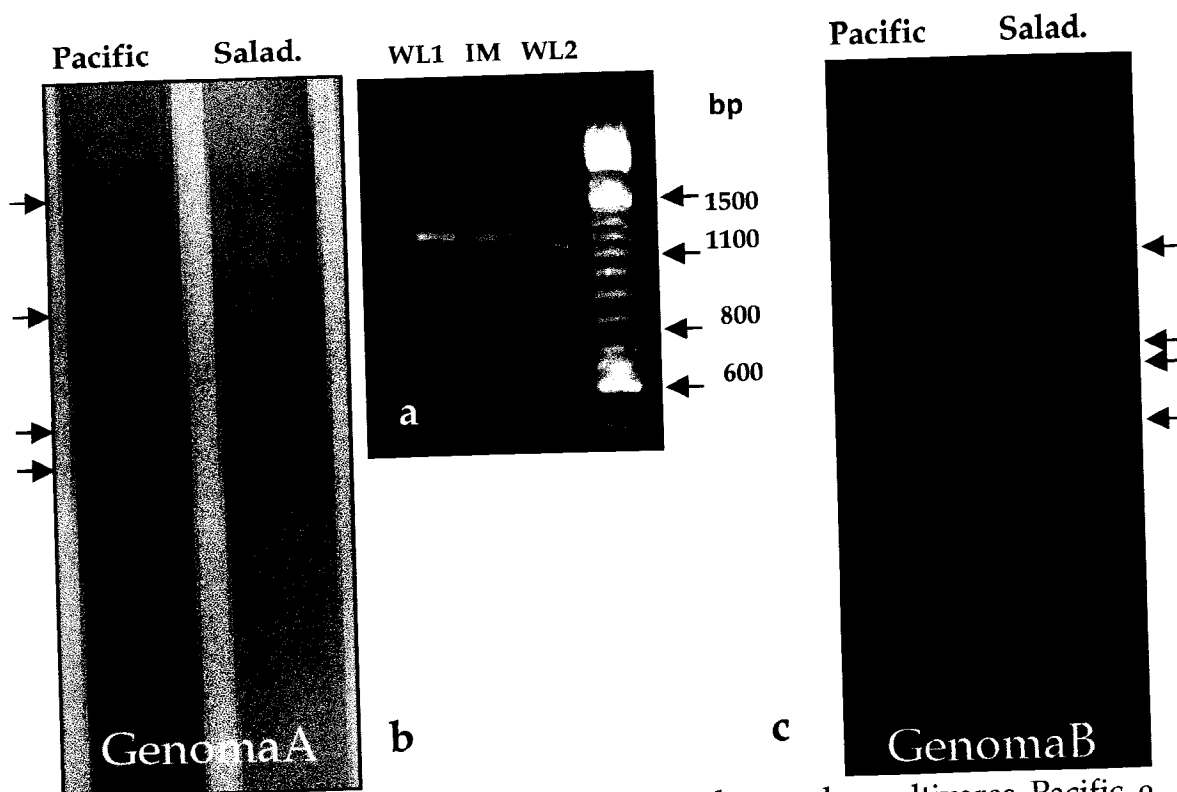


Figura 5. Detecção de infecção mista em plantas das cultivares Pacific e Saladinha. a) Gel de agarose 1,5% demonstrando um indivíduo que amplificou os dois fragmentos dos isolados TGV-WL1 e TGV-WL2 para o componente A do vírus; b) e c) Géis de SSCP mostrando a presença das quatro bandas correspondentes aos produtos amplificados desnaturados do componente A e B dos dois isolados, respectivamente.

O SSCP também foi útil para elucidar a hipótese de infecção mista, originada do aparecimento de 2 bandas nas amplificações das amostras das cultivares Pacific e Saladinha. A somatória das bandas geradas por cada isolado após desnaturação e eletroforese em um único indivíduo dessas cultivares, confirmou o aparecimento de infecção mista. A presença dos dois isolados TGV-WL1 e TGV-WL2 em uma única planta, pode ser facilitada pelo fato do vetor (mosca-branca) ser capaz de sustentar

a permanência de mais de um tipo de vírus em suas glândulas salivares, e transmiti-los ao mesmo tempo (Brown e Birds, 1992) (Figuras 5b e 5c).

