

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**ESTUDOS BIOLÓGICOS E MOLECULARES DE BEGOMOVÍRUS
INFECTANDO PIMENTÃO (*Capsicum annuum*) NO ESTADO DE
SÃO PAULO.**

DENISE NAKADA NOZAKI

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP - Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU-SP
Janeiro – 2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**ESTUDOS BIOLÓGICOS E MOLECULARES DE BEGOMOVÍRUS
INFECTANDO PIMENTÃO (*Capsicum annuum*) NO ESTADO DE
SÃO PAULO.**

DENISE NAKADA NOZAKI

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Agenor Pavan
Co-Orientadora: Profa Dra. Renate Krause Sakate

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP - Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU-SP
Janeiro – 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO
UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Nozaki, Denise Nakada -
N961e Estudos biológicos e moleculares de begomovirus infectando pimentão (*Capsicum annuum*) no Estado de São Paulo / Denise Nakada Nozaki. - Botucatu: [s.n.], 2007.
xiii, 94f. : il. color., tabs.

Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2007

Orientador: Marcelo Agenor Pavan
Co-orientador: Renate Krause Sakate
Inclui bibliografia

1. Pimentão. 2. Vírus - Transmissão. 3. Biologia molecular. 4. Begomovirus. 5. Microscopia eletrônica. I. Pavan, Marcelo Agenor. II. Sakate, Renate Krause. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO: " ESTUDOS BIOLÓGICOS E MOLECULARES DE BEGOMOVIRUS
INFECTANDO PIMENTÃO (Capsicum annuum) NO ESTADO
DE SÃO PAULO"**

ALUNA: DENISE NAKADA NOZAKI


ORIENTADOR: PROF. DR. MARCELO AGENOR PAVAN

CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. RENATE KRAUSE SAKATE

Aprovado pela Comissão Examinadora



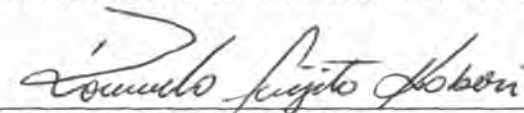
PROF. DR. MARCELO AGENOR PAVAN



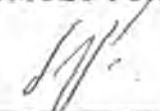
PROF. DR. ANTONIO CARLOS MARINGONI



PROF. DR. MURILO FRANCISCO ZERBINI JUNIOR



DR. ROMULO FUJITO KOBORI



DR. VALDIR ATSUSHI YUKI

Data da Realização: 23 de janeiro de 2007.

“Ao admirarmos a mais bela construção sabemos que ela não teria sido efetuada senão a partir do primeiro tijolo e com a ajuda de uma equipe de trabalhadores. Portanto o mundo de paz, harmonia e amor com que tanto sonhamos só será construído a partir de pequenos gestos de compreensão, solidariedade, respeito, ternura e perdão de cada um, no dia-a-dia. Ninguém sozinho conseguirá mudar o mundo, no entanto podemos fazer parte de uma pequena parcela que poderá se ampliar. Tentar vale a pena!”

Aos meus pais Hiroyuki Nozaki e Auria Nakada Nozaki pela educação, amor, e que sempre me apoiaram e fizeram de tudo em sua vida para tornar esta empreitada possível.

Dedico inteiramente este trabalho.

OFEREÇO

A coisa mais graciosa e fofa surgiu neste período, que é a minha sobrinha Letícia e as minhas irmãs Gisele, Cristiane e Priscila pela existência em minha vida,

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelas concessões nem sempre percebidas e/ou compreendidas;

Ao Prof. Dr. **Marcelo Agenor Pavan** pela orientação, confiança, apoio e ensinamentos;

À Profa. Dra. **Renate Krause-Sakate** pela orientação, apoio, paciência, ensinamentos, e principalmente pela sua amizade;

À **CAPES**, pelo auxílio financeiro, através de concessão de bolsa de Doutorado;

A **FAPESP**, pela concessão do Auxílio Projeto;

Ao Dr. **Valdir Atsushi Yuki**, pelos ensinamentos, amizade e auxílio na transmissão de vírus por mosca-branca;

Ao Prof. **Dr. Francisco Murilo Zerbini Júnior**, pela amizade e auxílio em diversas etapas no andamento do projeto;

À **Sakata Seed América**, pela concessão das sementes de pimentão;

Aos amigos **Fabio Augusto Manetti, Jorge Massaki Hasegawa,**

Pedro Henrique Dziuba e Nobuyoshi Narita, pela amizade e colaboração nas coletas;

Ao colega **Alison Talis Martins Lima**, que me ajudou com o bombardeamento de plantas em Viçosa.

