

SISBI/UFU



1000200415

D

SISBI/UFU

200415

exil

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
BIBLIOTECA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**ANÁLISE MOLECULAR DE UM NOVO ISOLADO DE
GEMINIVÍRUS EM TOMATEIRO E SUA GAMA DE
HOSPEDEIROS**



Juliana Alves São Julião

**Uberlândia-MG
Julho-2000**

39230

UNIVERSITY OF CALIFORNIA
LIBRARY
DIVERSITY

UNIVERSITY OF CALIFORNIA
LIBRARY
DIVERSITY



UNIVERSITY OF CALIFORNIA
LIBRARY

UNIVERSITY OF CALIFORNIA
LIBRARY

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

MON
635.64:632
J94a
TES/MEM

**ANÁLISE MOLECULAR DE UM NOVO ISOLADO DE
GEMINIVÍRUS EM TOMATEIRO E SUA GAMA DE
HOSPEDEIROS**

Juliana Alves São Julião

Orientador: Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Curso de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica.

Uberlândia-MG

Julho-2000

0069-57160

FU-00012047-6

Julião, Juliana Alves São, 1974-

Análise molecular de um novo isolado de geminivírus em tomateiro e
gama de hospedeiro - Uberlândia: 2000

64p.;

Luiz Ricardo Goulart Filho (Orientador)

Tese de Mestrado - Universidade Federal de Uberlândia.

Coordenação de pós-graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui Bibliografia

1. geminivírus - Teses. 2. gama de hospedeiro - Teses. 3. análise
molecular - Teses. I. Universidade Federal de Uberlândia.

Coordenação de Pós-graduação em Genética e Bioquímica.

CDU 581.175

QUE EU...

QUE EU TENHA...

A oportunidade de servir, sem nada pedir;
A vontade de trabalhar, sem reclamar;
O dom de perdoar, sem menosprezar.

QUE EU VEJA...

A luz do sol, sem os reflexos do ódio;
O procedimento do inimigo, sem maldade;
A maledicência humana, sem desprezo.

QUE EU SINTA...

A presença de Deus, em meu semelhante;
A vontade de viver, refletida em meus atos;
A dignidade de poder sentir, sofrer e calar.

QUE EU VIVA...

No sentido de amparar, proteger, e ajudar;
Sem procurar saber porque a minha vida
foi repartida aos que precisam de mim.

QUE EU SEJA...

Digno do perdão dos que o dão, sem que o peça;
Forte, para resistir ao grito da tentação e do mal;
Fraco, para poder me entregar em holocausto à dor.

ENFIM, QUE EU...

Tenha, nos olhos, a luz translúcida do amor;
Sinta, vinda dos Céus, a Onipotência do Criador;
Veja, em meus atos, a beleza do bom proceder;
Viva, na tranqüilidade do dever cumprido,
E seja digno de uma nova existência dedicada ao bem...

QUE EU SEJA ASSIM...

Fernando Benzatti

**À memória de meu pai, minha homenagem.
A minha mãe, dedico.
A meus irmãos, ofereço.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e oportunidades concedidas.

Ao Prof. Luiz Ricardo Goulart pela amizade, orientação e ensinamentos proporcionados durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Fernando César Juliatti e Prof. Armando Takatsu pela participação como membros da Banca Examinadora e sugestões apresentadas.

À Wânia, minha grande amiga, com a qual durante esses anos aprendemos, juntas, a arte da verdadeira amizade.

Aos meus amigos Kleber, Gismar e Juarez que colaboraram para a minha formação profissional desde o início.

À tia Silvia que me incentivou a subir os degraus da vida rumo a conquista de meus objetivos.

Aos amigos Rosana, Marcolino, Alexandre Colleto, Karla e Érika pela amizade e auxílio prestados.

Aos Docentes do Instituto de Genética e Bioquímica pelos ensinamentos ministrados.

À Adriana Freitas pela amizade e ajuda durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Foued pela concessão das enzimas de restrição e filmes de raio X.

A todos os amigos do laboratório de Genética, pelo carinho, compreensão, amizade e auxílio nos momentos difíceis.

À Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade oferecida.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

Aos demais que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e oportunidades concedidas.

Ao Prof. Luiz Ricardo Goulart pela amizade, orientação e ensinamentos proporcionados durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Fernando César Juliatti e Prof. Armando Takatsu pela participação como membros da Banca Examinadora e sugestões apresentadas.

À Wânia, minha grande amiga, com a qual durante esses anos aprendemos, juntas, a arte da verdadeira amizade.

Aos meus amigos Kleber, Gismar e Juarez que colaboraram para a minha formação profissional desde o início.

À tia Silvia que me incentivou a subir os degraus da vida rumo a conquista de meus objetivos.

Aos amigos Rosana, Marcolino, Alexandre Colleto, Karla e Érika pela amizade e auxílio prestados.

Aos Docentes do Instituto de Genética e Bioquímica pelos ensinamentos ministrados.

À Adriana Freitas pela amizade e ajuda durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Foued pela concessão das enzimas de restrição e filmes de raio X.

A todos os amigos do laboratório de Genética, pelo carinho, compreensão, amizade e auxílio nos momentos difíceis.

À Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade oferecida.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

Aos demais que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	viii
SUMMARY	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. COMPOSIÇÃO GENÔMICA	5
3.1.1. Geminivíroses bipartidas do Subgrupo III	6
3.1.2. Geminivíroses monopartidas do Subgrupo II	7
3.1.3. Geminivíroses monopartidas do Subgrupo I	8
3.2. REPLICAÇÃO	9
3.3. TRANSMISSÃO	11
3.4. MOVIMENTO SISTÊMICO	14
3.5. SINTOMATOLOGIA	16
3.6. GAMA DE HOSPEDEIROS	17
3.7. DIAGNOSES	19
3.7.1. Técnicas de PCR	19
3.7.2. PCR-LIS-SSCP	19
3.7.3. Sondas de DNA não radioativas	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1. Material biológico	26
4.2. Fonte de vírus, moscas brancas e plantas	26
4.3. Extração de DNA	27
4.4. Quantificação do DNA	28
4.5. PCR	28
4.6. Construção da sonda de DNA biotinizada	29

4.7. Teste da sonda biotinizada	29
4.8. Detecção de geminivírus por hibridação slot-blot	30
4.9. Ensaio LIS-SSCP-PCR	31
4.10. Ensaio RFLP	32
4.11. Análise dos dados	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1. Construção de sonda específica para o componente B das geminiviroses e quantificação da carga viral em variedades de tomate	33
5.2. Sintomatologia e gama de hospedeiros	38
5.3. Caracterização dos fragmentos amplificados pela PCR	42
5.4. Análise molecular dos componentes A e B dos geminivírus por SSCP (Polimorfismo Conformacional de Fita Simples)	45
5.5. Construção de um mapa de restrição para o genoma A	46
6. CONCLUSÕES	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ÍNDICE REMISSIVO	64

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa demonstrativo dos componentes genômicos A e B do TGMV. Os dois círculos representam a forma replicativa do DNA de fita dupla. A região comum está indicada na caixa achurada e as setas definem as posições das ORFs com a massa molecular de cada proteína. As posições dos sítios de restrição estão indicados fora do círculo. 7
- Figura 2.** Esquema demonstrativo do princípio da análise do SSCP (Polimorfismo Conformacional de Fita Simples). As siglas Hm, Heter, e SD indicam Homozigoto, Heterozigoto e DNA sem desnaturação, respectivamente. 20
- Figura 3.** Estrutura da biotina-14-dATP a qual pode ser incorporada na molécula de DNA. 22
- Figura 4.** Defosforilação do substrato PPD pela fosfatase alcalina. 24
- Figura 5.** Teste do produto amplificado pela PCR na presença da biotina-14-dATP. (A) Análise dos produtos amplificados em gel de agarose 1,2%, cujas colunas 1 e 2 indicam fragmento amplificado na presença da biotina-14-dATP e controle (fragmento não biotinilado), respectivamente. M-marcador de 100 pb. (B) Análise do fragmento amplificado, em membrana de nylon, detectado com substrato cromogênico (NBT/BCIP). 34
- Figura 6.** DNA viral hibridizado com sonda marcada com biotina - 14 - dATP específica para o componente B. De 1 à 9 diluições de produto amplificado nas concentrações: 10.000 ng; 1000 ng; 100 ng, 50 ng; 10 ng; 5 µg; 2,5 ng; 1 ng e 0,1 ng, respectivamente. O mínimo detectável pela sonda foi de 1 ng. 35
- Figura 7.** Hibridação por slot-blot mostrando diferença na intensidade de concentração viral entre as plantas analisadas. De 1 a 3 cultivar Angela Hiper, de 4 a 6 cultivar Carmem, de 7 a 9 cultivar Empire, de 10 a 12 cultivar Jumbo, de 13 a 15 cultivar Santa Clara. 35
- Figura 8.** Plantas mostrando a sintomatologia pela infecção por geminivíroses. (A) Plantas de tomate; (B) Plantas de pimentão; (C) Plantas de berinjela; (D) Plantas de jiló; (E) Plantas de feijão; (F) Plantas de vagem. 40
- Figura 9.** Plantas mostrando a sintomatologia pela infecção por geminivíroses. (A) Plantas de abóbora; (B) Plantas de couve; (C) Plantas de pepino; (D) Plantas de mandioca. 41
- Figura 10.** Diagnóstico molecular de infecção por geminivírus baseado na PCR. Dois oligonucleotídeos complementares às sequências que flanqueiam a região comum e amino-terminal das ORFs AL1 e AR1 foram usados para amplificação específica do componente A. As colunas de 1 a 12 correspondem a abóbora, berinjela, couve, feijão, jiló, mandioca, pepino, erva daninha, tomate, vagem, pimentão e controle (planta de tomate

- infectada com TRMV), respectivamente. M-marcador de 100 pb. 43
- Figura 11.** Diagnóstico molecular de infecção por geminivírus baseado na PCR. Dois oligonucleotídeos complementares às sequências que flanqueiam a região comum e amino-terminal da ORF BL1 foram usados para amplificação específica do componente B. As colunas de 1 a 12 correspondem a abóbora, berinjela, couve, feijão, jiló, mandioca, pepino, erva daninha, tomate, vagem., pimentão e controle (planta de tomate infectada com TRMV). M - marcador de 50 pb. 44
- Figura 12.** Análise SSCP de produtos da PCR para o componente A de 11 espécies de plantas infectadas por geminivírus. As setas indicam que cada espécie apresentou DNA de fita dupla.. As colunas de 1 a 11 correspondem a abóbora, berinjela, couve, feijão, jiló, mandioca, pepino, erva daninha, tomate, pimentão e vagem, respectivamente. 47
- Figura 13.** Análise SSCP de produtos da PCR para o componente B de 11 espécies de plantas infectadas por geminivírus. As setas indicam que cada espécie apresentou DNA de fita dupla.. As colunas de 1 a 11 correspondem a abóbora, berinjela, couve, feijão, jiló, mandioca, pepino, erva daninha, tomate, vagem e pimentão, respectivamente. 47
- Figura 14.** Digestão enzimática do fragmento parcial do genoma A. As colunas de 1 a 11 indicam abóbora, berinjela, couve, feijão, jiló, mandioca, pepino, pimentão, erva daninha, tomate, vagem, respectivamente. 12- amostra controle sem digestão enzimática e M- marcador de 100 pb. 48
- Figura 15.** Ensaio de restrição enzimática do componente A total da planta de tomate infectada com o novo isolado de geminivírus. As linhas de 1 a 6 correspondem ao fragmento de aproximadamente 1,2 Kb e indicam *Sal* I e *Mbo* I, *Sal* I e *Hha* I, *Mbo* I e *Hha* I, *Sal* I, *Mbo* I, *Hha* I, respectivamente. As linhas de 7 a 12 correspondem ao fragmento de aproximadamente 1,55 Kb e indicam *Bam*H I e *Nhe* I, *Bam*H I e *Mbo* I, *Nhe* I e *Mbo* I, *Bam*H I, *Mbo* I, *Nhe* I, respectivamente. M - marcador. 49
- Figura 16.** Mapa de restrição do componente A para um fragmento linear de aproximadamente 1,2 Kb, para o isolado e alguns begomovírus. AL1 - ORF da proteína de replicação (porção amino-terminal). Caixa em negrito - Região Comum (CR). AR1- ORF da capa protéica (porção amino-terminal). 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Gama de hospedeiros experimental do novo isolado de geminivírus como determinado pela transmissão da mosca branca. Uberlândia, UFU. 2000	26
Tabela 2.	Sequência de <i>primers</i> degenerados utilizados para amplificar os componentes A e B de geminivírus como descrito por Rojas (1993).	29
Tabela 3.	Leitura da densidade óptica (IOD) e da quantidade de DNA (μg) de três plantas das cinco cultivares estudadas obtidas pela equação do gráfico exponencial.	36
Tabela 4.	Análise de variância da densidade óptica e da quantidade de vírus em $1,5 \mu\text{g}$ de DNA de cinco cultivares de tomate em 1 mg de tecido vegetal.	37

ABREVIATURAS

μ l	microlitro
μ M	micromolar
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
BGMV	<i>Bean golden mosaic virus</i>
BSA	soro albumina bovina
BYDV	<i>Barley yellow dwarf virus</i>
CP	proteína da capa
CTAB	brometo de hexadecil trimetil amônia
DNA	ácido desoxiribonucléico
dNTP	desoxiribonucleotídeo trifosfato
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético sal dissódico
g	gramas
IOD	densidade óptica da imagem
Kb	quilobase (s)
K Da	quilo dalton
M	molar
MgCl ₂	cloreto de magnésio
ml	mililitro
NBT	nitro blue tetrazolium chloride
ng	nanograma
nm	nanômetro
NTPs	nucleotídeos trifosfato
ORF	região aberta de leitura
pb	pares de base
pg	picograma
PCR	Polimerase Chain Reaction
PYMV	<i>Potato yellow mosaic virus</i>
PVP	polivinilpirrolidone
RF	forma replicativa
RNA	ácido ribonucleíco

SSC	solução citrato de sódio
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> (enzima DNA polimerase)
TBE	tampão Tris-borato EDTA
TE	tampão Tris-EDTA
TGMV	<i>Tomato golden mosaic virus</i>
ToMoV	<i>Tomato mottle virus</i>
TRMV	<i>Tomato rugose mosaic virus</i>
TYLCV	<i>Tomato yellow leaf curly virus</i>
U	unidade (s) de enzima

RESUMO

ANÁLISE MOLECULAR DE UM NOVO ISOLADO DE GEMINIVÍRUS EM TOMATEIRO E SUA GAMA DE HOSPEDEIROS.

As geminiviroses consistem numa ampla e diversificada família de viroses que infectam uma variedade de plantas, as quais são transmitidas por cigarrinhas ou mosca branca. Elas são caracterizadas por um genoma composto de um (A) ou dois (A e B) componentes de DNA circular e de fita simples, envolvidos por capsídios em forma de icosaedros imperfeitos e geminados. A família Geminiviridae encontra-se dividida em três subgrupos I, II e III, de acordo com a organização do genoma, gama de hospedeiros e tipo de inseto vetor. Atualmente, as geminiviroses têm se destacado por ser um fator limitante na produção de tomate e tornou-se um alvo de estudo. Novas geminiviroses têm surgido no Estado de Minas Gerais sendo que um novo isolado foi o alvo desta investigação. Os dois genomas virais, A e B, foram amplificados por meio de primers degenerados na PCR, confirmando que esse fitovírus pertence ao Subgrupo III e infectam dicotiledôneas. Posteriormente, diagnóstico via PCR foi realizado em mais 10 espécies de plantas (abóbora, berinjela, couve, feijão, jiló, mandioca, pepino, pimentão, planta daninha e vagem) com o objetivo de verificar a gama de hospedeiro desse vírus. Das amostras analisadas, todas apresentaram sintomatologia de geminivírus semelhante ao TRMV. Amostras dessas plantas no LIS-SSCP-PCR (polimorfismo conformacional de fita simples e de baixa força iônica) mostrou um perfil eletroforético diferente para a planta de pimentão em comparação com as demais. O motivo dessa planta ter tido padrão no SSCP diferenciado das outras pode ser explicado pelo fato de ter sido coletada em local diferente dos outros hospedeiros, no qual havia plantas de tomate infectadas com TRMV (Vírus do Mosaico Rugoso do Tomate). A quantificação da concentração viral foi realizada por meio do slot-blot com diluição em série dos amplicons virais em cinco cultivares do tomateiro com cinco repetições cada. Das cinco cultivares analisadas, todas estavam infectadas por geminivírus, porém, não houve diferenças significativas quanto à concentração viral, sugerindo que todas são suscetíveis, mas com diferentes níveis de tolerância, provavelmente tolerância ao estresse. Mapa de restrição enzimática foi proposto para confirmar se este isolado era um novo geminivírus do tomateiro. Das 14 enzimas testadas somente três reconheceram sua sequência específica, Hha I, Mbo I e Sal I. Comparações com as sequências do TGMV, BGMV, PYMV, ToMoV e TRMV indicam que essa fitovirose é um novo geminivírus.

SUMMARY

MOLECULAR ANALYSIS OF A NEW GEMINIVIRUS ISOLATE OF TOMATO PLANTS AND ITS HOST RANGE.

The geminiviruses are a large and diverse family of plant viruses that infect a broad variety of plants, which are whitefly or leafhopper transmitted. They are characterized by twin icosahedral capsids and one (A) or two (A and B) circular single-stranded DNA genomes. The Geminiviridae family fall into three subgroups (I, II and III) based on the genome organization, host range and type of insect vector. At the moment, the geminiviruses have become one of the most important limiting factors of the tomato production. New geminiviruses have been detected in Minas Gerais State, and one of these viruses is the target of this investigation. Molecular analyses were accomplished through the use of degenerate primers for PCR amplification. Slot-blot with serial dilutions of virus DNA amplicons was used to demonstrate differences in virus concentration in five tomato cultivars, and LIS-SSCP (low ionic strength - single stranded conformational polymorphism) was used to detect differences among virus isolates in a broad host range. The two virus genomes, A and B, were amplified, confirming that this fitovirus is a geminivirus that belongs to the subgroup III, which can infect dicotyledonous plants. All analyzed samples presented geminivirus symptoms similar to those described for the TRMV (Tomato Rugose Mosaic Virus). Subsequently, diagnosis through PCR was accomplished for 10 different plant species (squash, eggplant, cabbage, bean, cassava, cucumber, pepper, weed, greenbeans) with the objective of verifying the host range of this new virus. All samples were positive for virus infection since DNA amplicons were detected in all samples. These samples were also submitted to LIS-SSCP-PCR to demonstrate the presence of other virus isolates and to compare virus from different samples. Only pepper samples showed a different SSCP band pattern in comparison to the other hosts. The reason for this may be that the collection of these samples were done in another place, where infected tomato plants were also observed with similar symptoms. In the same experimental field of all hosts, five tomato cultivars with five samples each were randomly selected and virus concentration was investigated through slot-blot. All samples were infected with this new geminivirus; however, there was no significant differences for viral concentration among samples, suggesting that all plants were susceptibles, but with different tolerance levels, probably associated to stress tolerance. Additionally, to demonstrate that this isolate was a new virus, a restriction mapping of the A genome amplicon was done. Of the 14 enzymes tested, only three recognized specific sequence sites, Hha I, Mbo I and Sal I. Comparisons with the sequences obtained from TGMV, BGMV, PYMV, ToMoV and TRMV indicated that this geminivirus is different.