Os ensaios de restrição enzimáticas do componente B dos isolados, foram eficientes com as enzimas *Mbo* I e *Hha* I para separar os isolados, pois produziram padrões diferentes de restrição (Figura 6). Além

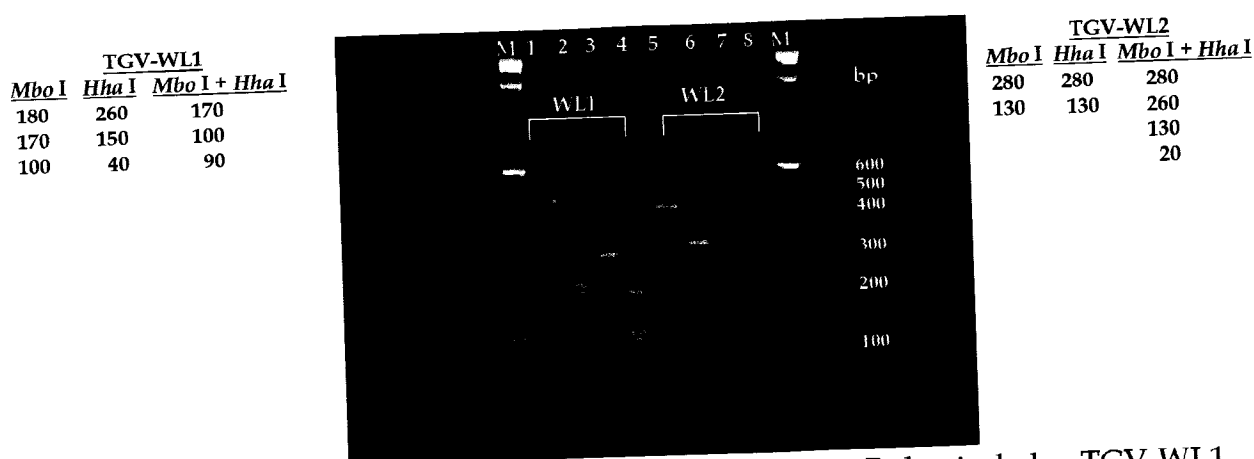


Figura 6. Ensaio de restrição enzimática do componente B dos isolados TGV-WL1 e WL2. 1 e 5, Fragmento não digerido; 2 e 6, *Mbo* I; 3 e 7, *Hha* I; 4 e 8, *Mbo* I e *Hha* I.

disso, as outras enzimas não foram capazes de digerir os fragmentos, tanto para o TGV-WL1 e WL2. Esses resultados sugere a possibilidade de um isolado ter sido originado do outro. Contudo, não pode ser definido que deleções ou duplicações apareceram em uma única região limitada, e sim, distribuídas ao longo de toda sequência. Esse fato é comprovado quando se compara os mapas de restrição dos dois isolados. A sequência entre os primers degenerados do componente B do TGMV, não possui sítio de restrição para a enzima *Mbo* I. Essa sequência é cortada pela enzima *Hha* I em um único sítio, produzindo dois fragmentos: um de 37 e outro de 473 bp. Os dados de PCR, SSCP e RFLP apontam para o surgimento de dois novos isolados, diferentes do BGMV e TGMV.