Aos funcionários deste departamento **Paulo Roberto Rodrigues, Domingues Paulossi e Norberto Vaz de Carvalho**, pela ajuda no preparo de materiais e na condução deste trabalho;

Ao professor **Antônio Carlos Maringoni**, pela paciência como coordenador de curso no período do trabalho e pela amizade;

Aos **professores e funcionários** do Departamento de Produção Vegetal da FCA – UNESP, pelos ensinamentos e colaboração;

A todos os **alunos do laboratório de Virologia Vegetal** da Universidade Federal de Viçosa que foram todos muito legais e receptivos quando fui realizar meu trabalho;

Aos meus amigos e colegas **Ana Carolina, Simone Takahashi, Viviane, Adriana, Nádia, Alnusa, Márcio, Renan, Gerson, Kelly, Júlio, Mônica, D. Margarida e D. Elza** pela diversão, companheirismo, ensinamentos e amizade;

As funcionárias **Marlene, Jaqueline e Marilena** da Seção de Pós-Graduação, pela simpatia e paciência com os alunos;

A todos os funcionários da Biblioteca desta Faculdade, pela ajuda em busca de literatura, pela paciência, simpatia e amizade.

À Faculdade de Ciências Agrônômicas – UNESP, pela formação e oportunidades concedidas;

A todos que direta e indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
1. RESUMO	1
2. SUMMARY.....	3
3. INTRODUÇÃO.....	5
4. REVISÃO DE LITERATURA	7
4.1 Taxonomia e etiologia do gênero <i>Begomovirus</i>	7
4.2. Organização do genoma e replicação do gênero <i>Begomovirus</i>	8
4.3. Importância epidemiológica dos begomovírus.....	11
4.4. Modalidade de transmissão do vírus	14
4.5. Modificação citológica no hospedeiro.....	16
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
5.1. Local do experimento	18
5.2. Coleta de material vegetal e preservação	18
5.3. Extração de DNA total e detecção viral	21
5.4 Sequenciamento e análise do DNA-A.....	23
5.5. Clonagem do DNA-A e DNA-B do isolado de ToSRV[PJU] coletado de pimentão em Pirajú, São Paulo.	23
5.5.1. DNA-A.	24
5.5.2. DNA-B.	26
5.6. Caracterização biológica.....	29
5.6.1. Transmissão por extrato vegetal	29
5.6.2. Transmissão por enxertia.....	30

5.6.3. Transmissão com seringa	30
5.6.4. Transmissão por mosca-branca	30
5.6.5. Transmissão por biobalística	32
5.7 Análise citológica	34
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
6.1. Detecção viral e análise da diversidade genética.....	35
6.2. Caracterização do genoma viral	43
6.3. Caracterização biológica.....	52
6.3.1. Transmissão por extrato vegetal.....	52
6.3.2. Transmissão por enxertia	53
6.3.3. Transmissão com seringa utilizando o DNA amplificado por Templi Phi	55
6.3.4. Transmissão por biobalística.....	55
6.3.5. Transmissão por mosca branca	56
6.4 Caracterização citológica.....	60
7. CONCLUSÕES	65
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
9. APÊNDICE.....	74

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Relação das amostras coletadas, localidade e histórico da área.....	20
Tabela 2. Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR e para as reações de sequenciamento dos isolados de begomovírus.....	22
Tabela 3. Lista de oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento do componente A e B do ToSRV[PJU].....	28
Tabela 4. Presença de begomovirus em pimentão diagnosticado por PCR.....	36
Tabela 5. Porcentagem de identidade entre as seqüências de nucleotídeos parciais do gene <i>cp</i> de begomovírus e os 18 isolados coletados de pimentão no estado de São Paulo, obtido através de Clustal W.	41
Tabela 6. Comparação da porcentagem de identidade das seqüências de nucleotídeos dos genes do componente A do genoma de diferentes espécies de begomovírus.....	47
Tabela 7. Porcentagem de identidade de nucleotídeos das ORFs BC1 e BV1 presente no DNA-B de diferentes espécies de begomovírus.	51
Tabela 8. Relação de plantas hospedeiras utilizadas para avaliação e sintomas observados do isolado ToSRV[PJU] transmitidos por mosca-branca.....	57