1. INTRODUÇÃO

As viroses representam uma única classe de agentes patogênicos de uma associação extremamente íntima formada entre o vírus e seu hospedeiro. Embora a interação específica de viroses com seu hospedeiro possa variar, esse apresenta um papel crítico no ciclo de vida do vírus, incluindo a expressão dos genes virais, a replicação do genoma e o movimento do vírus pela planta.

Entre essas, as geminiviroses consistem numa ampla e diversificada família de viroses que infectam uma variedade de plantas e causam perdas significativas por todo o mundo. Elas são caracterizadas por um genoma composto de um (A) ou dois (A e B) componentes de DNA circular e de fita simples, envolvidos por capsídios em forma de icosaedros imperfeitos e geminados (Harrison, 1985; Lazarowitz, 1992).

A família Geminiviridae consiste de três subgrupos que diferem com relação a estrutura genômica, gama de hospedeiros e inseto vetor (Murphy *et al.*, 1995; Padidam *et al.*, 1995). No subgrupo I estão incluídas as viroses transmitidas por cigarrinhas que geralmente infectam plantas monocotiledôneas e possuem um genoma monopartido. O subgrupo III inclui as viroses transmitidas por moscas brancas, infectando plantas dicotiledôneas e comumente apresenta genoma bipartido. As viroses do subgrupo II são transmitidas por cigarrinhas e têm o genoma monopartido como as do subgrupo I, mas infectam plantas dicotiledôneas como as do subgrupo III.

Um dos primeiros relatos de geminiviroses induzindo doenças em tomateiros no Brasil surgiram por volta de 1960, sendo esse vírus posteriormente caracterizado como TGMV (*Tomato Golden Mosaic Vírus*). Na mesma época várias outras viroses foram também identificadas e caracterizadas na América Central, Europa e sul dos Estados Unidos, mais precisamente na Flórida. A partir dessa época, a cultura de tomate passou a sofrer modificações relacionadas à produtividade e susceptibilidade pela

alta incidência de geminivírus. Atualmente as geminiviroses tem se destacado por ser um fator limitante na produção de tomate. Na década de 90 esse patógeno tornou-se um alvo de estudo, pois sua incidência aumentou drasticamente nos países do hemisfério oeste (Flórida, Panamá, República Dominicana, Porto Rico, Guatemala, Brasil e outros). No entanto, pouco se sabe sobre a gama de hospedeiros da maioria dessas geminiviroses surgidas nesse hemisfério (Polston & Anderson, 1997).

No Brasil foi registrado recentemente geminiviroses causando danos em tomateiros nos Estados da Bahia, Minas Gerais, Distrito Federal, Rio de Janeiro, São Paulo e Pernambuco (Ribeiro *et al.*, 1994; Zerbini *et al.*, 1996).

Em Minas Gerais, a ocorrência de geminivírus em tomateiro foi registrada em Belo Horizonte e Triângulo Mineiro (Zerbini *et al.*, 1996; Filgueira *et al.*, 1996; Lima *et al.*, 2000), em ambos os casos estimando-se perdas superiores a 50% na produção.

Com o aumento da incidência de geminivírus na cultura do tomateiro e o fenômeno de especiação de novas geminiviroses que incidem sobre não somente nesta cultura, mas em outras de importância econômica no Brasil, ou pela evolução e surgimento de novos geminivírus ou pela introdução de um vírus já descrito em outras regiões pela migração do inseto vetor, a incidência dessas viroses, principalmente as transmitidas por moscas brancas torna-se uma grande ameaça ao cultivo de hortaliças.

Com o advento da biologia molecular juntamente com os programas de melhoramento faz se necessário realizar estudos moleculares e bioquímicos quanto a compreensão da organização estrutural desses patógenos, para sua possível manipulação e controle de sua propagação no hospedeiro.

Contudo, com o surgimento de novas geminiviroses no Estado de Minas Gerais, torna-se necessário realizar o monitoramento dessas viroses principalmente em culturas economicamente importantes, além de verificar a variabilidade de vírus, a nível molecular, em diferentes plantas. A região a

qual foi investigada corresponde ao município de Uberlândia, onde há condições ambientais favoráveis para o estabelecimento do inseto vetor e propagação do vírus, além de possuir a olericultura como uma das principais atividades econômica.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Realizar análise molecular de um novo isolado de geminivírus infectando plantas de tomate em casa de vegetação da Universidade Federal de Uberlândia.

Objetivos específicos

1. Realizar um estudo quantitativo das partículas virais presentes em variedades de tomate;
2. Analisar plantas infectadas com esse novo isolado por meio de primers degenerados via Reação em Cadeia da Polimerase;
3. Determinar a gama de hospedeiros para esse novo isolado;
4. Construção de um mapa genômico para posterior comparação com geminivirose presentes no Brasil.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. COMPOSIÇÃO GENÔMICA

Atualmente as geminiviroses estão entre os mais importantes grupos de patógenos de diversas plantas, os quais encontram-se amplamente distribuídos pelas regiões tropical e subtropical, e infectando as principais culturas básicas, como mandioca, feijão e milho. Essas viroses são os únicos agentes infecciosos caracterizados por possuírem capsídeos com morfologia icosaédrica geminadas (Lazarowitz, 1992; Timmermans, 1994). Essas partículas virais são formadas por icosaedros incompletos os quais são unidos aos pares, cada um composto por 11 capsômeros de proteínas pentaméricas de 28 a 34 kDa em diferentes viroses deste grupo, sendo, 22 subunidades por vírion (Harrison, 1985). A partícula geminada tem um diâmetro de 18 x 30 nm e um peso molecular de cerca de 4×10^6 daltons. Ela contém 2 moléculas de DNA fita simples de 0.7 a 0.8×10^6 daltons que são somente infecciosas.

O genoma dessas geminiviroses é composto por um (A) ou dois (A e B) componentes na forma de DNA circular, fita simples, cujo tamanho varia entre 2.6 a 3.0 Kb distribuídos no máximo em 6 regiões abertas de leituras-ORFs (Goodman, 1977; Lazarowitz, 1992).

De acordo com o inseto-vetor, tipo de hospedeiros e organização do genoma viral, as geminiviroses encontram-se classificadas em três Subgrupos (Padidam *et al*, 1995).

O Subgrupo I, pertencente ao gênero *Mastrevirus*, inclui as geminiviroses infectando monocotiledôneas, as quais são transmitidas por cigarrinhas e possuem um genoma monopartido (componente A) com 4 ORFs, cujo membro típico representativo deste grupo é o MSV (*Maize Streak Virus*). O Subgrupo III, do gênero *Begomovirus*, inclui a maioria das geminiviroses infectando dicotiledôneas, as quais são transmitidas por moscas brancas e possuem um genoma bipartido (componentes A e B) cujo

membro típico deste grupo é o BGMV (*Bean Golden Mosaic Virus*). O Subgrupo II (*Curtovirus*) intermediário está representado pelas geminivíroses monopartidas com 6 ORFs em uma organização semelhante ao componente A dos membros do subgrupo III, infectam plantas dicotiledôneas e são transmitidas por cigarrinhas, e o BCTV (*Beet Curly Top Virus*) é o membro típico.

3.1.1. Geminivíroses bipartidas do Subgrupo III

O TGMV foi uma das primeiras geminivíroses transmitidas por moscas brancas a ser caracterizado molecularmente, estabelecendo que essas víroses são bipartidas, composta por dois componentes genômicos, designados de A e B, de aproximadamente 2,6 Kb cada e ambos são requeridos para gerar uma infecção sistêmica (Hamilton *et al.*, 1983).

Transformação mediada por *Agrobacterium* e experimentos com plantas transgênicas contendo cópias do DNA A do TGMV demonstraram que esse componente codifica todas as funções virais necessárias para a replicação e encapsidação do DNA viral (Rogers *et al.*, 1986; Sunter *et al.*, 1987). O componente B não pode replicar na ausência do componente A, mas determina as funções requeridas para o movimento sistêmico e sintomatologia do vírus na planta infectada (Brough *et al.*, 1988). Todas as geminivíroses bipartidas que foram sequenciadas são idênticas em sua organização genômica, cujos componentes genômicos contém um total de 6 genes que diferem completamente em sua sequência, exceto em uma região intergênica de aproximadamente 200 nucleotídeos denominada de região comum (Howarth *et al.*, 1985; Lazarowitz & Lazdins, 1991), como demonstrado na Figura 1. A região comum está localizada na extremidade 5' da região intergênica em ambos os componentes de DNA, incluindo os sinais de transcrição (Sunter *et al.*, 1989) e replicação (Revington *et al.*, 1989).

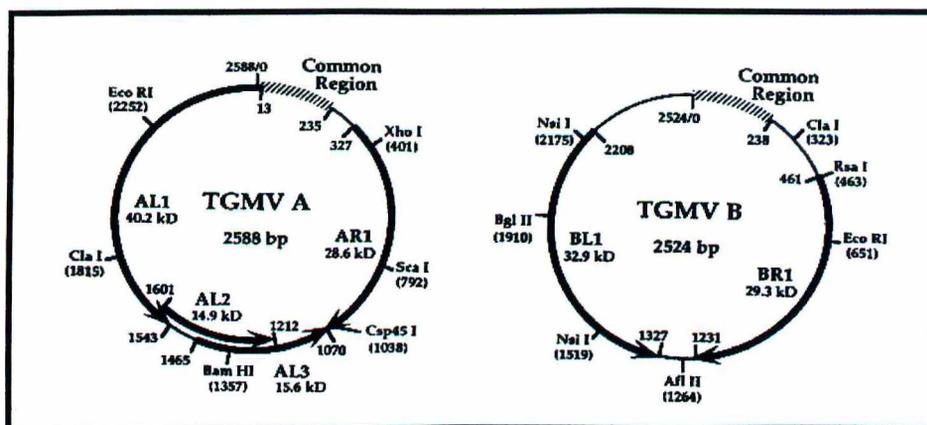


Figura 1. Mapa demonstrativo dos componentes genômicos A e B do TGMV. Os dois círculos representam a forma replicativa do DNA de fita dupla. A região comum está indicada na caixa achurada e as setas definem as posições das ORFs com a massa molecular de cada proteína. As posições dos sítios de restrição estão indicados fora do círculo.

O componente A contém quatro ORFs (AL1, AL2, AL3 e AL4) na fita complementar e uma ORF (AR1) na fita vírion. O componente B codifica dois genes, um na fita complementar (BL1) e outro (BR1) na fita vírion. A ORF AL1 é um gene essencial para a replicação do DNA, sendo requerida para a replicação do componente A e em *trans* para a replicação do componente B (Elmer *et al.*, 1988a; Etessami *et al.*, 1991). A ORF AL3, embora não essencial, aumenta a eficiência da replicação do DNA viral (Sunter *et al.*, 1990). A AR1 codifica as subunidades do capsídeo, denominada de proteína da capa. A AL2 está envolvida na transativação transcricional da expressão da AR1 e da BR1 (Sunter & Bisaro, 1991), e dois genes envolvidos na replicação do DNA viral, AL1 e AL3. Mutações nos genes AL1, AL2, BR1 e BL1 bloqueiam a infectividade (Elmer *et al.*, 1988b). Quanto a AL4, esta regula fracamente o promotor da AL1, mas sua função ainda não é muito bem esclarecida durante a infecção.

3.1.2. Geminiviruses monopartidas do Subgrupo II

As geminiviruses pertencentes a este Subgrupo consistem de um único componente genômico. Nessas viroses, a organização dos genes

complementares (C1, C2, C3 e C4) são idênticos aos do componente A presentes nas geminivirose bipartidas. Estudos genéticos demonstraram que as proteínas C3 e Rep do *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* (TYLCV) atuam durante a infecção (Stanley *et al.*, 1992).

Análoga as geminivirose bipartidas, a proteína Rep é essencial para a replicação e a proteína C3 aumenta o acúmulo de DNA viral. Como a proteína AL2, a proteína C2 foi requerida para infectividade do TYLCV, mas ainda não é conhecido se esta proteína atua como um transativador da expressão gênica viral (Wartig *et al.*, 1997). Porém, estudos baseados em mutação nessa proteína sugerem que essa ORF é dispensável para as geminivirose deste subgrupo (Stanley *et al.*; 1992).

A fita vírion dessas geminivirose são mais complexas quando comparadas com as geminivirose bipartidas, apresentando duas regiões codificadoras sobrepostas (V1 e V2). Mutações no gene V1 e no gene da proteína da capa V2 do TYLCV não têm efeito na replicação, mas bloqueiam a infectividade, muitas das vezes inibindo o movimento viral (Rigden *et al.*, 1993).

3.1.3. Geminivirose monopartidas do Subgrupo I

As geminivirose desse Subgrupo apresentam uma única organização (Donson *et al.*, 1987). A fita complementar codifica duas ORFs (C1 e C2) sendo que mutações nesses genes mostraram incapacidade de replicação indicando que ambos genes são requeridos para a replicação viral (Schalk *et al.*, 1989).

Por outro lado, essas geminivirose apresentam também duas ORFs (V1 e V2) na fita vírion. O gene V2 codifica a proteína da capa, a qual em combinação com a V1 mediam o movimento viral (Morris-Krisinich *et al.*, 1985). Mutações em ambas ORFs bloqueiam a infectividade e reduzem o acúmulo de DNA de fita simples (Lazarowitz *et al.*, 1989; Woolston *et al.*, 1989). Há também evidências que todas as ORFs existentes nas geminivirose

pertencentes a esse Subgrupo afetam a gama de hospedeiros e sintomatologia (Boulton *et al.*, 1991).

3.2. REPLICAÇÃO

A replicação do genoma das geminiviruses está confinada no núcleo das células onde há o acúmulo de partículas virais (Lazarowitz, 1992). As partículas virais presentes nessas células levam a uma desestruturação, e conseqüentemente à morte celular. Essas mudanças no aspecto celular refletem na dependência desses vírus da maquinaria de replicação das células vegetais.

Exames de DNA viral de plantas infectadas com geminivírus detectaram moléculas de DNA de fita dupla e circular, as quais são encontradas sob duas formas, uma forma superhelicoidal e outra forma relaxada (Czosnek *et al.*, 1989). Essas moléculas de DNA de fita dupla são consideradas intermediárias para a replicação viral, sugerindo que a replicação das geminiviruses seguem um mecanismo círculo-rolante, similar ao usado pelos fagos de DNA de fita simples como ϕ X 174 e os plasmídios PT 181 e PC 124.

Estudos das formas de DNA viral presentes em plantas infectadas com TGMV e BGMV estabeleceram que o genoma de DNA fita simples viral replica via um DNA de fita dupla intermediário (Ikegami *et al.*, 1981; Hamilton *et al.*, 1982).

O mecanismo de replicação via círculo-rolante consiste num processo que envolve duas fases. Na primeira fase, o DNA de fita simples positivo é utilizado como molde para a síntese da fita negativa gerando um DNA de fita dupla, denominada de forma replicativa (RF). Na segunda fase, a RF serve como molde para a síntese da fita positiva gerando DNA de fita simples (Kornberg & Baker, 1992). Em geminivírus, a fita positiva corresponde a fita do vírion encontrada em ambos DNA de fita simples e de

fita dupla, sendo a fita negativa correspondente a fita complementar encontrada somente em DNA de fita dupla.

As proteínas AL1 e AL3 estão envolvidas no mecanismo de replicação do genoma viral, embora a proteína AL1 seja a única essencial para a replicação nos geminivírus (Elmer *et al.*, 1988). No TGMV e BGMV, a AL1 interage especificamente com suas respectivas origens de replicação da fita senso e são responsáveis pelo reconhecimento da origem (Fontes *et al.*, 1994), além de funcionar como regulador transcricional (Eagle *et al.*, 1994) e interferir no ciclo celular do hospedeiro (Nagar *et al.*, 1995).

Três atividades bioquímicas estão associadas à proteína de replicação. A proteína AL1 apresenta uma atividade de ligação ao DNA, com a capacidade de se ligar ao DNA de fita simples e ao DNA de fita dupla. A ligação da AL1 ao DNA de fita dupla é dependente de sequências, possibilitando o reconhecimento da origem de replicação e repressão transcricional (Eagle *et al.*, 1994). Além disso, ela catalisa a clivagem e ligação do DNA sítio-específica, atividade diretamente envolvida na iniciação e terminação da síntese da fita senso e promover a hidrólise de ATP (Laufs *et al.*, 1995).

De acordo com o mecanismo círculo-rolante, o genoma dos geminivírus possui duas origens de replicação, uma para a fita senso e a outra para a fita complementar. No TGMV, geminivírus pertencente ao Subgrupo III, a origem de replicação para a fita senso é formada por uma sequência de 89 pares de bases, localizada na extremidade 5' da região intergênica ou região comum dos dois componentes (Fontes *et al.*, 1992). Esta sequência apresenta-se limitada por dois domínios funcionais sendo uma estrutura em grampo requerida para a replicação e a outra um sítio de ligação específico para a proteína AL1 que se sobrepõe ao promotor da fita senso-complementar (Revington *et al.*, 1989; Orozco & Hanley-Bowdoin, 1996).

O sítio de ligação da proteína AL1 do TGMV é formado por um elemento de 13 pares de bases, o qual contém duas sequências repetidas de 5

pares de bases com dois nucleotídeos conservados GC que são essenciais para o funcionamento da origem (Fontes *et al.*, 1994). Este sítio, no qual a AL1 se liga com alta afinidade, encontra-se entre a sequência TATA e o sítio de iniciação da transcrição do gene AL1, agindo também como elemento regulatório do promotor da AL1 (Eagle *et al.*, 1994). A estrutura em forma de grampo contém o sítio de clivagem para a iniciação da fita senso, sendo formada por uma sequência de fita dupla rica em GC e uma alça rica em AT (Laufs *et al.*, 1995; Orozco & Hanley-Bowdoin, 1996). Esses dois domínios são elementos essenciais para a replicação (Revington *et al.*, 1989).