ggagatctatattgcatctcaccgaaaagtccatgacgcttgaaggattcattgtcagtcattctttgtcatgaatctccagaccacggatcctgttgcgtt
 atcggaaacctgttgcctgaactcaatcacacnrggtctatctcataca gctacggctcagctcggcgcttaattgagaagctgttgacggaacctgcaag
 atfatctcagtc aagtc atgagataactgatctcctcgggttgattcaatgtaattgaatgcattgggggac aagctaactgagaatccatalattatgaa
 gactgcctcgcagaggcagcgttccactgaaaataataagccaagagaalagctatgaaatcaagccttgcctcggcagcaacgaactgaaaatatta
 gctcaagagaatagctatgaaattcaacctcgcctcagggcaatgaggaactgaaactaacagaaaataatcgttcaggaaaataaaagaagatatt
 aagcciaataattagtagccacatagctaagaaactgtcaagagataatlatcalatgctggcgtagaactggaaatgggtagcatalatataaaacctta
 atgagggtatggcattttggtaattagaagggttactaccattgtttggggctacaaaaagttatatgaattggtagtaaggtagctcttatattagaag
 ttctaaggggcagctggcgccatccgtttaatattaccggatggccgcgatcgtctcccaccgctccgtgaattgcccgcattgtcggccactt
 ggtgtggtcccttgtgtaaccaatcatalttaagctgcagagcttgttattctgcactcattaactggctcccttaattgaaatactttagatattgctggtt
 gacgctatcgatgacagatataccaactttgtttctttgacgtggaccagttacattatggcgtggagccaattaagcaataatgcaagaggaaatttata
 ataaaatccaatattaatgaacaggatattataagttaatgtactcaacaaaatcgcagaggattttagctaatcaaggacggggttatcctcgtcattc
 aactgggaaacgttcacgtaattgtagcccatagattttaaacgtgatcaagtaagatgttcatgcaatgatgatgcaaaatggcaaacaccgctat
 acatgagaaccagttgtcagaatcgttatgttccataaacagccatctacgtttatcattccccagcttggcaagactgaaccaagccgttcaag
 gtcataattaagttgaaacgtttacgtttcaaggtactgtcaagttgaacgtgtgcacgttgatcttagcatggatgggcttctccaaagattgaaggcg
 tttttcttgttgtgattgacgcaaccacatcagctcaactgagtgctccatacattgatgagctattggcggcaggatccatagctatggaat
 ttactgtaaagtctcgttgaaggaccttttatacagcgatgtgtttaaacgagtgatccgttgagaaggattctacgatgattgacctgaaaggaat
 gacatctttactaataggcgttttaattgttggcagcatttaaggattttgatcgacaagcatgtaattggagttatggcaacataagcaagaacccatatt
 agttactattgttgatgctggatattgtgtcaaggcatcgacattgtatcattgaccttgattgtcggatgaaataataataatcttagcaataatgtg
 atactaaaccaactgaaacaagcaataacatgtaataatcacaataataataatggatatttgaacgttttggccttgacggagtacaattgtg
 ttaatgcactcttgactgtcgccttataattcgtttaactggaccaacgacattgtgataatggactgagctctctgcccacaattatgatgcagactctct
 gggctaaagatgggttcccaaccttaagtcttatacagatgcatgcaatccctgatcagatcccgcataatgatgggtggcctatagctccttgag
 gcccaagattctccgaggccttaattctattggcctgttagatgtggaggcggatctgtcaatcttccattcccaataccacgtggctgaatcgacat
 cttaatctgtaaattgttgacaatatttgacagtggtgcccggaaaggatcaacggagtttagctgtcgataatctcagcttcccttgaatttcgc
 aaaatgagctctgtgtaacattagctgcaaaccttgaatatagtttccatgggattgggtcttgagcgagaagaacgacgatgagaatagt