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Organização típica do genoma de begomovírus bipartido, <i>Bean golden mosaic virus</i> , composto de aproximadamente de 2,6 kb.....	9
Figura 2. Mapa representativo dos locais de coleta das amostras de pimentão no Estado de São Paulo.	19
Figura 3. Localização dos oligonucleotídeos no componente A de begomovírus. As ORFs representadas pelas setas pretas, com suas respectivas denominações. Na figura: V representa o sentido viral e C o sentido complementar.	26
Figura 4. Localização dos oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento do DNA-B do ToSRV[PJU]. As ORFs são representadas pela setas pretas, com suas respectivas denominações. Na figura V representa o sentido viral e C o sentido complementar.....	27
Figura 5. A) Gaiola de garrafa plástica, utilizada no experimento de transmissão de begomovirus. B) Plantas testes em gaiola de vidro com mosca branca para adquirir o vírus.	31
Figura 6. A) Foto de parte do equipamento, câmara formadora de vácuo, onde coloca-se a planta para ser bombardeada.; B) Membrana carreadora, com partículas de tungstênio envolto com DNA viral; C) Plantas de tomates e pimentão (no fundo) para serem bombardeadas, com o primeiro par de folhas formada.	33
Figura 7. PCR com os oligonucleotídeos universais PALIv1978/PAR1c496 para detecção de begomovírus. M= marcador de comprimento (1 kb DNA ladder, Invitrogen). Amostras 4, 5, 6, 7, 8, 11 e 13= plantas positivas; 14= planta sadia, 15= controle positivo e 16= água.....	37
Figura 8. PCR para detecção de begomovírus com os oligonucleotídeos PrV324 e PrC889. M= marcador de comprimento (1 kb DNA ladder, Invitrogen). Amostras 1 a 7= isolados; 8 = água e 9 = controle positivo.	37

- Figura 9. Árvore filogenética baseada na sequencia parcial de nucleotídeos do gene que codifica a proteína capsidial obtida pelo programa MEGA v3.1 utilizando-se método de neighbor-joining, com valor de "bootstrap" 2000. 39
- Figura 10. Clivagem do DNA genômico do ToSRV amplificado com a enzima Templi Phi. M = marcador de comprimento (1kb DNA ladder), 1= *BamH* I, 2= *Xho* I, 3= *Kpn* I, 4= *Pst* I, 5= *EcoR* I, 6= *Hpa* II, 7= *Sph* I, 8= *Xba* I, 9= *Hind* III..... 43
- Figura 11. Clivagem do possível clone recombinante com enzimas de restrição. M: marcador de comprimento (1 kb DNA ladder, Invitrogen), 1= DNA plasmidial do clone 190p clivado com *Xba* I, 2= DNA plasmidial do clone 190p clivado com *Hind* III e 3= DNA plasmidial do clone 190p clivado com *Hind* III e *Xba* I. 44
- Figura 12. Clivagem com *Hind* III e *Xba* I dos clones positivos por PCR (amostra 1 a 5), M: marcador de comprimento (1 kb DNA ladder, Invitrogen). 44
- Figura 13. Representação esquemática do clone recombinante correspondente ao DNA-A completo do isolado 190p, clonado no vetor pks+. Os sítios de clivagem das enzimas *BamH* I, *Xba* I e *Hind* III estão indicados, assim como os comprimentos dos fragmentos gerados após a clivagem com essas enzimas..... 45
- Figura 14. PCR com oligonucleotídeos desenhados para complementar a seqüência genômica do DNA-A de ToSRV. M= marcador de comprimento (1 kb DNA ladder, Invitrogen); HML= marcador de peso (High mass ladder, Invitrogen); 1= amplificação com GemiA1081/2422; 2= amplificação com GemiA1664/297; 3= amplificação com GemiA1876/1202 e 4= amplificação com GemiA2146/297..... 45
- Figura 15. Representação esquemática dos fragmentos seqüenciados com oligonucleotídeos especificados, formando o consenso correspondente ao genoma completo do DNA-A do ToSRV[PJU]. 46
- Figura 16. PCR do componente B de ToSRV. M= marcador de comprimento (1 kb DNA ladder, Invitrogen); HML= marcador de peso (High mass ladder, Invitrogen); 1= amplificação com oligonucleotídeos universais PPBL1v2040 e PCRc1 e 2= amplificação com os oligonucleotídeos GemiBa2 e GemiBs3. 48
- Figura 17. PCR com oligonucleotídeos desenhados para complementar a seqüência genômica do DNA-A de ToSRV. M= marcador de comprimento (1 kb DNA