3.3. TRANSMISSÃO

Os membros pertencentes a família Geminiviridae infectam uma ampla diversidade de hospedeiros incluindo plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas. Essas viroses, muitas das vezes, apresentam-se restritas ao floema, porém, em algumas geminivirose a capacidade de infecção está presente nas células da epiderme, dificultando ou impossibilitando sua transmissão mecanicamente. No entanto, nas geminivirose pertencentes aos Subgrupos I e II não ocorre transmissão mecânica, mas há a possibilidade de ocorrência em alguns grupos do Subgrupo III.

Ainda não está muito bem esclarecido o fator que determina a especificidade entre os geminivírus e seus vetores, porém há indícios para o gene da capa protéica, a única proteína estrutural presente nas geminivirose. Experimentos realizados com vírus quiméricos, onde o gene da capa protéica de dois geminivírus foram trocados, sendo um transmitido por mosca branca e o outro por cigarrinha, também demonstraram a importância do capsídeo na transmissão das geminivirose na mudança de especificidade do inseto vetor (Briddon *et al.*, 1990).

Nas geminivirose pertencentes ao Subgrupo III, o qual é composto por aproximadamente 60 vírus, a transmissão é realizada por um

complexo de espécies de *Bemisia tabaci* (Bedford *et al.*, 1994). As geminivíroses pertencentes aos Subgrupos I e II, os quais apresentam-se em menor quantidade de vírus, a transmissão é realizada por insetos pertencentes à família Cicadellidae, incluindo uma diversidade de espécies vetoras. Cada vírus é transmitido por uma espécie de inseto vetor que, na maioria das vezes, pertencem a gêneros diferentes (Briddon *et al.*, 1996).

A mosca branca (*Bemisia* sp) é um inseto da ordem Homoptera, muito pequeno, cujo tamanho aproximado das fêmeas é de 0,9mm e dos machos de 0,8mm. Em sua fase adulta, possui dois pares de asas membranosas, podendo voar a curtas e longas distâncias. Sob condições climáticas favoráveis, principalmente com temperaturas em torno de 25^o C, o ciclo de vida da mosca branca varia de três a quatro semanas. Esses insetos permanecem na parte inferior das folhas, onde depositam seus ovos. Dependendo da planta hospedeira, uma fêmea pode colocar de 30 a 400 ovos, durante seu tempo de vida, com uma média de 150 ovos. Os ovos levam de cinco a sete dias para eclodirem, dependendo da planta hospedeira e da temperatura. Segue-se então a fase de ninfa, com duração de aproximadamente duas semanas.

Os adultos podem ser encontrados numa distância de até 7Km da planta hospedeira e no máximo a 300 metros de altura. Voam geralmente no período mais fresco do dia e à noite, na busca de plantas hospedeiras. A mosca branca pode causar danos às culturas agrícolas tanto na fase adulta como na de ninfa (Ferreira *et al.*, 1997).

A transmissão do vírus para o hospedeiro envolve a passagem de partículas virais do intestino para a hemolinfa do inseto, da hemolinfa para as glândulas salivares e da saliva para outras plantas. Não há evidência de replicação viral no inseto vetor, de forma que a eficiência de transmissão está relacionada à concentração do vírus na planta e a duração do período de aquisição (Timmermans *et al.*, 1994).

Embora uma única mosca branca virulífera possa transmitir o vírus, a razão de transmissão aumenta com a população do vírus. Um

mínimo de 10 a 20 insetos por planta são requeridos para 100% de transmissão. O período mínimo de aquisição varia de 15 a 60 minutos, porém, quanto maior esse período, maior a razão de transmissão. O período latente varia de 17 a 24 horas e após esse período a eficiência de inoculação torna-se maior. O DNA viral encontra-se no inseto vetor uma hora após o início de aquisição. Sua concentração aumenta com o tempo, e após um período de aquisição de 48 horas, o DNA viral é retido por mais de três semanas (Picó *et al.*, 1996).

O inseto vetor atua como praga nas culturas agrícolas, por se alimentar da seiva das plantas, podendo levá-las à morte ou à diminuição da produção. Além disso, elimina uma excreção açucarada que induz o aparecimento de fungos, provocando o apodrecimento de ramos, folhas, flores e frutos. Esses danos comprometem a aparência, prejudicando a comercialização dos produtos, principalmente de frutas para exportação e de plantas ornamentais; além de ser vetor de vírus bastante prejudiciais, como o geminivírus e, por isso, as perdas ocasionadas por essa praga chegam a 100% em diversas culturas de frutas e hortaliças (França *et al.*, 1996).

Os problemas que causam à agricultura como praga e vetor de vírus já vem sendo descritos há mais de cem anos. Em 1992, observou-se um grande crescimento populacional da praga no Estado de São Paulo, provavelmente introduzida da Europa ou Estados Unidos pela importação de plantas ornamentais. Essa praga foi considerada como um novo biótipo da mosca branca no país.

Dentre os hospedeiros atacados pela mosca branca estão: feijão, algodão, abobrinha, melão, chuchu, mandioca, repolho, jiló, tomate, pimentão, berinjela, pepino, videira, brócolis, repolho, alface, quiabo, plantas daninhas como picão, joá-de-capote, amendoim bravo e *Datura*, e ornamentais, destacando-se o crisântemo e poinsettia.

Estima-se que os prejuízos causados por essa praga à agricultura brasileira, somados aos gastos com produtos químicos utilizados no seu controle, já estão próximos de meio bilhão de dólares, sem levar em conta os

impactos sociais como o desemprego no campo e o conseqüente êxodo rural que ela provoca (Ferreira et al., 1997).

3.4. MOVIMENTO SISTÊMICO

Após um vírus de planta ter acesso ao interior de uma célula, o qual se dá através de um ferimento ou através do processo de alimentação de um vetor, ele deve ser capaz de realizar pelo menos duas funções básicas para estabelecer uma infecção sistêmica como replicar e mover-se. Sendo assim, o movimento sistêmico geralmente envolve dois tipos de movimento: o primeiro é o movimento célula a célula na qual o vírus move das células inicialmente infectadas até às adjacentes através do plasmodesmata. No segundo movimento as viroses movem a longas distâncias, no qual o vírus uma vez instalado no sistema vascular é transportado para partes distantes do ponto de infecção na planta hospedeira. Baseado nas evidências genéticas pôde-se demonstrar que o movimento das viroses nas células infectadas para as células sadias e provavelmente dentro do sistema vascular, chegando-se a uma infecção sistêmica, é mediada pelas proteínas codificadas pelo vírus, as quais são essenciais para a infecção e não para a replicação e encapsidação do vírus (Hull, 1989).

Através de estudos moleculares há indícios de que algumas proteínas de movimento podem se ligar a ácidos nucléicos (Citovsky *et al.*, 1990), localizada na parede celular e membrana plasmática (Tomenius *et al.*, 1987), e aumentar o tamanho dos poros plasmodesmal nas paredes entre as células adjacentes (Wolf *et al.*, 1989).

Nas geminivirozes bipartidas, três genes foram identificados como necessários para o movimento viral, o gene AL2 presente no componente A e os genes BR1 e BL1 que estão no componente B (Brough *et al.*, 1988; Elmer *et al.*, 1988). Mutações em cada um desses genes individualmente apresentaram o mesmo fenótipo, não afetando a replicação do DNA viral.

Análise das funções do gene AL2 em plantas transgênicas e em protoplastos sugerem que a proteína codificada por esse gene é uma proteína transativadora da expressão do gene da proteína da capa, AR1, além de estar diretamente relacionada com a transcrição do RNAm dessa proteína e transativar o gene BR1 presente no componente B (Sunter & Bisaro, 1991). No entanto, a retirada do gene da proteína da capa do TGMV não eliminou o movimento sistêmico e a infectividade, enquanto que a eliminação da AL2 resultou na perda dessas propriedades (Gardiner *et al.*, 1988).

Estudos realizados com *N. benthamiana* mostraram que o gene da proteína da capa dessas viroses, embora importante para a transmissão, não mostrou ser essencial para o movimento sistêmico e desenvolvimento da doença nas plantas (Gardiner *et al.*, 1988; Brough *et al.*, 1988). Na ausência desse gene, o nível de DNA de fita simples é muito reduzido, podendo ser esta forma de DNA que move nas plantas.

Análise da importância de cada um dos dois genes presentes no componente B para o movimento sistêmico no TGMV e ACMV foram realizadas através de mutações, onde inserções ou deleções em cada um desses genes não apresentaram afetar os níveis de DNA de fita simples ou DNA de fita dupla viral replicadas, detectadas em plantas de *Nicotiana benthamiana* co-inoculadas com o componente B mutado e o componente A normal, mas tiveram a capacidade de eliminar a doença sistêmica e infectividade viral (Brough *et al.*, 1988).

Recentes modelos sugerem que as proteínas de movimento atuam como chaperonas apresentando a capacidade de se ligarem a ácidos nucléicos e direcionar o transporte célula a célula. Noueir *et al.* (1994) sugeriram que a BL1 e a BR1 apresentam funções distintas, porém, atuando de maneira coordenada para facilitar o movimento do genoma viral.

A BL1 localiza-se na parede celular e membrana plasmática, facilitando o movimento do vírus a longa distância, mas tem a capacidade de afetar seu próprio movimento através do plasmodesmata, mediando no movimento do DNA de fita dupla, além das propriedades patogênicas virais.

A BR1 é uma proteína que se liga ao DNA de fita simples encontrada no núcleo das células e que funciona no movimento célula a célula, potencializando a exportação do DNA de fita simples e de fita dupla através do envelope nuclear para o citoplasma (Pascal *et al.*, 1994; Noueiry *et al.*, 1994).

Pascal e colaboradores (1994) propuseram a hipótese de que a BR1 é uma *nuclear shuttle protein* responsável por mover o DNA de fita simples viral replicado de dentro para fora e de fora para dentro do núcleo, na forma de um complexo o qual é reconhecido pela proteína BL1. A interação entre as proteínas de movimento direciona esse complexo para a membrana plasmática e para a parede celular e daí para as células do floema adjacentes não infectadas.

3.5. SINTOMATOLOGIA

A sintomatologia observada em tomateiros infectados por geminivírus assemelham-se aqueles induzidos por outras viroses, especialmente aquelas de potivírus e tobamovírus. O tipo e a severidade dos sintomas variam de acordo com o vírus e a linhagem de isolados, a genética do hospedeiro, as condições ambientais, estágio de crescimento e condições fisiológicas da planta no tempo de infecção.

Os sintomas podem incluir as várias combinações seguintes: mosaico amarelo brilhante, clorose nas folhas e margens foliares, enrolamento foliar, distorção e enrugamento das folhas, redução do tamanho foliar, atrofia das plantas infectadas e abscisão das flores.

Em TGMV, os primeiros sintomas aparecem, sob condições de campo, aos 14 a 17 dias após o plantio, em presença de altos números de moscas brancas virulíferas. Os sintomas mais nítidos, todavia, aparecem quando as plantas apresentam de três a quatro folhas trifoliadas, o que corresponde de 25 a 30 dias. Trata-se de um tipo de mosaico dourado brilhante, dando ao tomateiro uma aparência amarelada, intensa e

generalizada. As folhas mais jovens podem apresentar-se ligeiramente enroladas ou ter rugosidade bem definida (Galvez & Cardenas, 1980; Muniyappa, 1980).

Plantas infectadas precocemente e jovens são improdutivas devido a queda das flores. Então, a redução na produtividade é maior quando as plantas são infectadas em estádios precoces de desenvolvimento. Infecção em estádios de crescimento tardio drasticamente reduz a produção de novos frutos. As plantas infectadas produzem geralmente poucos frutos e pequenos que usualmente caem (Ioannou, 1985).

O maior impacto econômico em qualidade e produtividade fazem desse patógeno um sério problema em áreas afetadas e uma ameaça em regiões onde o cultivo de tomate está sendo expandido. A incidência, severidade e propagação da doença tem variações sazonais significativamente correlacionadas com flutuações na população do vetor (Cohen *et al.*, 1988), além de que períodos de altas temperaturas e baixa umidade relativa favorecem o desenvolvimento do vetor.

3.6. GAMA DE HOSPEDEIROS

Dentre os fatores determinantes da gama de hospedeiro viral estão a habilidade do vírus em replicar e conseqüentemente sua propagação no hospedeiro conhecido. Devido as viroses possuírem pouca quantidade de informação genética, sua replicação depende dos processos metabólicos e regulatórios da planta. Em geral, seu ciclo de vida consiste de duas fases: (a) replicação dentro da célula vegetal e subseqüente propagação da infecção para a planta, e (b) a fase de vírion onde o vírus é transmitido de uma planta para outra, através de um vetor. Mutações que afetam a gama de hospedeiros para viroses em plantas têm sido isoladas para ambas funções e em muitos casos essas mutações estão presentes nos genes que codificam para as proteínas do movimento viral (Dawson & Hilf, 1992).

Os geminivírus infectam coletivamente uma grande variedade de vegetais (Brown & Bird, 1992). Os geminivírus pertencentes ao subgrupo I (*Mastrevirus*) apresentam uma relação restrita de hospedeiros, ocorrendo principalmente em gramíneas. Os vírus pertencentes ao subgrupo III (*Begomovirus*) apresentam também uma gama de hospedeiros restrita, porém infectando somente dicotiledôneas; os do subgrupo II (*Curtovirus*) infectam dicotiledôneas com uma grande e diversificada relação de hospedeiros (Rybicki, 1994).

Ingham e Lazarowitz (1993) analisando as interações entre os geminivírus bipartidos e seus hospedeiros demonstraram que as proteínas BL1 e BR1 podem influenciar na diversidade de hospedeiros virais. Porém, diversos mutantes nessas proteínas no vírus SqLCV foram incapazes de infectar *Nicotiana benthamiana*, embora retiveram infectividade em cucurbitáceas.

Em BGMV e TGMV, Petty e colaboradores (1995) investigaram a contribuição das proteínas BL1 e BR1 na especificidade fenotípica, relacionada com o hospedeiro via mecanismo de vírus híbridos. O TGMV contendo as proteínas BL1 e BR1 do BGMV apresentou a capacidade de infectar novas espécies de plantas, além de seus hospedeiros habituais, mas tanto os híbridos do TGMV quanto do BGMV exibiram fenótipos atenuados nas espécies para os quais são fracamente adaptados. Em experimentos com inoculações mistas, o BGMV não foi capaz de complementar o processo de adaptação do TGMV em feijão, enquanto que o TGMV foi eficiente na complementação do fenótipo do BGMV referente ao baixo acúmulo de DNA em *N. benthamiana*. Estas observações indicam que as funções virais de ambos componentes A e B contribuem para a adaptação ao hospedeiro nas geminiviroses bipartidas.

Apesar da proteína da capa protéica apresentar-se não essencial para o estabelecimento da infecção das geminiviroses bipartidas, tem sido demonstrado que a infectividade sistêmica do BGMV e TGMV também

apresentam uma certa especificidade ao hospedeiro, dependente da capa protéica (Pooma *et al.*, 1996).

3.7. DIAGNOSES

3.7.1. Técnicas de PCR

A reação em cadeia da polimerase tem sido usada para detectar vírus em plantas e vetores. Como as geminiviruses replicam via um DNA de fita dupla intermediário, as técnicas de PCR são adequadas para diagnóstico neste grupo (Rojas *et al.*, 1993). Este método é mais sensível que as técnicas de hibridação e não requer o uso de radioatividade. O uso de *primers* degenerados complementar às sequências altamente conservadas do genoma das geminiviruses transmitidas por mosca branca, estendem à gama de viroses detectadas. Isolados individuais podem ser distinguidos pelo polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) obtidos após digestão dos produtos da PCR com enzimas de restrição. Este método também pode ser usado para a identificação de infecção mista com duas viroses (Deng *et al.*, 1994).

3.7.2. PCR-LIS-SSCP

O polimorfismo conformacional de fita simples foi primeiramente desenvolvido por Orita *et al.* (1989) como um eficiente método para detectar muitos tipos de aberrações, incluindo mutações de ponto, inserções, deleções, rearranjos, perda de genes e amplificações. Essa técnica envolve a separação de uma fita dupla de DNA mediante alta temperatura, em presença de uma solução alcalina contendo formamida, num gel de poliacrilamida não desnaturante. Ela baseia-se na relação entre a mobilidade eletroforética do DNA de fita simples e sua conformação (ou estrutura secundária) a qual é dependente na sequência nucleotídica. Com isso,

diferentes substituições de base podem levar a diferentes estruturas secundárias devido a diferentes interações intramoleculares, possibilitando detectar raras diferenças entre um DNA mutado e um normal.

Como as mobilidades são diferentes para cada conformação existente em cada sequência e certas condições causam certas estabilidades, o SSCP comporta como marcadores codominantes. Na teoria, duas bandas estão associadas com a sequência normal, cada uma representando a fita simples do DNA. Caso não ocorra desnaturação completa, uma terceira banda pode aparecer de diferentes intensidade. Se a amostra é heterozigota para uma mutação, então, há geralmente duas bandas referentes à amostra normal e também outras duas bandas variadas representando a mutação (Figura 2). Porém, mais bandas podem ser representadas devido algumas fitas terem mais que uma conformação. Por essa razão, sugere-se aplicar uma amostra normal não desnaturada juntamente com as amostras a serem analisadas, pois há a possibilidade de ocorrência de um anelamento parcial.