Figura 8. Sequência do componente A do Vírus do Mosaico Dourado do Tomateiro obtida do banco de sequências GenBank, acessão K02029. Os caracteres em rosa representam o sítio de anelamento dos primers; os caracteres em azul, a região completa amplificada localizada entre os primers com 1.142 bp de comprimento; em negro está a região restante do genoma do componente.

```

tttcaacttagatattgCGGTGtgacatcatcgatgacgttatactcaacctgtttgagtaaacctagaattgagatcCAAatgcccGctCAAataattatgt
ggcCctagtgaacgagcccaCatagtcttccCGTccgactatcgccctcgatgataaactaataggctctccggccgCgacgCgaactcttccAAAat
aatttcagccattgtctcatctcgtctggc acgllagtaaatgatgagacgtggaacggagggaagccatggttcaggagcttatCAAatcctatctaaa
ttgctatttagattggaactgaaataaatattttctgggattttctcttaattatctcagggcttcttctttggaagaagcatttaacgcctctgctgcagcG
tcgllagatgtttggcaacctctctagcacttcgacgctgacctggaattctccccatacaagaglatctccgctgatgcatggcattttgtaaftaagag
gcttactaccaattgaggaggggctcAAAagttatataaattggtagtaaggtagcttataatattagaaagtctaaagggcCacgtggcggccatccgtt
taataaccggatggccgCgCgacgtcaccgacccgcttcgcaaatcaccgcaattgtcgtctaaagtgcccgatattgtaaggccaatcatatt
tggccctgaaactaagatattttaaagactgtggttaagttgtaaaagttatataaacgacatgCGttctgtgcatcttaattCAAatgCtaagcggg
atccccatggcgtttaatggcggggacCtaaaaggttcccgctctgtaattattctctcagggaaagttgCtaagcgtgatcgtgggttaacaggccc
atgtacaggaagcccaggatatactgatcactaagaggccccgatgttCtaaaaggatggaaggccctgtaaagtcagtcatacagcagcgtcatg
atattccctagttggaaaggctatgtatctgtatctgtgacacgtgtaacgggtattaccaccggtgtgtaagcgttctgcgttaagctgtatactctg
ggcaagatatggatggatgagaacaatcaagttgaagaatcacacgaacagtgcatgttctggttgtagggatcggagacctatggcactcctatgga
ttcggacaagtgtaacatgttcgataatgaccaagtactgcaacggtaaaagacacctacgggatcgtttcaagtgatccacaggttcacgcca
ggttactggtgtcaatatgccgcaacgagcaggtctggttaggagattctggaaggtcaataacaatgtctctacaaccaccaggaggcagggaaa
tatgagaatcactgagaacccctgtattgtatgcatgtactcatgcccctaacctgtgtatgcgacgttgaaaattcgaatctattttatgattcgtat
aacaataataaaaatttatattttattgaatgattttcaggtacatgcgttatatgatctgtctgttgcaaacgaacagctctaataacattgtaatacatat
aacgcctaactgttcaaggtacaacatcactaagtatttaaactctttaaataaagttctcccagaagctgtcgtcgtatgctcctacttggaaagttgagaaa
tgccttggagatccaatgctctctcaggttgtggtgaacctgattgtaagtggtatctctggtgtgtaggggactctcagctgattactctg
aaatagaggggattgttctccagatatagacgccattctctgttgaggcacaagtataggttccctgtcgtgaatccattgttctgagctgatgtg
aatgtatatggaacagccacagttcagggtcaattcgtcgccttctaatagtctctctgtttagctctgtgttgagctttgatagaggggggagttgaggaag
acgaatttcgattatgaaagtcagttctttagtgaggttttctctttgtcagggaaaactttaagctagcaccctcaccagattgcacagcagcattg
acgggataccctcttaattgaaactggttccgatttacagttagctgccaatctctttgggccccaatgagttctttccaatg

```

Figura 9. Sequência do componente B do Vírus do Mosaico Dourado do Tomateiro obtida do banco de sequências GenBank, acesso K02030. Os caracteres em rosa representam o sítio de anelamento dos primers; os caracteres em azul, a região completa amplificada localizada entre os primers com 510 bp de comprimento; em negro está a região restante do genoma do componente.

CONCLUSÃO

Dois isolados foram identificados infectando a população de tomateiros, mantida na casa de vegetação e no campo. Os resultados sugerem a possibilidade de estar havendo infecção mistas nas cultivares Pacific e Saladinha, por esses dois isolados. As populações dos isolados estão homogêneas, ou seja, as sequências dos genomas virais demonstraram estar inalteradas dentro de cada população.