- ladder, Invitrogen); 1= amplificação com GemiB369s/1163a; 2= amplificação com GemiB182s/1024a; 3= amplificação com GemiB1559a/Bs1 e 4= amplificação com GemiB1665a/Ba3 49
- Figura 18. Alinhamento das sequências de nucleotídeos de parte da Região Comum de ToSRV[PJU]-A e ToSRV[PJU]-B e de outros begomovirus. Os elementos conservados (iterons) implicados na replicação, estão indicados sob o alinhamento..... 50
- Figura 19. Representação esquemática dos fragmentos sequenciados com oligonucleotídeos especificados, formando o consenso correspondente ao genoma completo do DNA-B do ToSRV-B[PJU]. 50
- Figura 20. *Nicandra physaloides* inoculada via extrato vegetal a partir de *Nicotiana benthamiana* apresentando A) mosaico internerval e B) drástica redução do tamanho (observar planta sadia ao lado de infectada)..... 52
- Figura 21. Foto A e B, mostrando a combinação de planta enxertado (enxerto + porta enxerto) com sintomas de distorção foliar, nervuras rendilhadas, tortuosas e enrolamento das folhas. 54
- Figura 22. PCR com os oligonucleotídeos universais PALIv1978/PAR1c496 para begomovírus para diagnose de enxertos e porta enxertos. M= marcador de comprimento (1 kb DNA ladder, Invitrogen), A= água; E1= enxerto da planta 1; C1= porta-enxerto da planta 1; E2= enxerto da planta 2; C2= porta-enxerto da planta 2; E3= enxerto da planta 3; C3= porta-enxerto da planta 3..... 54
- Figura 23. A) *N. benthamiana* inoculada por biobalística com RF apresenta enrugamento foliar e redução no tamanho da planta B) Tomate ‘Rutgers’ quando inoculado por biobalística com Templi Phi do ToSRV[PJU], apresentou amarelecimento foliar e mosaico. 56
- Figura 24. Observação de sintomas 30 dias após a transmissão de vírus com mosca-branca virulíferas. A) *Chenopodium amaranticolor*, pontos cloróticos; B) *Physalis floridana*, clareamento de nervura e enrugamento foliar e C) *Nicandra physaloides*, mosaico e enrugamento foliar. 58

- Figura 25. Eletrofotomicrografia de células associadas ao tecido vascular de pimentão Lilac sadio. Seta indica nucléolo em célula sadia. Aumento 7.750 X. 61
- Figura 26. Eletrofotomicrografia de células associadas ao tecido vascular de pimentão Lilac infectado pelo ToSRV[PJU]. A-segregação do nucléolo (N) em célula infectada. B-seta indica a formação de pequeno anel fibrilar e nucléolo e estágio mais avançado de segregação. Aumento 9.750 X e 13.250X, respectivamente. 62
- Figura 27. Eletrofotomicrografia de células associadas ao tecido vascular de pimentão Lilac infectado pelo ToSRV[PJU]. A) Anel fibrilar formado a partir do nucléolo segregado em célula infectada e B) setas indicam o anel fibrilar maior e e pequenos anéis. Aumento 9.750 X e 31.500X, respectivamente..... 63
- Figura 28. Eletrofotomicrografia de nervura foliar de Pimentão Lilac infectada por ToSRV [PJU]. Observação de grânulos no interior da mitocôndria. Aumento 23.000X..... 63
- Figura 29. Setas indicando os grânulos de cristais observados em células de plantas sadia (A) e em células de planta infectada por ToSRV[PJU]. Aumento 7750X e 23000X respectivamente. 64
- Figura 30. Sequência completo de ToSRV-A [PJU], indicando os genes e a tradução em proteína. A disposição do formato é semelhante ao encontrado no NCBI. Em vermelho e grifado representa o nanonucleotídeo conservado e em azul grifado o tata Box. 79
- Figura 31. Alinhamento das seqüências completas de ToSRV-A [PJU], com outras 2 sequencias de ToSRVe uma de ToRMV isolados brasileiros encontradas no GenBank. Em negrito mostra o TATA Box e o nanonucleotídeo. 85
- Figura 32. Sequência completa de ToSRV-B [PJU], indicando os genes e a tradução em proteína. A disposição do formato é semelhante ao encontrado no NCBI. Em vermelho e grifado representa o nanonucleotídeo conservado e em azul grifado o tata Box. 89
- Figura 33. Alinhamento da seqüência de nucleotídeos do ToSRV-B [PJU], ToRMV (AF291706) e sequencia parcial de ToSRV AY029751. Os elementos relevantes para a replicação do DNA viral estão indicados. 94