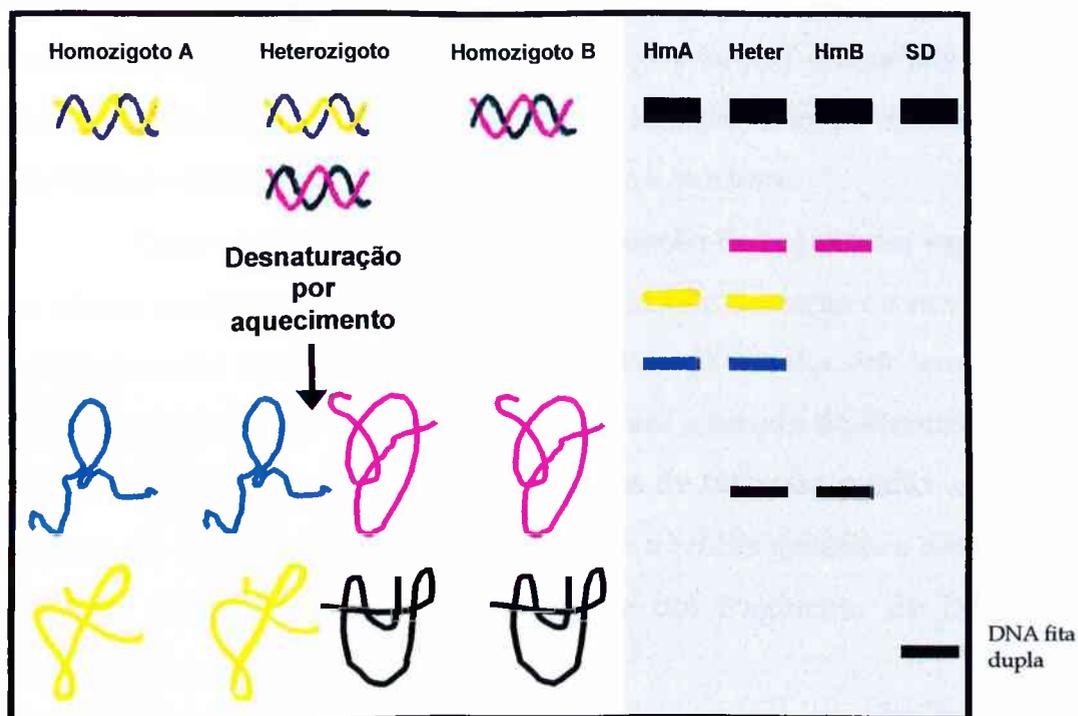


Figura 2. Esquema demonstrativo do princípio da análise do SSCP (Polimorfismo Conformacional de Fita Simples). As siglas Hm, Heter, e SD indicam Homozigoto, Heterozigoto e DNA sem desnaturação, respectivamente.

Hoshino e colaboradores (1992) modificaram a técnica para PCR-SSCP passando a utilizar segmentos específicos obtidos via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do complexo de histocompatibilidade, possibilitando a tipagem alélica e uma melhor visualização do padrão de bandas em gel de poliacrilamida, no entanto, várias bandas para um único alelo foram detectadas. Bannai e colegas em 1994 reduziram a proporção de DNA amplificado e observaram somente duas bandas por alelo, correspondentes às fitas *sense* e *antisense*.

Algumas instabilidades na conformação de algumas sequências, foram observadas serem ocasionadas pela presença da solução desnaturante de formamida, tornando as pontes de hidrogênio entre a adenina e a timina instáveis após desnaturação. Maruya e colaboradores (1996) propuseram a substituição da solução alcalina de formamida para uma de baixa força iônica (LIS), à base de sacarose, não necessitando de reagentes desnaturantes e resfriamento. A esse método denominaram de Polimorfismo Conformacional de Fita Simples em Baixa Força Iônica ou PCR-LIS-SSCP. A estabilidade das fitas simples de DNA pela LIS é garantida pelo declínio da temperatura de dissociação sob baixas condições iônicas e uma alta diluição entre o DNA amplificado e o tampão LIS, resultando numa menor possibilidade de hibridação entre as fitas *sense* e *antisense*.

Com a utilização da PCR para obtenção de sequências específicas, essa última modificação na metodologia permitiu a detecção de novos alelos do complexo de histocompatibilidade e o uso da técnica em temperatura ambiente. Além disso, vem sendo utilizada para o estudo da identificação de polimorfismo em diferentes microorganismos de interesse médico-sanitário, produção de mapas genéticos, diagnóstico de doenças genéticas, detecção de pontos de mutação em várias posições de um fragmento de DNA e a estimativa de variabilidade genética .

3.7.3. SONDAS DE DNA NÃO RADIOATIVAS

A reação em cadeia da polimerase é um rápido e poderoso método para amplificação de sequências de ácidos nucleicos. Essa técnica utiliza para a amplificação poucas quantidades de DNA de uma variedades de fontes, facilitando a sua detecção. Atualmente tem sido investigada como um método conveniente e eficiente para a síntese de sondas de DNA para pesquisas em biologia molecular.

As sondas de DNA não radioativas usadas para a detecção de sequências específicas de DNA em membranas oferecem muitas vantagens sobre os métodos que utilizam marcação com radioisótopos. Destacam-se a redução significativa no tempo de exposição para detecção do sinal de hibridação, menor custo de materiais, maior estabilidade e sensibilidade equivalente ou superior. Além disso, há a eliminação da necessidade de licenciamento, controle de material e cuidados necessários associados com o uso de material radioativo (Karcher, 1994). Problemas com altos sinais de *background* causados pela ligação não específica da enzima conjugada à membrana, requerimento de várias lavagens e dificuldade na reprodutibilidade dos resultados são os obstáculos para a utilização da técnica (Sonnenberg *et al.*, 1992; Mackey *et al.*, 1992).

O processo de marcação de uma sonda se dá basicamente pela incorporação de um nucleotídeo marcado não radioativamente e como a biotina contém nucleotídeo análogo, é facilmente incorporado à molécula de DNA (Figura 3).

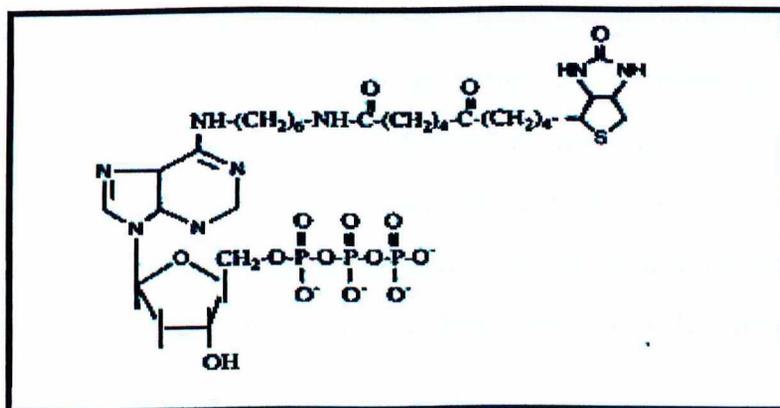


Figura 3. Estrutura da biotina-14-dATP a qual pode ser incorporada na molécula de DNA.

Em muitos sistemas de detecção não radioativa utiliza-se de sondas biotinizadas sintetizadas por *random primer* e *nick translation*, sendo a Taq DNA polimerase e o fragmento *Klenow* bastante eficientes na incorporação de nucleotídeo biotilado (Mertz *et al.*, 1994b). Na PCR também há uma eficiente incorporação de biotina-14-dATP pela Taq DNA polimerase, sendo esse produto amplificado utilizado como sonda de DNA. Rashtchian *et al.* (1992) testaram várias concentrações de biotina quanto à incorporação pela Taq DNA polimerase na PCR e observaram que houve amplificação eficiente quando as concentrações foram inferiores a 75% do total de deoxiadenosina trifosfato (dATP), sendo que nenhuma amplificação foi observada com 100% de biotina-14-dATP. Mertz *et al.* (1994) também observaram que quanto maior a concentração de biotina-14-dCTP maior o sinal quimioluminescente (12,5% a 87,5% do total de dCTP).

A detecção de DNA pode ser realizada diretamente pela PCR ou por técnicas de hibridação envolvendo técnicas radioativas ou não radioativas. O método comumente mais utilizado para detecção é a técnica de hibridação por dot-blot, a qual envolve a aplicação direta do ácido nucléico em uma membrana de nitrocelulose ou de *nylon*, sobre um suporte sólido. Uma vez imobilizado na membrana, o DNA ou RNA pode se ligar rapidamente a uma sequência alvo. O método pode produzir resultados qualitativos como quantitativos, atuando sobre ácidos nucléicos purificados ou preparação não purificada (Pepin *et al.*, 1990). No caso da utilização de extratos não purificados, as técnicas sorológicas são menos sensíveis que as técnicas de hibridação para detecção de vírus, provavelmente porque os componentes desses extratos podem interferir na técnica. A técnica ELISA é muito utilizada para detecção de vírus como *Barley Yellow Dwarf Virus* (BYDVs), mas a PCR e a hibridação de ácidos nucléicos tem mostrado maior sensibilidade e capacidade de distinguir diferentes raças de vírus (Figueira, 1997).

Após hibridação, a sonda biotinizada pode ser detectada por ligação específica do conjugado estreptavidina-fosfatase alcalina. Os sistemas

horseradish peroxidase, digoxigenina-anti-digoxigenina e biotina-estreptavidina podem ser detectados com o uso de substratos cromogênicos ou quimioluminescentes (Karcher, 1994; Carlson *et al.*, 1990). Um sistema cromogênico usado para a fosfatase alcalina é o BCIP e o NBT, em que a ação da enzima resulta numa coloração insolúvel sobre a membrana. A quimioluminescência se refere à emissão de luz como resultado da transição de uma molécula do estado excitado para um estado de baixa energia através de uma reação química com a molécula (Karcher, 1994). Este sistema é capaz de detectar quantidades muito pequenas da amostra, menos de 1 pg de vírus purificado e em torno de 25 ng de vírus em extratos infectados (Figueira, 1997).

A partir do momento em que os ácidos nucleicos estão imobilizados na membrana, o mais comum é acoplar uma enzima diretamente na sonda para hibridação. A enzima pode estar covalentemente ligada à sonda antes ou após a hibridação. A localização da sequência complementar hibridada é visualizada por incubação da membrana com um substrato, produzindo um sinal. Dentre os substratos quimioluminescentes destacam-se o CSPD e o PPD. O PPD é considerado um sistema potencialmente mais sensível. A remoção do grupo fosfato pela fosfatase alcalina desestabiliza o composto. Como o dioxetano é desfosforilado, ocorre a emissão de luz (Figura 4). A fosfatase alcalina covalentemente conjugada a estreptavidina (SA-AP) fica fortemente ligada à biotina, tendo assim, uma atividade de fosfatase, removendo o grupo fosfato do substrato e emitindo luz, que será detectada com filme fotográfico (Carlson *et al.*, 1990).

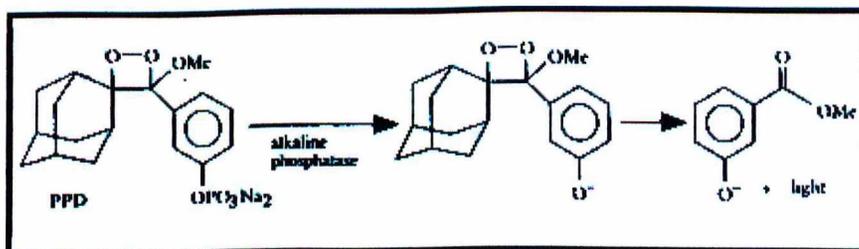


Figura 4. Defosforilação do substrato PPD pela fosfatase alcalina.

Para pesquisas na área de biologia molecular, onde pequenas quantidades de material são necessárias para serem analisadas, as técnicas de PCR e hibridação são provavelmente os melhores métodos para detecção e quantificação de vírus de planta (Figueira *et al.*, 1997).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material Biológico

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular e as espécies *Cucurbita pepo*, *Solanum melongena*, *Brassica oleraceae*, *Phaseolus vulgaris*, *S. gilo*, *Cyperus naturalis*, *Cucumis sativus*, *Lycopersicum esculentum* (cultivares Angela Hiper, Carmem, Jumbo, Empire e Santa Clara) foram mantidas em casas de vegetação do Departamento de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia. As amostras de *Capsicum annuum* foram coletadas na Escola Agrotécnica de Uberlândia e as de *Manihot utilissima* Pohl. na área experimental dessa Universidade (Tabela 1). As cultivares em casa de vegetação foram plantadas em um mesmo dia, sob as mesmas condições ambientais e tratamentos.

Tabela 1. Gama de hospedeiros experimental do novo isolado de geminivírus como determinado pela transmissão da mosca branca. Uberlândia, UFU. 2000.

Planta Testada	Nome Comum	Local de Coleta
Brassicaceae		
<i>Brassica oleraceae</i>	couve manteiga da Geórgia	Casa de vegetação
Cucurbitaceae		
<i>Cucumis sativus</i>	pepino caipira	Casa de vegetação
<i>Cucurbita pepo</i>	abóbora menina rajada	Casa de vegetação
Euphorbiaceae		
<i>Manihot utilissima</i> Pohl.	mandioca	Área Experimental
Fabaceae		
<i>Phaseolus vulgaris</i>	feijão-vagem	Casa de vegetação
<i>Phaseolus vulgaris</i>	feijão comum	Casa de vegetação
Solanaceae		
<i>Capsicum annuum</i>	pimentão cascadura IKEDA	Escola Agrotécnica
<i>Lycopersicum esculentum</i>	tomate	Casa de vegetação
<i>Solanum melongena</i>	berinjela comprida roxa	Casa de vegetação
<i>Solanum gilo</i>	jiló comprido verde claro	Casa de vegetação

4.2. Fonte de vírus, moscas brancas e plantas

O vírus foi obtido de um grupo de moscas brancas (*Bemisia* sp) infectadas, as quais estavam hospedando plantas de couve e de tomate em

casa de vegetação. Esses vetores foram transferidos para as cultivares, sem restrição do número específico de moscas a serem hospedadas em cada planta, para testes subsequentes da possível transmissão do vírus. As plantas usadas neste trabalho foram obtidas por meio de sementes, exceto para as plantas de mandioca, as quais foram obtidas por propagação vegetativa. A sintomatologia foi observada e a detecção do vírus e verificação da infecção viral das cultivares foram analisadas por técnicas de biologia molecular.

4.3. Extração de DNA

O DNA viral foi obtido juntamente com o DNA genômico das cultivares, as quais apresentavam sintomatologia de geminivirose, segundo metodologia descrita por Doyle & Doyle (1990), com modificações.

Duzentos miligramas de folhas jovens e frescas foram trituradas com nitrogênio líquido e rapidamente transferidos para microtubos gelados, onde se adicionou 700µl de tampão de lise (Tris-HCl 100mM, pH 8,0; EDTA 50mM, pH 8,0; NaCl 1M; 1,5% de CTAB; 1% de β-mercaptoetanol) pré-aquecido a 65°C, juntamente com 20µl de PVP a 10%. A suspensão foi incubada a 65°C por aproximadamente 90 minutos com agitação a cada 15 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas por duas vezes ao processo de desproteinização pela adição de mesmo volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) seguido de centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante obtido foi transferido para outro microtubo e os ácidos nucleicos precipitados pela adição de 2/3 do volume de isopropanol gelado e posteriormente estocados a -20°C por aproximadamente 12 horas. Após precipitação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos e o *pellet* formado foi lavado com etanol 70%. Retirado o álcool, o *pellet* foi deixado secar e ressuscitado em tampão TE (Tris-HCl 10mM, pH 8,0 e EDTA 1mM, pH 8,0) contendo RNase numa concentração de 10mg/ml e incubados a 37°C por 1 hora e armazenados a 4°C.

4.4. Quantificação do DNA

Uma alíquota de 5µl de cada amostra foi diluída para 1 ml de água deionizada para quantificação em espectrofotômetro por leitura de absorbância a 260 nm. A mesma quantidade foi submetida em eletroforese em gel de agarose 0,8% para qualificação do DNA para posterior diluição.

4.5. PCR

A PCR foi usada para amplificar os fragmentos correspondentes aos componentes A e B desse vírus, utilizando-se de *primers* degenerados descritos por ROJAS (1993), os quais foram adquiridos da empresa Gibco BRL (Life Technologies). A sequência desses primers estão listados na tabela 2.

Várias quantidades de DNA extraído foram testadas em cada reação de amplificação, a qual continha tampão Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 3,5 mM, dNTPs a 200 µM cada (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 7,5 pmoles de cada *primer*, 1 U de Taq DNA polimerase em um volume final de reação de 25µl. A cada reação foram adicionados 18µl de óleo mineral para evitar evaporação.

As reações foram amplificadas num termociclador MJ Research INC, modelo PTC-100, nas seguintes condições de temperatura e tempo, por 35 ciclos, sendo 95°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto; além disso, realizou-se um ciclo de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos e um ciclo de extensão final de 72°C por 5 minutos.

Após amplificação, foram adicionados 2 µl de tampão de carregamento (40% de sacarose, 0,25% de xileno cianol e 0,25% de azul de bromofenol) em 8 µl de cada reação e submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,2%, tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5X a uma voltagem de 80V por 1 hora. Os géis foram corados com brometo de etídio e os fragmentos

visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentados em VDS Imagesystem - Pharmacia.

Tabela 2. Sequência de primers degenerados utilizados para amplificar os componentes A e B de geminivírus como descrito por Rojas (1993).

Primer	Sequência 5'-3'	Componente
PAL1v1978	gcatctgcaggccacatygtcttccngt	A
PAR1c496	aatactgcagggcttyctracatrgg	A
PBLv2040	gcctctgcagcartgrtckatctcataca	B
PCRc1	ctagctgcagcatatttacrarwatgcca	B

4.6. Construção da sonda de DNA biotinilada

A sonda de DNA biotinilada específica para o componente B foi obtida via PCR, utilizando-se de *primers* degenerados descritos por ROJAS (1993).

Cada reação continha Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 3,5 mM, 1U de Taq DNA polimerase (CENBIOT/UFRS), 8 pmol de cada *primer*, 0,2mM de dCTP, dGTP e dTTP, 0,12 mM de dATP e 0,08 mM de biotina-14dATP, 3 µl de DNA e ajustado o volume final de reação para 25 µl. Após uma incubação inicial de 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 1 minuto por 94°C, 1 minuto a 50°C e 1 minuto a 72°C foram realizados. Uma incubação adicional de 5 minutos a 72°C foi usada para o ciclo final.

4.7. Teste da sonda biotinilada

Para comprovar a incorporação da biotina-14dATP, aplicou-se 1,5 µl de produto amplificado pela PCR em uma membrana de nylon (Nylon Membrane Charge Modified, SIGMA) e submetida a 80°C por 30 minutos para fixação da amostra. Após re-hidratação por 1 minuto em tampão 1 [ácido maléico 0,2M e NaCl 0,3 (pH 7,5)] e em tampão 2 (1% de reagente de *blocking* - Boehringer Mannheim em tampão 1) a 65°C por 1 hora, a

membrana foi incubada com a enzima conjugada SA-AP (2 ml de tampão 2 e 2 µl SA-AP) sob agitação durante 10 minutos. Retirado o anticorpo, lavou-se duas vezes com tampão 1 por 15 minutos e uma vez com tampão 3 [Tris 0,1M (pH 9,5), NaCl 0,1 M e MgCl₂ 0,05 M) por 10 minutos, ambas lavagens sob agitação. Decorrido esse tempo, a membrana foi incubada, no escuro, por cerca de 1 hora com o substrato cromogênico (3,75 ml de tampão 3; 16,5 µl de NBT e 12,5 µl de BCIP) e lavada em Tris-HCl 20 mM, EDTA 0,5 mM, pH 7,5, a fim de parar a reação e colocada para secar a 80°C por 2 minutos.