A técnica de LIS-SSCP-PCR permitiu não só a identificação dos isolados, bem como detectou infecção mista. Esta técnica conseguiu, neste trabalho, discriminar infecção mista com fragmentos superiores à 400 pb.

LITERATURA CITADA

Agriannual - Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira. São Paulo, 1996.

Bisaro, D. M.; Hamilton, W. D. O; Coutts, R. H. A, and Buck, K. W. (1982).

Molecular Cloning and Characterization of the two DNA Componentes of Tomato Golden Mosaic Virus. Nucleic Acids Research, 10: 4913-4922.

Brough, J. K. and Nelson, M. R. (1988). Transmission, Host Range, and Virus-Vector Relationships of Chino del tomato virus, a Whitefly-Transmitted Geminivirus from Sinaloa, México. Plant Disease, 72: 866-869.

Brown, J.R. and Birds, J. (1992). Whitefly-transmitted geminivirus and associated disorders in the Americans and the Caribbean Basin. Plant Disease, 76:220-225.

- Davies, J. W.; Stanley, J.** (1989). Geminivirus genes and vectors. Trends Genet., 5: 77-81.
- Doyle, J. J. e Doyle, J. L.** (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull, 19: 11-15.
- Elmer, J.S.; Sunter, G.; Gardiner, W.E.; et al.** (1988). Agrobacterium Mediated Inoculation of Plants with Tomato Golden Mosaic Virus DNAs. Plant Molecular Biology, 10: 225-234.
- Filgueira, F.R. A.** (1982). Manual de Olericultura, 2 ed. São Paulo, Agronomicas Ceres. 2: 357.
- Filgueira, F.R. A.; Fernandes, J.J.; Rezende, E.A.; Zerbini, F.M.; Maciel-Zambololim, E., and Gilbertson, R.L.** (1996). Geminivirus in Plurilocular Tomato Cultivars Grown under Plastic Greenhouse Conditions in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. First International Conference on the Processing Tomato. First International Symposium on Tropical Tomato Diseases. 18-22, (Resumo).
- Gardiner, W.; Sunter, G.; Brand, L.; et al.** Genetic analysis of Tomato Golden Mosaic Virus: the Coat Protein is not Required for Systemic Spread or Symptom Development. EMBO Journal, 7: 899-908.

- Gilbertson, R. L.; Hidayat, S. H.; Martinez, R. T.; Leong, S. A.; Faria, J. C.; Morales and Maxwell, D. P. (1991).** Differentiation of Bean-Infecting Geminivirus by Nucleic Acid Hybridization Probes and Aspects of Bean Golden Mosaic in Brazil. Plant Disease, 75: 336-342.
- Goodman, R. M. (1977).** Single-stranded DNA Genoma in a Whitefly-Transmitted Plant Virus. Virology, 83: 171-179.
- Hamilton, W. D. O., Bisaro, D. M. and Buck, K. W. (1982).** Identification of Novel DNA Forms in Tomato Golden Mosaic Virus Infected Tissue: Evidence for a Two Components Viral Genome. Nucleic Acids Research, 10: 4901-4912.
- Hamilton, W. D. O., Bisaro, D. M., Coutts, R. H. A. and Buck, K. W. (1983)** Demonstration of the Bipartite Nature of Genome of a Single-strand DNA Plant Virus by Infections with the Cloned DNA Components. Nucleic Acids Research, 11: 7387-7396.
- Hamilton, W. D. O., Stein, V. E., Coutts, R. H. A. and Buck, K. W. (1984).** Complete Nucleotide Sequence of the Infectious Cloned DNA Components of Tomato Golden Mosaic Virus: Potential Coding Regions and Regulatory. The EMBO Journal, 3: 2197-2205.
- Hanley-Bowdoin, L.; Elmer, J. S. and Rogers, S. G. (1989).** Functional Expression of the Leftward Open Reading Frames of the A Component of

Tomato Golden Mosaic Virus in Transgenic Tobacco Plants. The Plant Cell, 1: 1057-1067.