1. RESUMO

Os vírus pertencentes ao gênero *Begomovirus* da família *Geminiviridae* são transmitidos pela mosca-branca *Bemisia tabaci* Gennadius, atualmente constituem um dos problemas fitossanitários mais sérios em diversas culturas. A mosca-branca encontra-se disseminada em todas as principais regiões produtoras de hortaliças do Brasil. No estado de São Paulo, em 2005, plantas de pimentão mostrando sintomas de deformação dos frutos, folhas e mosaico foliar, apresentaram-se infectadas por begomovírus. Até então, no Brasil, a infecção de pimentão por vírus deste gênero havia sido verificada apenas nos estados de Pernambuco e Bahia, no ano de 1997.

Amostras de plantas de pimentão foram coletadas nos campos de produção localizados nos municípios de Paranapanema, Piraju, Alvinlândia, Ubirajara, Elias Fausto, Mogi Guaçu, Paulínia e Botucatu, no período de novembro de 2004 a maio de 2006, com finalidade de detecção e verificar a variabilidade genética dos begomovírus infectando esta cultura. A detecção de begomovírus foi realizada por meio de PCR com oligonucleotídeos universais e seqüenciamento de parte da região codificadora para a proteína capsidial. Do total de 228 plantas coletadas, foram encontradas 30 amostras positivas de begomovírus, sendo que

seqüências de 23 isolados apresentaram uma identidade de nucleotídeos de 98 a 100% com o *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e dois isolados, um proveniente da região de Alvinlândia e outro de Mogi Guaçu, apresentaram maior identidade (98 e 95% respectivamente) com a provável espécie *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV).

O DNA-A do isolado ToSRV[PJU] coletado de pimentão Lilac da região de Pirajú apresentou identidade de nucleotídeos de 99% com outro isolado de ToSRV (DQ207749) proveniente de pimenta e 97% com um isolado de ToSRV (AY029750) proveniente de tomate. A seqüência do DNA-B do ToSRV[PJU] apresentou identidade de 98% com o DNA-B do ToRMV (AF291706) do Triângulo Mineiro, Minas Gerais e 95% com ToSRV (AY029751).

Foi verificada transmissão via extrato vegetal tamponado para *Nicandra physaloides* e pimentão ‘Magda’ utilizando-se somente como fonte de inóculo *Nicotiana benthamiana*. Pela mosca branca, o vírus foi transmitido para as espécies *Lycopersicon esculentum* ‘Santa Clara’; *Capsicum annuum* cv ‘Magali R’, ‘Magda’, ‘Rubia R’, ‘Martha’, ‘Bruna’, ‘Paloma’, ‘Impacto’, ‘Italiano amarelo’, ‘Doce comprido-tipo americana’; *Capsicum frutescens*; *Nicotiana rustica*; *Nicotiana clevelandii*; *Physalis floridana*; *Nicandra physaloides*; *Petunia hybrida*; *Chenopodium amaranthicolor*; *Phaseolus vulgaris* cv. ‘Pérola’ e *Vigna unguiculata*.

O isolado ToSRV[PJU] foi transmitido via biobalística para *N. benthamiana*, tomate ‘Rutgers’ e pimentão ‘Casca Dura Ikeda’. A análise citológica sob microscópio eletrônico de transmissão possibilitou a visualização de anéis formados a partir do nucléolo, nucléolos com segregação parcial de seu conteúdo e inclusões presentes no interior das mitocôndrias.

Palavra-chave: Begomovírus, caracterização molecular, biológica e citológica, *Capsicum annuum*.

MOLECULAR AND BIOLOGICAL ANALYSIS OF BEGOMOVIRUS INFECTING PEPPER (*Capsicum annuum*) IN SÃO PAULO STATE. BOTUCATU, 2007. 95 p.

Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: DENISE NAKADA NOZAKI

Adviser: MARCELO AGENOR PAVAN

Co-adviser: RENATE KRAUSE SAKATE

2. SUMMARY

The viruses belonging to the genus *Begomovirus*, of the family *Geminiviridae*, are transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci* Gennadius, and considered one of the most important fitosanitary problems for several crops. The whitefly is disseminated throughout the country. In São Paulo State, 2005, pepper plants showing fruits deformations, and mosaic on the leaves were infected by begomovirus. Until then in Brazil, the infection of begomovirus in pepper was only reported in 1997, in Pernambuco and Bahia States.