A eficiência da amplificação na presença de nucleotídeo biotilado também foi avaliado em gel de agarose 1,2% a 80V por 1 hora e uma reação controle foi realizada sem o nucleotídeo biotilado para posterior comparação do peso molecular.

4.8. Detecção de geminivírus por hibridação slot-blot

Numa membrana de nylon (Nylon Membrane Charge Modified, SIGMA) pré-lavada com 2X SSC, colocada sob um suporte sólido slot-blot (Hybri-Slot™ Manifold., LIFE TECHNOLOGIES, Inc.) acoplado a um aparelho de vácuo, foram aplicadas diluições das amostras de DNA para posterior quantificação.

O DNA foi fixado na membrana por 1 hora a 80°C e exposto em transiluminador UV por 2 minutos. Em seguida, a membrana foi inicialmente pré-hibridada, para evitar adsorção inespecífica da sonda à membrana, com 100 ml de solução de hibridação por 100 cm² [0,5% SDS, 5X Denhardtts (5g de ficoll, 5g PVP, 5g BSA num volume de 500 ml), 100µg/ml de DNA de esperma de salmão fragmentado, 5X SSC, 50 ml de formamida, durante 3 horas à 42°C. Essa solução foi reaproveitada 3 vezes. Para hibridação com a sonda, a solução foi retirada e adicionado a solução de hibridação contendo o fragmento marcado com biotina-14 dATP específica para o componente B desse vírus (100µl de produto amplificado marcado e 10 ml de solução de hibridação) por 16 horas a 42°C.

Após a retirada da sonda e estocada a -20°C , realizou-se 3 lavagens de estringência a 58°C : 2X SSC e 0,1% SDS; 0,5X SSC e 0,1% SDS; 0,1X SSC e 0,1% SDS, respectivamente.

Todas as incubações seguintes foram realizadas a temperatura ambiente, onde lavou-se por 3 minutos a membrana com tampão 1 [ácido maléico 0,2M ; NaCl 0,3 (pH 7,5) e 0,3% *tween* 20] e por 1 hora em tampão 2 [ácido maléico 0,2M ; NaCl 0,3 (pH 7,5) e 1% de reagente de *blocking*] para remoção do excesso de sonda.

Descartada a solução de bloqueio, a membrana foi incubada por 2 horas em solução contendo anticorpo (15 ml de tampão 2 e 10 μl de SA-AP). O anticorpo não ligado à biotina foi removido pela lavagem com tampão 1, 2 vezes por 15 minutos cada, seguido de uma lavagem final com tampão 3 por 5 minutos.

Finalizado os processos de lavagem, a membrana foi colocada em um saco plástico e adicionado 300 μl do substrato quimioluminescente Lumi-Phos (contendo o substrato PPD- *Life Technologies*) a qual foi colocada em cassette (SIGMA CHEMICAL CO.) com filme para raio X (KODAK X-OMAT) e exposta por 20 minutos.

A detecção das amostras foram visualizadas por revelação do filme em solução reveladora, 2% de ácido acético e solução fixadora por um período de 1 minuto em cada solução.

4.9. Ensaio LIS-SSCP-PCR

Dois microlitros do produto amplificado de cada cultivar foram misturados em 18 μl de tampão de LIS (10% sacarose, 0,01% azul de bromofenol e 0,01% xileno cianol) homogeneizados e aquecidos a 97°C por 5 minutos e imediatamente transferidos para gelo. Um aparato de gel de poliacrilamida 8%, com espaçadores 0,5 mm foi montado e 10 μl de cada amostra foram aplicadas e submetidas à eletroforese em tampão TBE 1X (Tris-borato 45mM, pH 8,3 e EDTA 1mM) dentro dos limites de um sistema

de temperatura constante de 4°C à amperagem de 15mA (10 a 20 W, cerca de 900V). Decorridos 5 horas, as placas foram separadas e o gel corado pelo método de coloração de prata. A secagem dos géis foi baseada no método de Popescu (1983), adaptado para secagem em bastidores. Os géis foram prensados entre duas folhas de papel celofane poroso e deixados à temperatura ambiente por 12 horas.

4.10. Ensaio RFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição)

Foram testadas 14 enzimas de restrição, *Hha I*, *EcoR I*, *Sal I*, *Sac I*, *Apa I*, *Bgl I*, *Hind III*, *Kpn I*, *Dra I*, *Bgl II*, *Nhe I*, *Mbo I*, *Pst I* e *EcoR V*, para o fragmento de aproximadamente 1,1 Kb, pertencente ao componente A desse vírus. Dez microlitros do produto amplificado foram digeridos com 5U de cada enzima, tampão de digestão 1X específico para cada enzima. O volume final de cada reação foi de 30 µl e a digestão ocorreu a 37^o durante 12 horas. Os produtos digeridos foram revelados em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídio a 0,2 µg/ml. As imagens foram registradas em um aparelho de fotodocumentação Image Master VDS.

4.11. Análise dos dados

Os *slots* foram analisados no programa IMVDS (Image MasterTTM VDS Software - Pharmacia Botech) o qual tem a capacidade de corrigir os *backgrounds* e realizar leitura de densidade ótica da imagem (IOD). As condições de utilização do programa foram *dots* retangulares com diâmetro 6 mm, com calibração do DNA controle numa curva polinomial de 2^a ordem. A análise estatística foi feita utilizando análise de variância para densidade ótica pelo *Software STATISTICA* versão 4.5.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Construção de sonda específica para o componente B das geminiviroses e quantificação da carga viral em variedades de tomate

A hibridação de lisados fixados em membranas de nylon produzem uma rápida e exata estimativa da concentração viral. Este método minimiza a perda de ácidos nucléicos que usualmente ocorrem no processo de purificação do DNA. Os lisados podem ser preparados de moscas brancas virulíferas ou de tecidos de plantas de tomates infectadas (folhas, raízes, entre outros), possibilitando analisar a distribuição viral pela planta. Este método é adequado para ser usado no monitoramento de geminiviroses epidêmicas, porém, não produz efeito na discriminação entre diferentes isolados de geminivírus (Czosnek *et al.*, 1988, Crespi *et al.*, 1991).

O método de slot-blot foi usado para detectar ácidos nucléicos geminivirais em tecidos de cinco cultivares de tomate e diferenças na quantidade desses ácidos nucléicos.

Estudos têm demonstrado que a eficiência obtida na amplificação com biotina-14-dATP corresponde a menos de 75% do total de deoxiadenosina trifosfato. Ausência de produto amplificado com 100% de biotina-14-dATP foi observado, indicando um aumento na dificuldade da incorporação do nucleotídeo modificado pela Taq DNA polimerase e/ou habilidade da enzima em sintetizar DNA em fitas moldes biotiniladas (Rashtchian & Mackey, 1992). Porém, foi observado que quanto maior a concentração do nucleotídeo biotinilado, maior o sinal quimioluminescente (Mertz *et al.*, 1994).

Amostra de DNA de uma planta de tomate infectada por geminivírus, diagnosticada pela PCR, foi utilizada para amplificar o fragmento com biotina. Esse fragmento, de aproximadamente 450 pb para o componente B, foi amplificado com 40% da concentração de biotina-14-dATP

e pôde ser examinado em eletroforese de gel de agarose e posterior transferência para membrana de nylon (Figura 5).

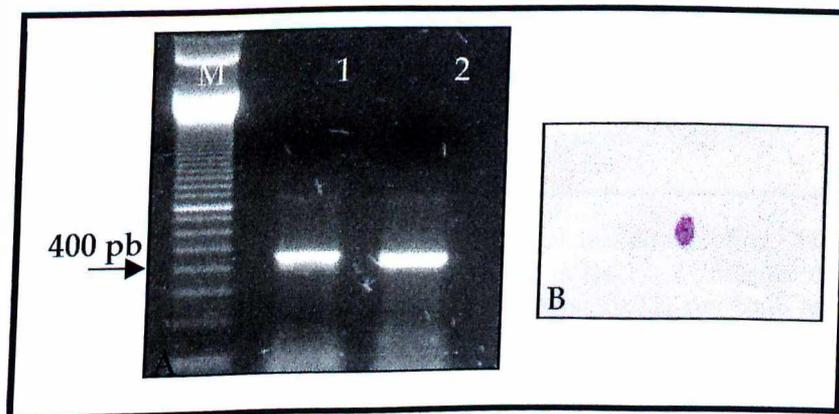


Figura 5. Teste do produto amplificado pela PCR na presença da biotina-14-dATP. (A) Análise dos produtos amplificados em gel de agarose 1,2%, cujas colunas 1 e 2 indicam fragmento amplificado na presença da biotina-14-dATP e controle (fragmento não biotilado), respectivamente. M- marcador de 100 pb. (B) Análise do fragmento amplificado, em membrana de nylon, detectado com substrato cromogênico (NBT/BCIP).

A incorporação da biotina contendo nucleotídeo análogo à molécula de DNA resultou em um pequeno acréscimo no peso molecular do produto amplificado e, conseqüentemente, numa pequena alteração na migração eletroforética, quando comparado ao fragmento não marcado. Essas observações estão de acordo com as relatadas por Rashtchian & Mackey (1992). No teste de hibridação, utilizou-se do substrato cromogênico (NBT/BCIP), o qual levou a uma mudança na coloração, comprovando juntamente com os resultados da migração eletroforética a incorporação da biotina-14-dATP no fragmento amplificado.

A habilidade da amplificação desse produto biotilado para funcionar como sonda em slot-blot foi testada. O produto amplificado sem biotina também foi quantificado em espectrofotômetro, e procedeu-se uma diluição em série de 10.000 a 0,1 ng, sendo posteriormente utilizado como controle. Na hibridação do fragmento obtido via PCR, contendo biotina-14-

dATP, com as diluições desse produto amplificado (controle), a menor concentração viral detectada por essa sonda foi de 1 ng (Figura 6).

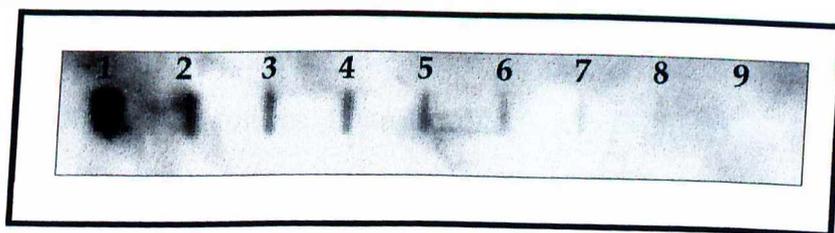


Figura 6. DNA viral hibridizado com sonda marcada com biotina - 14 - dATP específica para o componente B. De 1 à 9 diluições de produto amplificado nas concentrações: 10.000 ng; 1000 ng; 100 ng; 50 ng; 10 ng; 5 μ g; 2,5 ng; 1 ng e 0,1 ng respectivamente. O mínimo detectável pela sonda foi de 1 ng.

Das amostras de DNA extraído das cinco cultivares de tomate com três repetições cada e quantificadas em espectrofotômetro, obteve-se em média 320 μ g de DNA total (planta e vírus) em 200 mg de tecido vegetal. Todas essas amostras foram diluídas para uma concentração final de 10 μ g de DNA total, correspondendo à aproximadamente 7 mg de tecido vegetal. A quantidade de DNA viral presente nessas cinco cultivares de tomate, com três repetições cada, foi determinada pela comparação da intensidade de sinal observada no controle, comparado ao sinal encontrado em cada preparação da amostra. Os resultados da detecção quimioluminescente da sonda biotinilada com as amostras estão mostradas na Figura 7.

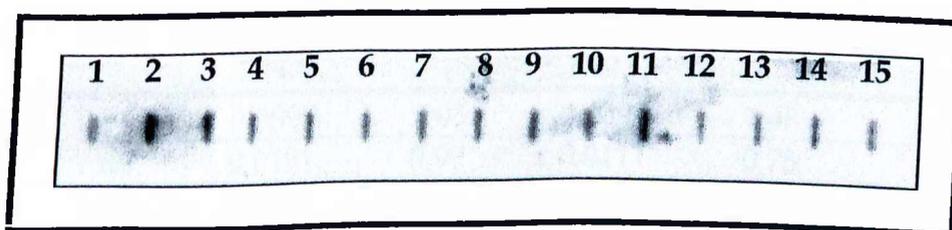


Figura 7. Hibridação por slot blot mostrando diferença na intensidade de concentração viral entre as plantas analisadas. De 1 a 3 cultivar Ângela Hiper, de 4 a 6 cultivar Carmem, de 7 a 9 cultivar Empire, de 10 a 12 cultivar Jumbo, de 13 a 15 cultivar Santa Clara.

Para as amostras das cultivares contendo 10 μ g de DNA a sonda foi capaz de detectar o vírus em todas as 15 plantas analisadas, observando a ocorrência de diferentes intensidades de hibridação, indicando variações na

quantidade viral dentre as plantas de cada cultivar e entre as cultivares, por meio da hibridação em slot-blot, apesar de serem da mesma linhagem e apresentarem mesmo genótipo.

Diferentes sensibilidades para hibridação por dot-blot têm sido encontrada por vários autores. Usando sondas não radioativas, Borja e Ponz (1992) detectaram CRLV (Cherry Leaf Roll Virus) em 160 µg de tecido foliar infectado e em menos que 1 ng de RNA viral purificado, com um substrato cromogênico. Também detectaram vírus em 30 µg de tecidos foliares infectados e 250 pg de RNA viral purificado com o substrato quimioluminescente. Em comparação com sondas radiativas, foi possível detectar níveis abaixo de 12,5 pg em BYDV (Goulart et al., 1993).

Os dados da densidade óptica (IOD) obtidos para o controle, forneceu a equação $y = 0,019 \cdot \exp^{(1,731 \cdot x)}$ adaptada em uma regressão exponencial. Os valores de IOD obtidos para as plantas utilizadas de cada cultivar (Tabela 3) foram ajustados para a equação a partir da qual calculou-se os valores para a concentração viral em todas as plantas analisadas e obtidos valores médios e seus desvios para cada cultivar (Tabela 4).

Tabela 3. Leitura da densidade óptica (IOD) e da quantidade de DNA (µg) de três plantas das cinco cultivares estudadas obtidas pela equação do gráfico exponencial.

Cultivares	Planta I		Planta II		Planta III	
	IOD	Quantidade de DNA	IOD	Quantidade de DNA	IOD	Quantidade de DNA
Angela Hiper	0.91	0.0097	2.05	0.0695	1.48	0.0259
Carmem	1.04	0.0121	0.99	0.0111	0.78	0.0077
Empire	1.06	0.0125	1.03	0.0119	1.42	0.0234
Jumbo	1.19	0.0157	1.70	0.0379	0.69	0.0066
Santa Clara	0.93	0.0100	1.23	0.0168	0.99	0.0111

Análise comparativa desses dados mostram diferenças na quantidade de ácidos nucléicos entre as variedades de tomate. Isto sugere que cultivares tolerantes podem ter menor concentração viral que as cultivares susceptíveis (Bock, 1982). O ensaio slot-blot mostrou que a cultivar

Angela Hiper foi a cultivar que apresentou maior concentração de vírus (35 ng/mg de tecido infectado), sendo a que também apresentou maior sintomatologia. A cultivar Carmem foi a que apresentou menor concentração viral (10 ng) e menor sintomatologia. Nas 15 plantas analisadas houve variação entre 6,6 ng e 69,5 ng na quantidade de DNA viral em 1,5 µg de DNA total por 1 mg de tecido foliar. Porém, essa diferença em plantas de uma mesma cultivar e entre cultivares não foi significativa, de acordo com a análise de variância.

Tabela 4. Análise de variância da densidade óptica e da quantidade de vírus em 1,5 µg de DNA de cinco cultivares de tomate em 1 mg de tecido vegetal, comparadas a sintomatologia.

Cultivares	Densidade óptica	Quantidade de DNA (µg)	Sintomas
Angela Hiper	1.48	0.035a	grave
Carmem	0.94	0.010a	severo
Empire	1.17	0.016a	intermediário
Jumbo	1.19	0.021a	intermediário
Santa Clara	1.05	0.013a	intermediário

DMS 5% = 0,192

CV = 31,42%

A maior quantidade de ácido nucléico viral foi sempre detectada em folhas jovens. Essas observações estão de acordo com os resultados de um estudo preliminar usando medidas físicas da concentração geminiviral (Shock & Goodmam, 1981).

Procedimentos imunoenzimáticos envolvendo substratos quimioluminescentes para a detecção de baixas concentrações de ácidos nucléicos (Bronstein *et al.*, 1990; Tizard *et al.*, 1990) têm demonstrado ser adequado para a detecção de viroses em plantas. Os achados desta investigação indicam que a hibridação slot-blot é bastante sensível e que pode detectar tão pouco quanto 1 ng de vírus/mg de tecido vegetal e que não houve reação de resistência entre as cinco cultivares de tomate

analisadas, pois não foi observado diferenças nas concentrações do genoma viral que está intimamente associado à resistência. É importante enfatizar que em toda hibridação de amostras deve ser realizada com controles positivos (diluições) e negativos para normalizar o efeito do sinal quimioluminescente.

As cinco cultivares são provavelmente suscetíveis ao vírus, mas apresentam-se com diferentes níveis de tolerância ao nível de campo, baseado em sintomatologia, sendo a mais tolerante "Carmem" e a menor tolerância apresentada pela "Angela Hiper". Segundo Goulart (1990) níveis de tolerância não são correlacionados com variações da concentração do genoma viral em tecidos infectados, pois a tolerância está mais associada com o valor adaptativo da própria cultivar naquele ambiente.

5.2. Sintomatologia e Gama de Hospedeiros

Onze (11) espécies de plantas envolvendo 5 famílias, foram testadas quanto a susceptibilidade às geminiviroses.

O vírus foi primeiramente encontrado infectando plantas de couve e de tomate em casa de vegetação. As moscas brancas transmissoras desse vírus foram coletadas e distribuídas nas outras espécies de plantas sadias, para posterior análise de infecção por geminiviroses. O número de insetos vetores não foi controlado em cada planta, pois queríamos que a infecção ocorresse naturalmente, similar as observadas no campo.