Harrison, B. D. (1985). Advances in Geminivirus Research. Annual Review of Phytopathology, 23: 55-82.

Kallender, H.; Petty, I. T. D.; Stein, V. E.; Panico, M.; Blench, I. P., et al. (1988). Identification of Coat Protein Gene of Tomato Golden Mosaic Virus. J. Gen. Virol., 69: 1351-1357.

Lazarowitz, S. G. (1987). The Molecular Characterization of Geminiviruses. Plant Molecular Biology Rep., 4: 177-192.

Lazarowitz, S. G. (1992). Geminivirus: Genome structure and gene function. Critical Review of Plant Science, 11: 327-349.

Mac Dowell, S. W.; Coutts, R. H. A. and Buck, K. W. (1986). Molecular Characterization of Subgenomic Single-strand and Double-strand DNA forms from plants infected with Tomato Golden Mosaic Virus. Nucleic Acids Research, 14: 7967-7984.

Makishima, N. (1991). Situação atual da produção de tomate no Brasil. In: Encontro Nacional e abastecimento de tomate, II Jaboticabal. Anais Jaboticabal, UNESP/FUNEP. 1-19P.

- Maruya, E.; Saji, H and Yokoyama, S. (1996).** PCR-LIS-SSCP (Low Ionic Strength Single-Stranded Conformation Polymorphism)-A Simple Method for High-Resolution Allele Typing of HLA-DRB1,-DQB1, and -DPB1. Genome Methods, 6: 51-57.
- Murphy, F. A.; Fauquet, C. M.; Bishop, D. H. L.; Ghabrial, S. A.; Jarvis, A. W.; Martelli, G. P.; Mayo, M. A. and Summed, M. A. (1995).** Virus Taxonomy: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Virus. Archives of Virology 10 (Supplement), 158-165.
- Revington, G. N.; Sunter, G. and Bisaro, D. M. (1989).** DNA Sequences Essential for Replication of the B Genome Component of Tomato Golden Mosaic Virus. The Plant Cell, 1: 985-992.
- Rogers, S. G.; Bisaro, D. M.; Horsch, R.B.; et al. (1986).** Tomato Golden Mosaic Virus A Component DNA replicates autonomously in Transgenic Plants. Cell, 45: 593-600.
- Rojas, M. R.; Gilbertson, R. L.; Russel, D. R. and Maxwell, D. P. (1993).** Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. Plant Disease, 77: 340-347.
- Rushing, A. E.; Sunter, G.; Gardiner, W.; et al. (1987).** Ultrastructural aspect of tomato golden mosaic virus infection in tobacco. Phytopathology, 77: 1231-1236.

- Stanley, J. and Etownsend, R.** (1985). Characterization of DNA forms associated with cassava latent virus infection. Nucleic Acids Research, 13: 2189-2205.
- Stomka, M.J.; Buck, K. W. and Coutts, R.H.** (1988). Characterization of Multimeric DNA Forms Associated with Tomato Golden Mosaic Virus Infection. Archives of Virology, 100: 99-108.
- Sunter, G.; Gardiner, W. E.; Rushing, A. E.; Rogers, S. G. and Bisaro, D. M.** (1987). Independent Encapsidation of Tomato Golden Mosaic Virus A Component DNA in Transgenic Plants. Plant Molecular Biology, 8: 477-484.
- Sunter, G.; Gardiner, W.E. and Bisaro, D.M.** (1989). Identification of Tomato Golden Mosaic Virus-Specific RNAs in Infected Plants. Virology, 170: 243-250.
- Sunter, G.; Hartitz, M.D. Hormuzoli, S. G.; Brough, C. L. and Bisaro, D. M.** (1990). Genetic Analysis of tomato Golden Mosaic Virus: ORF AL2 Is Requierid for Coat Protein Accumulation While ORF AL3 Is Necessary for Efficient DNA Replication. Virology, 179: 69-77.