Das quatro espécies testadas da família Solanácea, todas apresentaram sintomatologia de geminiviroses. Para *L. esculentum* (Figura 8A) e *C. annuum* (Figura 8B) observou-se inicialmente um mosaico verde o qual se desenvolveu para um mosaico amarelo com posterior enrugamento e amarelecimento das folhas. Nessas plantas notou-se que a altura e a produção de frutos também foram reduzidas. Para *S. melongena* (Figura 8C) e *S. gilo* (Figura 8D) observou-se clorose bem definida nas folhas, sem enrugamentos.

O feijão comum (*P. vulgaris*) um hospedeiro de muitas geminivirose transmitidas por moscas brancas (Brown & Poulos, 1990) e o feijão-vagem apresentaram mosaico dourado brilhante, cloroses e deformidades nas folhas, acompanhado de redução no tamanho da planta (Figuras 8E e F).

O sintoma mais notável observado em plantas de abóbora e de couve (Figuras 9A e B), além dos demais já observados para as outras espécies de plantas, foi a presença do prateamento nas folhas quando ainda jovens. As demais espécies também apresentaram variações nesses sintomas, porém, típicos de geminivirose (Figuras 9C e D). No entanto, a maioria dessas espécies analisadas não atingiram a fase adulta, devido aos vetores eliminarem uma excreção açucarada que induziram o aparecimento de fungos, provocando o apodrecimento dos ramos e das folhas.

A sintomatologia observada nessas plantas são bastante similares à observada ao novo geminivírus isolado e caracterizado em Minas Gerais, o TRMV. Os sintomas causados por esses fitovírus nas plantas foram o mosaico verde amarelado, enrugamento e redução das folhas, sendo que algumas apresentaram amarelecimento também nas nervuras; a altura da planta e a produção de frutos foram drasticamente reduzidos em todas as cultivares (Filgueira *et al.*, 1996).

Observou-se que a severidade dos sintomas variou ambos entre as espécies e também entre cultivares de uma mesma espécie. Estudos tem mostrado que a severidade dos sintomas está diretamente correlacionada à concentração do vírus presentes nas plantas (Daubert, 1988).

Entretanto, a única planta que não apresentou sintomatologia foi a planta daninha. As plantas daninhas têm sido relatadas como o reservatório de ambos inóculos primários e vetores para as geminivirose (Bock, 1982), mas não se sabe quais fatores presentes nestas plantas que impedem a manifestação da sintomatologia.

A gama de hospedeiros para sete geminivirose transmitidas por moscas brancas, as quais podem infectar tomate, foram relatadas para o

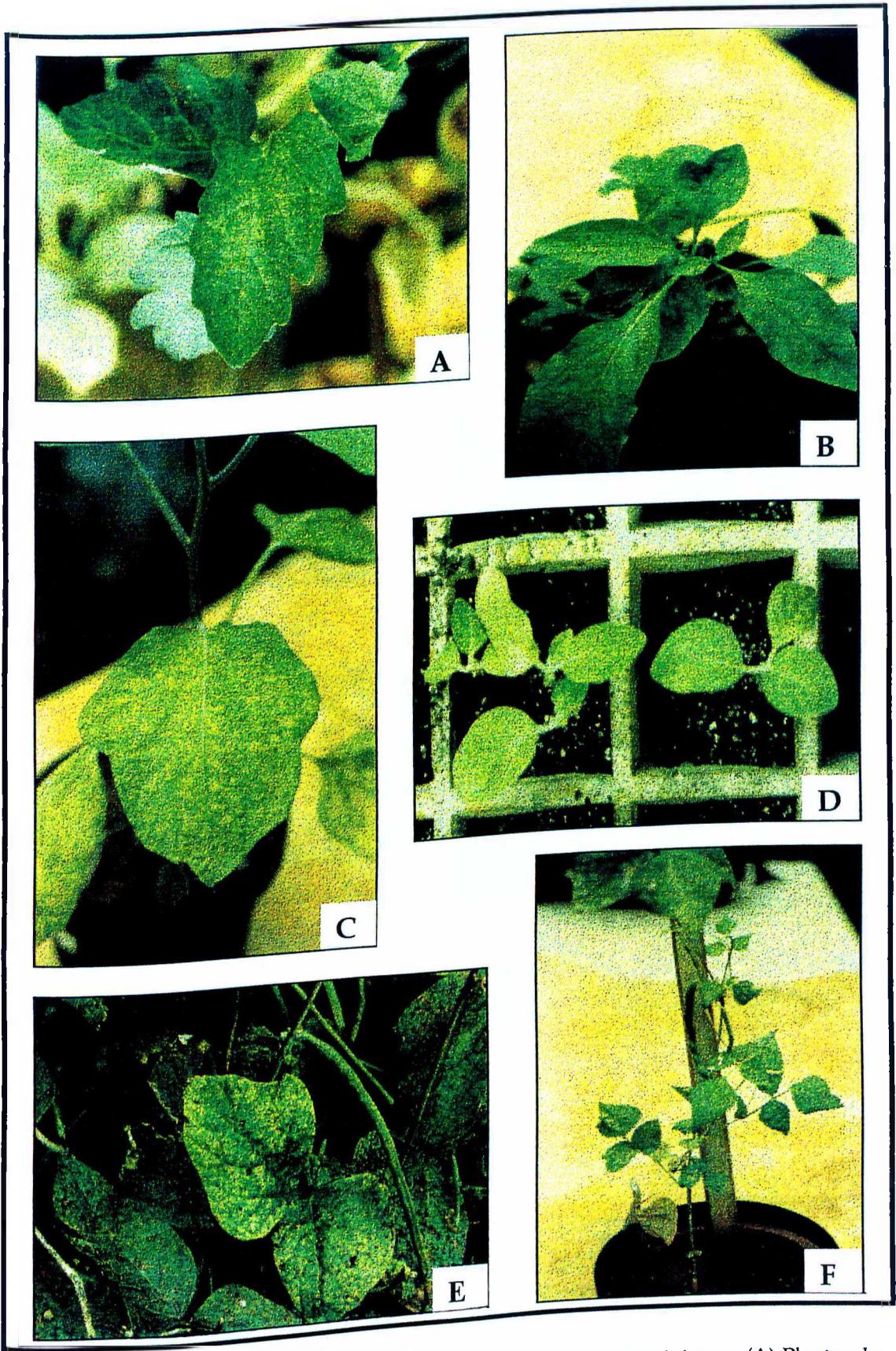


Figura 8. Plantas mostrando a sintomatologia pela infecção por geminivíroses. (A) Plantas de tomate; (B) Plantas de pimentão; (C) Plantas de berinjela; (D) Plantas de jiló; (E) Plantas de feijão; (F) Plantas de vagem.

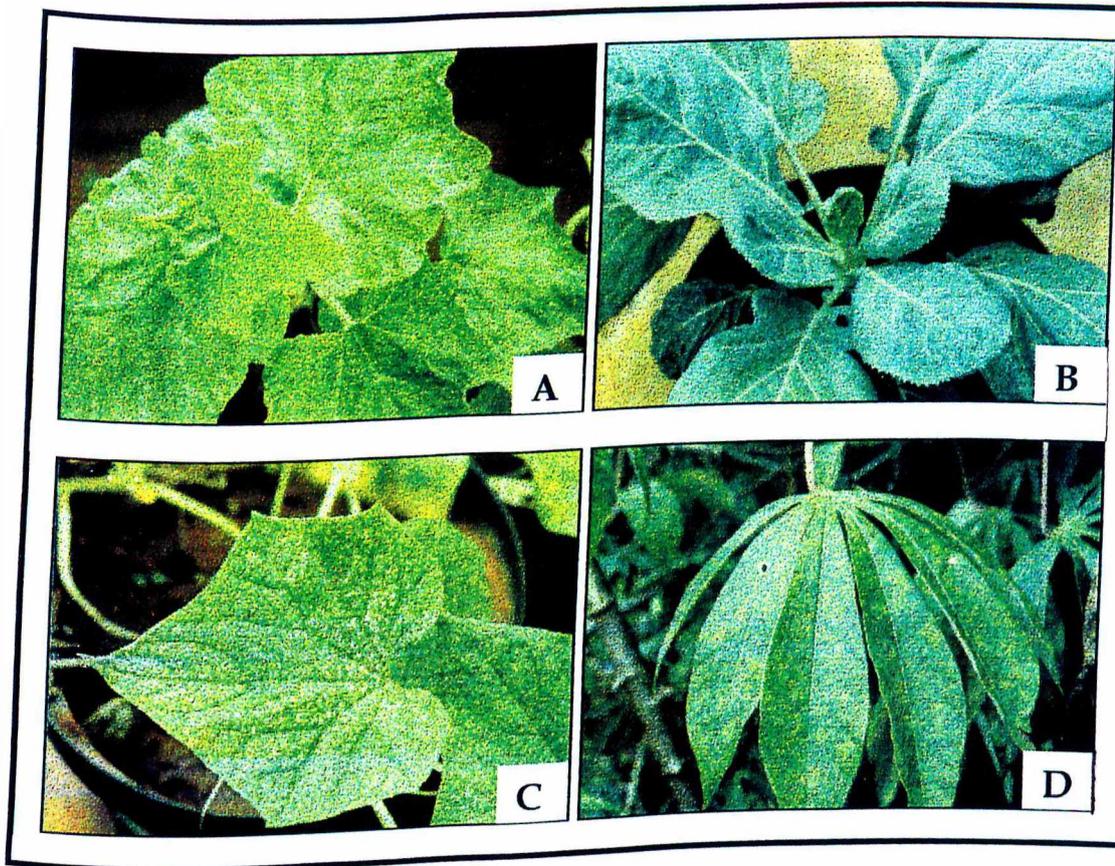


Figura 9. Plantas mostrando a sintomatologia pela infecção por geminiviruses. (A) Plantas de abóbora; (B) Plantas de couve; (C) Plantas de pepino; (D) Plantas de mandioca.

hemisfério oeste, mas há poucos estudos sobre a gama de hospedeiros da maioria dessas geminivirozes surgidas nesse hemisfério (Polston & Anderson, 1997).

Algumas geminivirozes podem ser distintas das demais baseada somente na gama de hospedeiros e em alguns casos somente na sintomatologia, como o TMoV (*Tomato Mottle Virus*). Nesse estudo, como a sintomatologia foi bastante variável, porém bastante relacionada às observadas em Minas Gerais, não podemos afirmar qual vírus está infectando essas plantas. Essa mesma observação é proposta por Polston (1993), a qual também não sabe explicar como as diferenças na gama de hospedeiros podem ser usadas para classificar as geminivirozes como diferentes viroses ou diferentes linhagens de um mesmo vírus.

5.3. Caracterização dos fragmentos amplificados pela PCR

A Reação em Cadeia da Polimerase consiste numa técnica extremamente sensível e específica para a detecção e identificação de patógenos de plantas e por isso pode ser usada para investigar questões precisas sobre a composição de uma população de patógenos e a diversidade genética das viroses. Sua especificidade está baseada no uso de *primers* que são complementares a regiões que *flanqueiam* a seqüência de DNA a ser amplificada. Uma das vantagens dessa técnica é a requisição de poucas quantidades de DNA, o qual pode ser isolado de material fresco, seco ou congelado.

Os métodos de PCR têm sido usados para a detecção e determinação da variabilidade de viroses em plantas, incluindo as luteovirozes e potivirozes (Langeveld *et al.*, 1991), geminivirozes transmitidas por cigarrinhas infectando monocotiledôneas (Rybicki & Hughes, 1990) e as geminivirozes transmitidas por moscas brancas infectando dicotiledôneas, como o BGMV (Gilbertson *et al.*, 1991).

Nesse trabalho, o DNA foi extraído de folhas jovens de várias espécies de plantas e como a concentração final do DNA viral no extrato dessas amostras eram desconhecidas, houve a necessidade de testar várias quantidades de DNA na reação de PCR, a qual variou de 800 a 1200 ng do DNA total.

Para diagnosticar essas amostras via PCR, utilizou-se *primers* degenerados descritos por Rojas e colaboradores (1993). Os oligonucleotídeos específicos para amplificar o componente A anelam dentro da ORF AL1, responsável pela replicação e na ORF AR1, responsável pela proteína da capa. O *primer* PAL1v1978 anela na fita complementar dentro da sequência da ORF AL1, enquanto que o *primer* PAR1c496 anela na fita viral da ORF AR1, próximo a extremidade amino-terminal dessa proteína. Nesse fragmento obtido está incluído a sequência da região comum e a região amino-terminal das ORFs AL1 e AR1.

A Figura 10 mostra o resultado da amplificação do DNA viral presente nas várias espécies de plantas, as quais apresentavam sintomatologia de infecção por geminivírus. Esses *primers* foram eficientes no anelamento, resultando em um único fragmento de aproximadamente 1,15 Kb, o qual pode variar de tamanho dependendo do vírus estudado.



Figura 10. Diagnóstico molecular de infecção por geminivírus baseado na PCR. Dois oligonucleotídeos complementares às sequências que flanqueiam a região comum e amino-terminal das ORFs AL1 e AR1 foram usados para amplificação específica do componente A. As colunas de 1 a 12 correspondem a abóbora, berinjela, couve, feijão, jiló, mandioca, pepino, planta daninha, tomate, vagem, pimentão e controle (planta de tomate infectada com TRMV), respectivamente. M - marcador de 100 pb.

5.4. Análise molecular dos componentes A e B dos geminivírus por SSCP (Polimorfismo Conformacional de Fita Simples)

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.

A mobilidade eletroforética de uma molécula de DNA num gel é sensível tanto para tamanho e forma. Em condições não desnaturantes, o DNA de fita simples apresenta uma estrutura conformacional secundária que é determinada pela interação intramolecular e pela sequência de nucleotídeos do fragmento. Na análise SSCP, uma sequência mutada é detectada como uma mudança das mobilidades em eletroforese em gel de poliacrilamida, causada por sua alteração estrutural. Devido a alta resolução, a eletroforese em gel de poliacrilamida pode distinguir muitas mudanças conformacionais causadas por diferenças raras na sequência, assim como a substituição de uma única base em um fragmento de várias centenas de bases (Hayashi, 1991).

A análise SSCP, pela habilidade em separar diferentes tipos conformacionais de fita simples (os quais podem diferir de cada outra por somente uma única mutação de base), pode ser usada para avaliar a presença de mais de uma espécie dentro de uma população por meio do produto amplificado pela PCR. Esses fragmentos apresentam como uma banda de único peso molecular em eletroforese de gel de agarose, como demonstrado nas Figuras 10 e 11. Todos os isolados analisados mostraram ser homólogos para a presença de somente duas bandas na análise de SSCP; porém, a única diferença observada foi na conformação da fita simples para a planta de pimentão.

Produtos amplificados e desnaturados via PCR, para os componentes A e B dessa geminivirose foram analisados quanto a conformação estrutural de fita simples com o objetivo de avaliar a

homogeneidade da população de vírus presente nas amostras. As análises realizadas com as 11 espécies de plantas estão mostradas nas Figuras 12 e 13.

O padrão eletroforético pelo LIS-SSCP ofereceu indícios de variações tanto no genoma A e B do geminivírus infectante do pimentão em relação as demais cultivares. O motivo pelo qual essa amostra de pimentão apresentou um perfil eletroforético diferente das outras amostras pode ser explicado pelo fato dessa ter sido coletada no mesmo local em que havia plantas de tomate infectadas com o TRMV. Esses resultados sugerem que as amostras mantidas na casa de vegetação podem não estar infectadas com o TRMV, levando-se também em consideração que as plantas de pimentão foram coletadas na Escola Agrotécnica. Porém, não podemos afirmar qual espécie de vírus está infectando as plantas mantidas em casa de vegetação.

5.5. Construção de um mapa de restrição para o genoma A

O RFLP é uma técnica comumente utilizada para detectar polimorfismos, devido as sequências nucleotídicas serem geneticamente distintas para diferentes espécies e até mesmo para isolados de uma mesma espécie. Além disso, essa técnica tornou-se uma ferramenta útil e importante para construção de mapas genéticos para posterior caracterização molecular.

Como foi observado na análise de SSCP a presença de um polimorfismo entre as plantas estudadas, foi necessário a realização de um estudo mais detalhado sobre a sequência nucleotídica dessa geminivirose, utilizando das endonucleases de restrição.

Por meio do RFLP observou-se primeiramente uma diferença no tamanho do fragmento das plantas de pimentão com as demais analisadas no SSCP (Figura 14). Essas amostras foram digeridas com as mesmas endonucleases de restrição, *Hha* I e *Eco*R I.

O perfil eletroforético para a planta de pimentão diferiu das demais amostras. Observou-se a presença de quatro bandas geradas pela restrição combinada das enzimas *Hha* I e *Eco*R I, sendo três bandas e uma banda geradas pela *Hha* I e *Eco*R I, respectivamente. Porém, o perfil

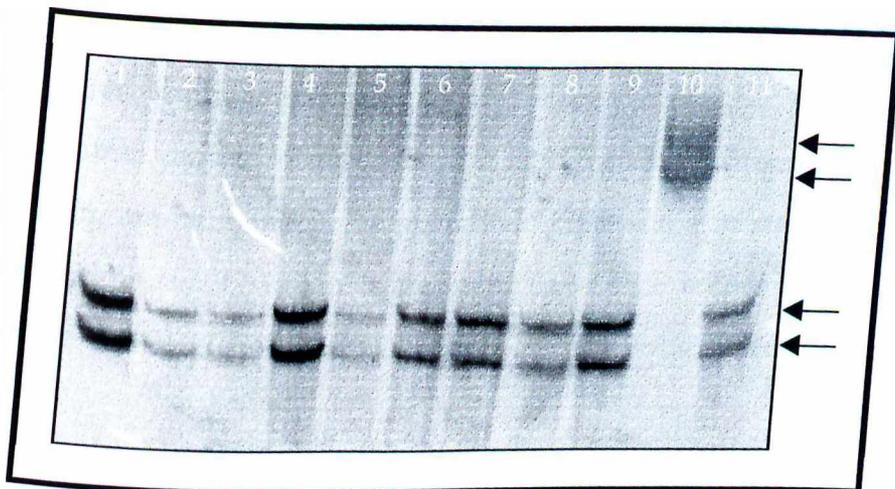


Figura 12. Análise SSCP de produtos da PCR para o componente A de 11 espécies de plantas infectadas por geminivírus. As setas indicam que cada espécie apresentou DNA de fita dupla.. As colunas de 1 a 11 correspondem a abóbora, berinjela, couve, feijão, jiló, mandioca, pepino, planta daninha, tomate, pimentão e vagem, respectivamente.

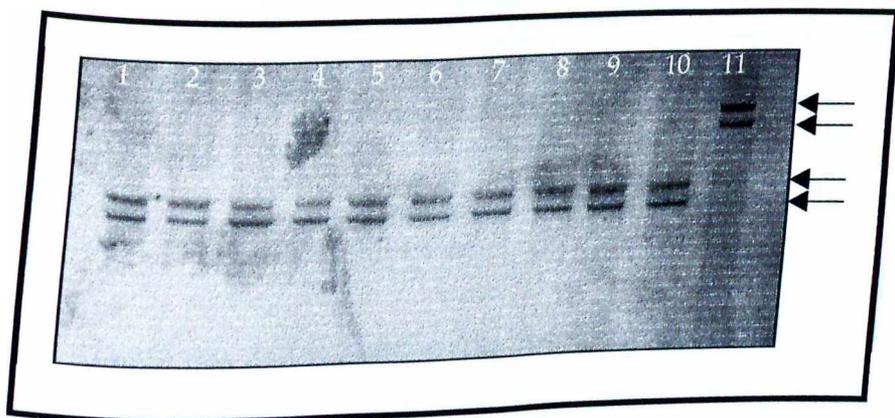


Figura 13. Análise SSCP de produtos da PCR para o componente B de 11 espécies de plantas infectadas por geminivírus. As setas indicam que cada espécie apresentou DNA de fita dupla.. As colunas de 1 a 11 correspondem a abóbora, berinjela, couve, feijão, jiló, mandioca, pepino, planta daninha, tomate, vagem e pimentão, respectivamente.

eletroforético para essas enzimas separadas não estão mostradas. Essas enzimas também foram utilizadas nas outras amostras, das quais resultaram apenas três bandas. Por meio das digestões realizadas com as enzimas isoladamente, notou-se que a *EcoR* I não possui sítio específico para esse fragmento, em comparação as plantas de pimentão e os sítios apresentados para a enzima *Hha* I não são os mesmos. Essas observações nos levam a uma evidência nítida de que essas plantas podem estar infectadas por vírus distintos.

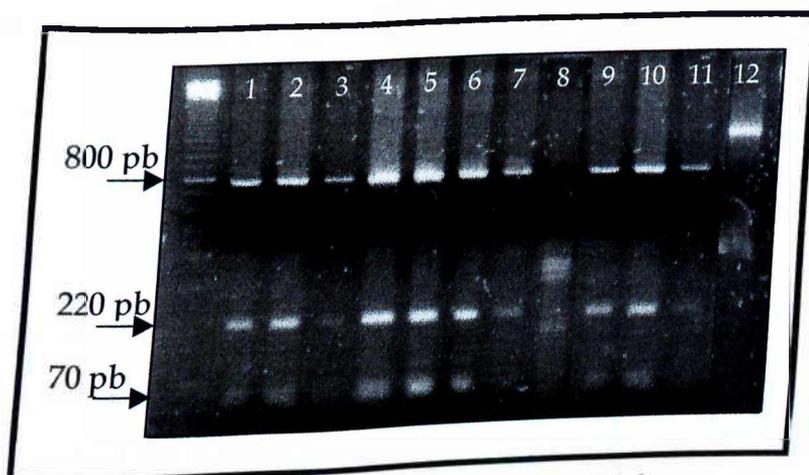


Figura 14. Digestão enzimática do fragmento parcial do genoma A. As colunas de 1 a 11 indicam abóbora, berinjela, couve, feijão, jiló, mandioca, pepino, pimentão, erva daninha, tomate, vagem, respectivamente. 12- amostra controle sem digestão enzimática e M- marcador de 100 pb.

Diante dos dados obtidos com o SSCP e digestão enzimática com a *Hha* I e a *EcoR* I, sugerindo um polimorfismo entre a planta de pimentão e as outras, propôs-se a construção de um mapa genético para a sequência parcial do componente A. Foi realizado o mapa de restrição somente para a planta de tomate, já que esta não apresentou polimorfismo com as demais plantas infectadas com o mesmo vírus e por ser a primeira planta a qual foi observada a presença desse fitovírus.

Das 14 enzimas analisadas somente três reconheceram sua sequência específica, *Hha* I, *Mbo* I e *Sal* I (Figura 15).

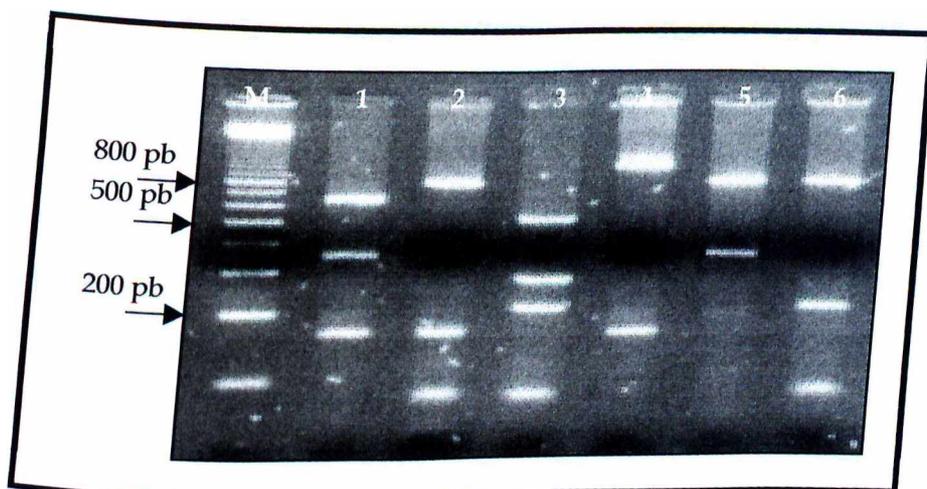


Figura 15. Ensaio de restrição enzimática do componente A total da planta de tomate infectada com o novo isolado de geminivírus. As linhas de 1 a 6 correspondem ao fragmento de aproximadamente 1,1 Kb e indicam *Sal I* e *Mbo I*, *Sal I* e *Hha I*, *Mbo I* e *Hha I*, *Sal I*, *Mbo I*, *Hha I*, respectivamente. M- marcador 100 pb.

As enzimas *EcoR V*, *Hind III*, *Kpn I* e *Nhe I* não apresentaram sítios para nenhum dos begomovírus analisados, BGMV, TGMV, ToMoV, TRMV e PYMV e as enzimas *Pst I*, *EcoR I*, *Dra I*, *Bgl I*, *Bgl II*, *Sac I* e *Apa I* possuem sítios para esses begomovírus, com exceção desse isolado (Figura 16).

Observou-se que a enzima *Dra I* tem somente um sítio para o TGMV e BGMV, na região comum. Essas duas geminiviroses são originárias do Brasil e possivelmente possuem um parentesco maior. Porém essa região é bastante divergente entre as geminiviroses, a qual fornece informações de filogenia. A *Sac I* possui sítio para o BGMV e TRMV na região comum, mas não para o TGMV, sendo todos esses pertencentes a um mesmo gênero Begomovirus. A região comum é apenas conservada para componentes (A e B) de um mesmo isolado. No entanto, o fato desse novo isolado não possuir essas mesmas enzimas que reconhecem a região comum, não indica que esse não possa ser um begomovírus, já que os PYMV e ToMoV não as têm. Por outro lado é que esse novo isolado possa estar passando por seleção exercido por fatores ambientais tais como adaptação a novos hospedeiros.

A proteína AR1 da capa protéica também fornece informações relacionadas a capacidade de infectar hospedeiros e interagir com vetores.

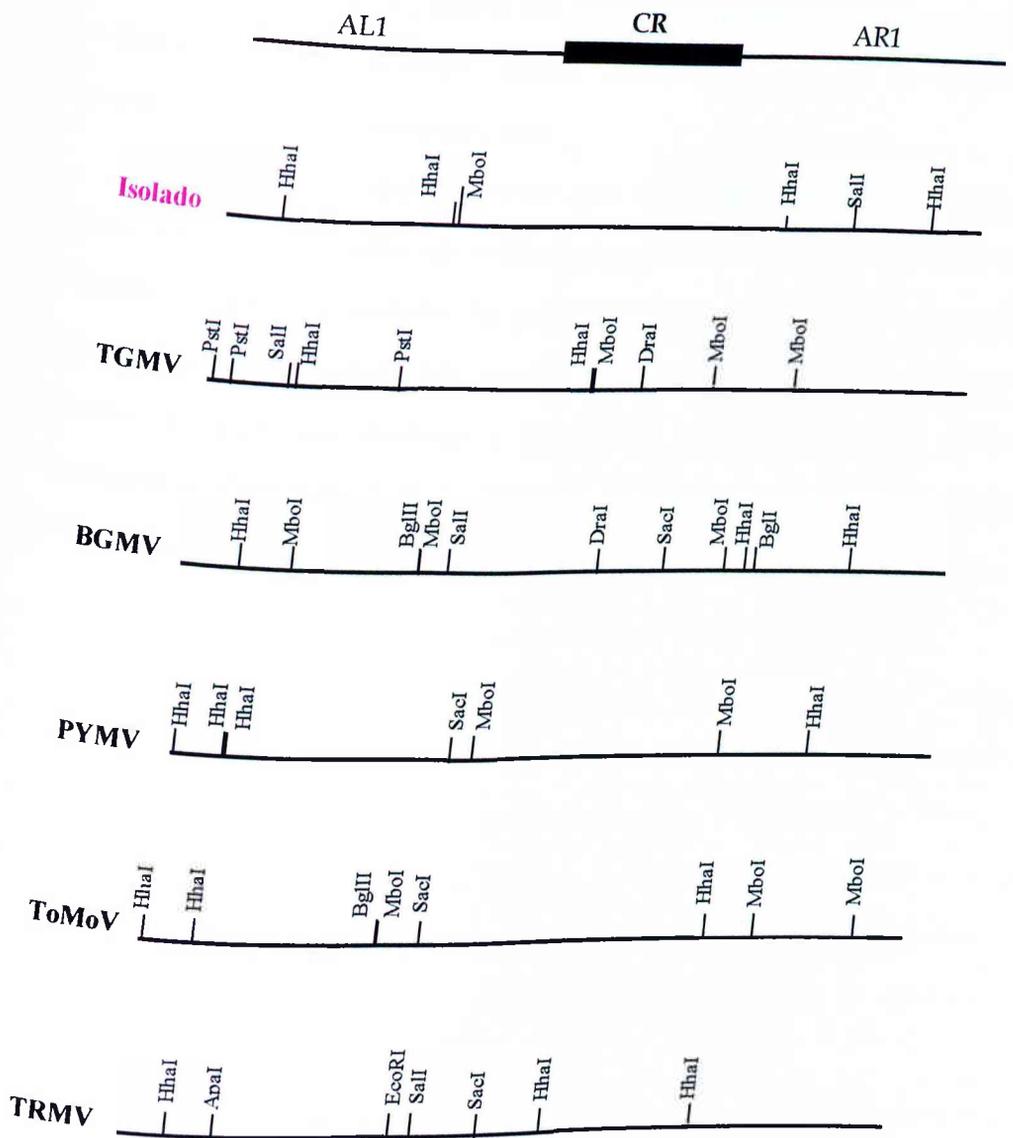


Figura 16. Mapa de restrição do componente A para um fragmento linear de aproximadamente 1,2 Kb, para o isolado e alguns begomovírus. AL1 - ORF da proteína de replicação (porção amino-terminal). Caixa em negrito - Região Comum (CR). AR1- ORF da capa protéica (porção amino-terminal).

Essas informações são utilizadas para diferenciar um vírus do outro. Contudo esse novo isolado e o TGMV possuem sítios para a enzima Sal I, mas que geram comprimento diferenciados. Esses dados podem sugerir a habilidade desse novo isolado em infectar plantas de tomates, porém para confirmar esse resultados faz-se necessário estudar a sequência e especificamente a proteína da capa.

Assim sendo, sugere-se que essa geminivirose é diferente das demais fitovirose, porém não elimina a possibilidade de que se trata de uma diferente estirpe ou isolado de geminivírus já descritos. Esses resultados demonstraram a diversidade genética de geminivirose brasileiras que infectam hospedeiros comuns e propõe-se a necessidade de definirem estratégias moleculares para a obtenção de plantas resistentes e eficientes contra esses fitovírus.

6. CONCLUSÕES

O isolado viral é um geminivírus pertencente ao Subgrupo III, apresentando genoma bipartido e infectando dicotiledôneas. A reação em cadeia da polimerase amplificou especificamente os dois genomas virais A e B.

A sintomatologia observada em todas as 11 espécies de plantas estudadas são bastante similares à observada do TRMV, com exceção da planta daninha que não apresentou sintoma.

A gama de hospedeiro para esse isolado foi determinada, podendo infectar abóbora, berinjela, couve, feijão, jiló, mandioca, pepino e vagem. No entanto, outras espécies de plantas podem ser testadas.

A sonda construída para o componente B desse fitovírus foi eficiente na detecção do vírus em todas as cultivares analisadas, sendo sua capacidade mínima de detecção correspondente a 1 ng de DNA viral.

Dentre as cultivares analisadas, as que apresentaram maior e menor concentração viral foram Angela Hiper e Carmem, respectivamente, em 1,5 µg de DNA total por 1 mg de tecido vegetal. No entanto, a diferença de concentração viral em todas as plantas de uma mesma cultivar e entre cultivares não foi estatisticamente significativa, sugerindo que todas as cultivares são suscetíveis ao vírus, mas com diferentes níveis de tolerância, conforme sintomatologia.

O padrão eletroforético observado pela técnica de SSCP mostrou variações nos genomas A e B do geminivírus infectando plantas de pimentão, em comparação com as demais plantas.

Ensaio com enzimas de restrição comprovou que a planta de pimentão estava infectada com TRMV. Pelo mapa genômico sugere-se que o fitovírus presente nas demais plantas difere do BGMV, TGMV, ToMov, TRMV e PYMV. Esse novo isolado pode estar passando por um processo de seleção exercido por fatores ambientais, como adaptação a novos hospedeiros.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANNAL, M.; TOKUNAGA, K.; LIN, L.; KUWATA, S.; MAZDA, T.; AMAKI, L.; FUJIKAWA, K. & JUJI, T. Discrimination of human HLA-DRB1 alleles by PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism method). *Eur. J. Immunogenet.*, v.21, p. 1-9, 1994.
- BEDFORD, I.D.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; ROSELL, R.C. & MARKHAM, P.G. Geminivirus transmission and biological characterisation of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. *Ann. Appl. Biol.*, v. 125, p. 311-325, 1994.
- BOCK, K.R. Geminivirus diseases in tropical crops. *Plant Dis.*, v. 66, p. 266-270, 1982.
- BORJA, M.J. & PONZ, F. An appraisal of different methods for the detection of walnut strain of cherry leaf roll virus. *J. Virol. Methods*, v. 36, p. 73-83, 1992.
- BOULTON, M.I.; KING, D.I.; MARKHAM, P.G.; PINNER, M.S & DAVIES, J.W. Host range and symptoms are determined by specific domains of the maize streak virus genome. *Virology*, v. 181, p. 312-318, 1991.
- BRIDDON, R.W.; PINNER, M.S. & STANLEY, J. Geminivirus coat protein gene alters insect specificity. *Virology*, v. 177, p. 628-633, 1990.
- BRIDDON, R.W.; LUNNES, P. & BEDFORD, I.D. A streak of pearl millet caused by a leafhopper-transmitted geminivirus. *European J. of Plant Path.*, v. 102, p. 397-400, 1996.
- BRONSTEIN, I.; VOYTA, J.C.; LAZZARI, K.G.; MURPHY, O.; EDWARDS, B. & KRICKA, L.J. Rapid and sensitive detection of DNA in southern blots with chemiluminescence. *Biotechniques*, v. 8, p. 310-314, 1990.
- BROUGH, C.L.; HAYES, R.J.; MORGAN, A.J.; COUTTS, R.H.A. & BUCK, K.W. Effects of mutagenesis *in vitro* on the ability of cloned tomato golden mosaic virus DNA to infect *Nicotiana benthamiana* plants. *J. Gen. Virol.*, v. 69, p. 503-514, 1988.

- BROWN, J.R. & POULOS, B.T. Serrano golden mosaic virus: A newly identified whitefly-transmitted geminivirus of pepper and tomato in the United States and Mexico. *Plant Dis.*, v. 74, p. 720, 1990.
- BROWN, J.R. & BIRD, J. Whitefly-transmitted geminivirus and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. *Plant Dis.*, v. 76, p. 220-225, 1992.
- CARLSON, D.P., SUPERKO, C.; MACKEY, J.; GASKILL, M.E. & HANSEN, P. Chemiluminescent detection of nucleic acid hybridization. *Focus*, v.12, p. 9-12, 1990.
- CITOVSKY, V.; KNORR, D.; SCHUSTER, G. & ZAMBRYSKI, P. The P30 movement protein of tobacco mosaic virus is a single-stranded nucleic acid binding protein. *Cell*, v. 60, p. 637-647, 1990.
- COHEN, S.; KERN, J.; HARPAZ, I & BEM-JOSHEP, R. Epidemiological studies of the Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in the Jordan Valley, Israel. *Phytoparasitica*, v. 16, p. 259-270, 1988.
- CRESPI, S.; ACCOTTO, G.P.; CACIACLI, P. & GRONENBORN, B. Use of digoxigenin-labelled probes for detection and host-range studies of tomato yellow leaf curl geminivirus. *Res. Virol.*, v. 142, p. 283-288, 1991.
- CZOSNEK, H.; BER, R.; NAVOT, N. & ZAMIR, D. Detection of tomato yellow leaf curl virus in lysates of plants and insects by hybridization with a viral DNA probe. *Plant Dis.*, v. 72, p. 949-951, 1988.
- CZOSNEK, H.; BER, R.; NAVOT, N.; ANTIGNUS, Y.; COHEN, S. & ZAMIR, D. Tomato yellow leaf curl virus DNA forms in the viral capsid, in infected plants and in the insect vector. *Phytopathology*, v. 125, p. 47-54, 1989.
- DAUBERT, S. Sequence determinants of symptoms in the genomes of plant viruses, viroids, and satellites. *Mol. Plant-Microbe Interact*, v. 1, p. 317-325, 1988.
- DAWSON, W.O. & HILF, M.E. Host-range determinants of plant viruses. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, v. 43, p. 527-555, 1992.

- DENG, D.; MEGRATH, P.F.; ROBINSON, D.J. & HARRISON, B.D. Detection and differentiation of whitefly-transmitted geminiviruses in plants and vector insects by the polymerase chain reaction with degenerate primers. **Ann. Appl. Biol.**, v. 125, p. 327-336, 1994.
- DONSON, J.; ACCOTTO, G.P.; BOULTON, M.I.; MULLINEAUX, P.M. & DAVIS, J.W. The nucleotide sequence of a geminivirus from *Digitaria sanguinalis*. **Virology**, v. 161, p. 160-169, 1987.
- DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p. 13-15, 1990.
- EAGLE, P.A., OROZCO, B.M. & HANLEY-BOWDOIN, L. A DNA sequence required for geminivirus replication also mediated transcriptional regulation. **The Plant Cell**, v. 6, p. 1157-1170, 1994.
- ELMER, J.S.; BRAND, L.; SUNTER, G.; GARDINER, W.E.; 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 Res.**, v. 16, p. 7043-7060, 1988.
- ELMER, J.S.; SUNTER, G. & GARDINER, W.E. Agrobacterium-mediated inoculation of plants with tomato golden mosaic virus DNA's. **Plant Mol. Biol.**, v. 10, p. 225-234, 1988.
- ETESSAMI, P.; CALLIS, R.; ELLWOOD, S. & STANLEY, J. Delimitation of essential genes of cassava latent virus DNA 2. **Nucleic Acids Res.**, v. 16, p. 4811-4829, 1988.
- ETESSAMI, P.; SAUNDERS, K.; WATTS, J. & STANLEY, J. Mutational analysis of complementary-sense genes of African cassava mosaic virus DNA A. **J. Gen. Virol.**, v. 72, p. 1005-1012, 1991.
- FERREIRA, L.T., AVIDOS, M.F.D. Mosca branca - presença indesejável no Brasil. In: Embrapa/Cenargen. <http://cenargen.embrapa.br>
- FIGUEIRA, A.R. Comparison of techniques for detection of *Barley Yellow Dwarf Virus-PAV-IL*. **Plant Disease**, v. 81, p. 1236-1240, 1997.
- FILGUEIRA, F.R.A.; FERNANDES, J.J.; REZENDE, E.A.; ZERBINI, F.M.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. & GILBERTSON, R.L. 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**. p. 18-22, 1996.
- FONTES, E.P.B.; LUCKOW, V.A. & HANLEY-BOWDOIN, L. A geminivirus replication protein is a sequence-specific binding protein. **Plant Cell**, v. 4, p. 597-608, 1992.
- FONTES, E.P.B.; EAGLE, P.A.; SIPE, P.S; LUCKOW, V.A. & HANLEY-BOWDOIN, L Interaction between a gemivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. **J. of Biol. Chemistry**, v. 269, p. 8459-8465, 1994.
- FRANÇA, F.H., BOAS, G.L.V. & BRANCO, M.C. Ocorrência de *Bemisia argentifolli* Bellows & Perring (Homoptera: Aleyrodidae) no Distrito Federal, 1996.
- GALVEZ, G.E. & CARDENAS, M.R. Virus transmitidos por moscas blancas. **Problemas de producción del frijol; enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas de *Phaseolus vulgaris***. p. 261-289, 1980.
- GARDINER, W.E.; SUNTER, G.; BRAND, L.; ELMER, J.S.; ROGERS, S.G. & BISARO, D.M. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: the coat protein is not required for systemic spread or symptom development. **EMBO J.**, v. 7, p. 899-904, 1988.
- GILBERTSON, R.L.; ROJAS, M.R.; RUSSELL, D. & MAXWELL, D.P. The use of the asymmetric polymerase chain reaction and DNA sequencing to determine genetic variability among isolates of bean golden mosaic geminiviruses in the Dominican Republic. **J. Gen. Virol.**, v. 72, p. 2843-2848, 1991.
- GOODMAN, R.M. Infectious DNA from a whitefly - transmitted virus of *Phaseolus vulgaris*. **Nature**, v. 266, p. 54-55, 1977.
- GOODMAN, R.M. Single-stranded DNA genome in a whitefly - transmitted plant virus. **Virology**, v. 83, p. 171-179, 1977.

- GOULART, L.R. Barley Yellow Dwarf Virus Resistance of Wheatgrass: Molecular and Immunological Evaluation and Introgression into Wheat. **Tese de Ph.D, Purdue University, Indiana, EUA.** 1990.
- GOULART, L.R.; MACKENZIE, S.A.; OHM, H.W. & LISTER, R.M. Barley Yellow Dwarf Virus in wheat x wheatgrass population. **Crop Sci.**, v. 33, p. 595-599, 1993.
- HAMILTON, W.D.O.; BISARO, D.M. & BUCK, K.W. Identification of novel DNA forms in tomato golden mosaic virus infected tissue. Evidence for a two component viral genome. **Nucleic Acids Res.**, v. 10, p. 4901, 1982.
- HAMILTON, W.D.O.; BISARO, D.M.; COUTTS, R.H.A. & BUCK, K.W. Demonstration of the bipartite nature of the genome of a single-stranded DNA plant virus by infection with the cloned DNA components. **Nucl. Acids Res.**, v. 11, p. 7387-7396, 1983.
- HAMILTON, W.D.O.; 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 J.**, v. 3, p. 2197-2205, 1984.
- HARRISON, B.D. Advances in geminivirus research. **Ann. Rev. of Phytopathol.**, v.23, p. 55-82, 1985.
- HAYASHI, K. PCR-SSCP: a single and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. **PCR Methods Appl.**, v. 1, p. 34-38, 1991.
- HOSHINO, S.; KIMURA, A.; FUKUDA, Y.; DOHI, K. & SASAZUKI, T. PCR-SSCP analysis of polymorphism in DPA1 and DPB1 genes: Simple and rapid method for histocompatibility test. **Hum. Immunol.**, v.33, p. 98-108, 1992.
- HOWARTH, A.J.; CATON, J.; BOSSERT, M. & GOODMAN, R.M. Nucleotide sequence of bean golden mosaic virus and a model for gene regulation in geminiviruses. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 82, p.3572-3576, 1985.
- HULL, R. The movement of viruses in plants. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 27, p. 213-240, 1989.

- IKEGAMI, M.; HABER, S. & GOODMAN, R. M. Isolation and characterization of virus-specific double-stranded DNA from tissues infected by bean golden mosaic virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 78, p.4102, 1981.
- INGHAM, D.J. & LAZAROWITZ, S.G. A single missense mutation in BR1 movement protein alters the host range of the *squash leaf curl geminivirus*. **Virology**, v. 196, p. 672-694, 1993.
- IOANNOU, N. Yellow leaf curl and other virus diseases of tomato in Cyprus. **Plant Pathol.**, v. 34, p. 428-434, 1985.
- KARCHER, J. S. Non-radioactive nucleic acid detection systems. In: **Plant Mol. Biol. Manual** (GELVIN, S. B. & SCHILPEROORT, R. A., eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 1-25, 1994.
- KORNBERG, A. & BAKER, T.A. **DNA Replication**. 2 ed. W. H. Freeman and Company, New York. 1992.
- LANGEVELD, S.A.; DORE, J.M.; MEMELINK, J.; DERKS, A.F.L.M.; VAN DER VLUGT, C.I.M.; ASJES, C.J. & BOL, J.F. Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers. **J. Gen. Virol.**, v. 72, p. 1531-1541, 1991.
- LAUFS, J.; TRAUT, W. & HEYRAUD, F. *In vitro* cleavage and joining at the viral origin of replication by the replicator initiator protein of tomato yellow leaf curly virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 92, p.3879-3883, 1995.
- LAZAROWITZ, S.G.; PINDER, A.J.; DAMSTEEGT, V.D. & ROGERS, S.G. Maize streak virus genes essential for systemic spread and symptom development. **EMBO J.**, v. 8, p. 1023-1032, 1989.
- 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. Geminiviruses: Genome structure and gene function. **Crit. Rev. of Plant Sci.**, v.11, p. 327-349, 1992.

- LIMA, W.R. *Caracterização molecular de um novo geminivírus no Brasil, Tomato Rugose Mosaic Virus*. Tese de Mestrado. Pós-Graduação em genética e Bioquímica. Universidade Federal de Uberlândia. 96p. 2000.
- MACKEY, J., GUAN, N. & RASHTCHIAN, A. Direct enzyme coupling to oligonucleotide probes for increased sensitivity and simplified nonradioactive detection. *Focus*, v.14, p. 112-116, 1992.
- MARUYA, E.; SAJI, H. & YOKOYAMA, S. 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 Res.*, v. 6, p. 51-57, 1996.
- MERTZ, L. M.; WESTFALL, B. & RASHTCHIAN, A. PCR nonradioactive labeling system for synthesis of biotinylated DNA probes. *Focus*, v. 16, p. 49-51, 1994.
- MORRIS-KRISINICH, B.A.M.; MULLINEAUX, P.M.; DONSON, J.; BOULTON, M.I.; MARKHAM, P.G.; SHORT, M.N. & DAVIES, J.W. Bidirectional transcription of maize streak virus DNA and identification of the coat protein gene. *Nucleic Acids Res.*, v. 13, p. 7237-7255, 1985.
- MUNIYAPPA, V. Whiteflies. In: *Vectors of Plant Pathogens* (Harris, K.F. & Maramorosch, K., eds.). Academic Press, New York, p. 39-85, 1980.
- MURPH, F.A.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.A.; JARUIS, A.W.; MARTELLI, G.P.; MAYO, M.A. & SUMMERS, M.D. Virus Taxonomy: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Virus. *Arch. of Virology*, v. 10 (Suplement), p. 158-165, 1995.
- NAGAR, S.; PEDERSON, T.J. & CARRICK, K. A geminivirus induces expression of a host DNA replication protein terminally differentiated plant cells. *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 plasmodesmal transport. *Cell*, v. 76, p. 925-932, 1994.
- ORITA, M.; IWAHAMA, H.; KANAZAWA, H.; HAYASHI, K. & SEKIYA, T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as

- single-strand conformation polymorphisms. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.86, p. 2766-2770, 1989.
- OROZCO, B.M.E. & HANLEY-BOWDOIN, L. A DNA structure is required for geminivirus replication origin function. **J. of Virology**, v. 70, p. 148-158, 1996.
- PADIDAM, M.; BEACHY, R.N. & FAUQUET, C.M. Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. **J. Gen. Virol.** v.76, p. 249-263, 1995.
- PASCAL, E.; SANDERFOOT, A.A.; WARD, B.M.; MEDVILLE, R.; TURGEON, R. & LAZAROWITZ, S.G. The geminivirus BR1 movement protein binds single-stranded DNA and localizes to the cell nucleus. **Plant Cell**, v. 6, p. 995-1006, 1994.
- PEPIN, R.A.; LUCAS, D.J.; LANG, R.B.; LEE, N.; LIÃO, M.J. & TESTA, D. Detection of picogram amounts of nucleic acid by dot-blot hybridization. **Biotechniques**, v. 8, p. 628-632, 1990.
- PETTY, I.T.D.; MILLER, C.G. & MEADE-HASH, T.J. Complementable and noncomplementable protein binds single-stranded DNA localizes to the cell nucleus. **The Plant Cell**, v. 6, p. 995-1006, 1994.
- PICÓ, B.; DÍOZ, M.J. & NUEZ, F. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The tomato yellow leaf curl virus - a review. **Scientia Horticulturae**, v. 67, p. 151-196, 1996.
- POLSTON, J.E. Host range of tomato mottle virus, a new geminivirus infecting tomato in Florida. **Plant Dis.**, v. 77, p. 1181-1184, 1993.
- POLSTON, J.E. & ANDERSON, P. K. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. **Plant Dis.**, v. 81, p.1358-1369, 1997.
- POOMA, W.; GILLETE, W.K. & JEFREY, J.L. Host and viral factors determine the dispensability of coat protein for bipartite geminivirus systemic movement. **Virology**, v. 218, p. 264-268, 1996.
- POPESCU, O. A simple method for drying polyacrilamide slabs gels using glycerol and gelatin. **Electrophoresis**, v. 4, p. 432-435, 1993.

- RASHTCHIAN, A. & MACKEY, J. Efficient synthesis of biotinylated DNA probes using polymerase chain reaction. *Focus*, v. 14, p. 64-65, 1992.
- REVINGTON, G.N.; SUNTER, G.; BISARO, D.M. DNA sequences essential for replication of the B genome component of tomato golden mosaic virus. *Plant Cell*, v. 1, p. 985-992, 1989.
- RIBEIRO, S.G.; MELO, L.V.; BOITEUX, L.S.; KITAJIMA, E.W. & FARIA, J.C. Tomato infection by a geminivirus in the Federal District, Brazil (Abstr.). *Fitopatologia Brasileira* 19 (Suplemento): 430, 1994.
- RIGDEN, J.E.; DRY, I.B.; MULLINEAUX, P.M. & REZAIAN, M.A. Mutagenesis of the virion-sense open reading frames of tomato leaf curl geminivirus. *Virology*, v. 193, p. 1001-1005, 1993.
- ROGERS, S.G.; BISARO, D.M.; HORSCH, R.B.; FRALEY, R.T.; HOFFMANN, N.L.; BRAND, L.; ELMER, J.S. & ILOYD, A.M. Tomato golden mosaic virus A component DNA replicates autonomously in transgenic plants. *Cell*, v. 45, p. 593-600, 1986.
- ROJAS, M.R.; GILBERTSON, R.L.; RUSSELL, 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.
- RYBICKI, E.P. & HUGHES, F. L. Detection and typing of maize streak virus and other distantly related geminiviruses of grasses by polymerase chain reaction amplification of a conserved viral sequence. *J. Gen. Virol.*, v. 71, p. 2519-2526, 1990.
- RYBICKI, E.P. A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of Geminiviridae. *Arch. of Virology*, v. 134, p. 49-77, 1994.
- SCHALK, H.-J.; MATZEIT, V.; SCHILLER, B.; SCHELL, J. & GRONENBORN, B. Wheat dwarf virus, a geminivirus of graminaceous plants needs splicing for replication. *EMBO J.*, v. 8, p. 359-364, 1989.
- SHOCK, T.L. & GOODMAM, R.M. Time-course studies on virus titer and DNA component ratio in beans infected with bean golden mosaic virus. *Phytopathology*, v. 71, p. 80-82, 1981.

- SONNENBERG, A.S. M.& ZANDT-LINDERS, J.W.C. The use of a nonradioactive nucleic acid detection system in the breeding of mushrooms. *Focus*, v. 14, p. 62-64, 1992.
- STANLEY, J.; LATHAM, J.R.; PINNER, M.S.; BEDFORD, I. & MARKHAM, P.G. Mutational analysis of the monopartite geminivirus beet curly top virus. *Virology*, v. 191, p. 396-405, 1992.
- SUNTER, G.; GARDINER, W.E.; RUSHING, A.E.; ROGERS, S.G. & BISARO, D.M. Independent encapsidation of tomato golden mosaic virus A component DNA in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.*, v. 8, p. 477-484, 1987.
- SUNTER, G.; GARDINER, W.E. & BISARO, D.M. Identification of tomato golden mosaic virus-specific RNAs in infected plants. *Virology*, v. 170, p. 243-250, 1989.
- SUNTER, G.; HARTITZ, M.D.; HORMUZDI, 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.
- 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.
- TIMMERMANS, M.C.P., PREMDAS, O.E., MESSING, J. Geminiviruses and their uses as extrachromosomal replicons. *Ann. Rev. of Plant Biol.*, v. 45, p. 79-112, 1994.
- TIZZARD, R.; CATE, R.L.; RAMACHANDRAN, K.L.; WYSK, M.; VOYTA, J.C.; MURPHY, O.J. & BRONSTEIN, I. Imaging of DNA sequences with chemiluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 87, p.4514-4518, 1990.
- TOMENIUS, K.; CLAPHAM, D. & MESHI, T. Localization by immunogold cytochemistry of the virus-coded 30K protein in the plasmodesmata of leaves infected with tobacco mosaic virus. *Virology*, v. 160, p. 363-371, 1987.

- WARTIG, L.; KHEYRPOUR, A.; NORIS, E.; DEKOUCHKOVSKY, F.; JOUANNEAU, F.; GRONENBORN, B. & JUPIN, I. Genetic analysis of the monopartite tomato yellow leaf curl geminivirus: Roles of V1, V2, and C2 ORFs in viral pathogenesis. **Virology**, v. 228, p. 132-140, 1997.
- WOLF, S.; DEOM, C.M.; BEACHY, R.N. & LUCAS, W.J. Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. **Science**, v. 246, p. 377-379, 1989.
- WOOLSTON, C.J.; REYNOLDS, H.V.; STACEY, N.J. & MULLINEAUX, P.M. Replication of wheat dwarf virus DNA in protoplasts and analysis of coat protein mutants in protoplasts and plants. **Nucleic Acids Res.**, v. 17, p. 6029-6041, 1989.
- ZERBINI, F.M.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; FERNANDES, J.J.; GILBERTSON, R.L. & CARRIJO, I.V. Um novo geminivírus isolado de tomateiro (*L. esculentum* L.) em Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira** 21 (Suplemento): 430, 1996.

ÍNDICE REMISSIVO

T

BCTV, 6

Bemisia tabaci, 12

BGMV, 6, 10, 18, 49

BYDV, 23

C

Componente,

A, 6, 7, 45

B, 6, 7, 45

CRLV, 36

D

Densidade óptica, 32, 36

G

Gama de hospedeiros, 13, 17-18, 38-39, 42

Geminiviridae, 1, 11

Geminivirus,

bipartido, 1, 5, 6, 14

monopartido, 1, 5

Gene,

AL1, 7, 10

AL2, 7, 14-15

AL3, 7, 10

AL4, 7

AR1, 7, 15, 49

BR1, 7, 14-16, 18

BL1, 7, 14-15, 18

Gênero,

Begomovirus, 5, 18

Curtovirus, 6, 18

Mastrevirus, 5, 18

H

Hibridação,

Dot-blot, 23, 36

Slot-blot, 30, 33-34

M

Mapa genômico, 46, 48

Movimento sistêmico,
chaperonas, 15

nuclear shuttle protein, 16

MSV, 5

N

Nicotiana benthamiana, 15, 18

P

PCR, 19, 21, 23, 28, 42

Primer, 19, 29, 42

PYMV, 49

R

Replicação,

círculo rolante, 9-10

forma replicativa, 9

RFLP, 32, 46

S

Sintomatologia, 16, 38-39, 42

Sonda,

biotinilada, 22, 23, 29

Subgrupo,

I, 1, 5, 8, 12, 18

II, 1, 6, 7, 12, 18

III, 1, 5, 6, 11, 18

SSCP, 19, 31, 45-46

T

TGMV, 1, 6, 10, 15-16, 18, 51

ToMoV, 49

Transmissão, 1, 11

TRMV, 46, 49

V

Vetor,

cigarrinha, 1, 12

mosca branca, 1, 12