Pepper plants were collected in Paranapanema, Piraju, Alvinlândia, Ubirajara, Elias Fausto, Mogi Guaçu, Paulínia and Botucatu, in the period of November of 2004 to May of 2006, with the aim to study the genetic variability of the begomovirus infecting this culture. The begomovirus were detected by PCR using universal oligonucleotídeos and the coat protein region was sequenced. On the total of 228 samples, they were found 30 positive samples of begomovirus, and sequences of 23 isolated presented nucleotides identities of 98 to 100% with *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), while two isolates, one of Alvinlândia and another of Mogi Guaçu, showed identity highest nucleotide (98 and 95% respectively) with the tentative species *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV).

The nucleotide sequence of the DNA-A of ToSRV[PJU] from pepper cv. Lilac of Pirajú has 99% nucleotide identities with other isolate of ToSRV (DQ207749) collected from pepper and 97% with an isolate of ToSRV (AY029750) from tomato. The sequence of the DNA-B revealed identity of 98% with the DNA-B of ToRMV (AF291706) from Triângulo Mineiro, Minas Gerais and 95% with ToSRV (AY029751).

Sap-transmission was verified for *Nicandra physaloides* and pepper 'Magda' using infected *N. benthamiana* as source. By whitefly the virus was transmitted to *Lycopersicon esculentum* 'Santa Clara'; *Capsicum annuum* cv 'Magali R', 'Magda', 'Rubia R', 'Martha', 'Bruna', 'Paloma', 'Impacto', 'Italiano amarelo', 'Doce comprido'; *Capsicum frutescens*; *Nicotiana rustica*; *Nicotiana clevelandii*; *Physalis floridana*; *Nicandra physaloides*; *Petunia*; *Chenopodium amaranthicolor*; *Phaseolus vulgaris* cv. 'Pérola' and *Vigna unguiculata*.

The ToSRV[PJU] was transmitted by biobalistic to *N. benthamiana*, tomato cv. 'Rutgers ' and pepper 'Ikeda Casca Dura'. The cytological analysis under electronic microscope of transmission made possible the visualization of fibrillar rings formed of the nucleolus, nucleolus with partial segregation and inclusions inside the mitochondria.

Keywords: *Begomovirus*, molecular, biological and cytological characterization, *Capsicum annuum*.

3. INTRODUÇÃO

O pimentão, por ser uma hortaliça muito apreciada no Brasil, possui grande importância comercial. No Estado de São Paulo, em 2004, foram cultivados aproximadamente 2,6 mil hectares, com uma produção de aproximadamente 68 mil toneladas gerando um rendimento médio de 26 t/ha (IEA, 2005). Em 2005, nos seis primeiros meses a exportação brasileira de pimenta e pimentão atingiu 120 toneladas (Agrianual, 2006). A intensificação no uso de estufas tem favorecido o aumento da produção da hortaliça, pois possibilita a extensão do tempo de colheita e cultivo em épocas de clima adverso, como chuvas intermitentes e temperaturas extremas. O cultivo, a comercialização e o processamento deste produto são atividades de grande importância social, pois funcionam como fonte geradora de empregos diretos e indiretos.

Durante o desenvolvimento e produção, a cultura de pimentão é afetada por doenças de origens bióticas e abióticas. O sucesso na produção depende, em grande parte, de cuidados dispensados ao controle de doenças, insetos e nematóides. O nível de produtividade e qualidade dos frutos será tanto melhor quanto menor for a incidência desses problemas.

Nos últimos anos, os problemas fitossanitários associados a insetos do

gênero *Bemisia* (Homoptera:Aleyrodidae) tornaram-se cada vez mais freqüentes em tomateiros e pimentões cultivados em todo o mundo (Naranjo & Ellsworth, 2001). Uma das principais conseqüências do aumento populacional desse inseto, popularmente denominado mosca-branca, tem sido o aumento na incidência de vírus pertencentes à família *Geminiviridae*, gênero *Begomovirus* (Polston & Anderson, 1997; Ribeiro et al., 1998; Moriones & Navas-Castillo, 2000; Morales & Anderson, 2001).

A mosca branca *B. tabaci* é considerada uma das principais pragas do século 20. Desde os anos de 1950, *B. tabaci* causou perdas significativas nas regiões agrícolas tropicais e subtropicais nos cinco continentes do mundo (Morales, 2001). As condições climáticas da maior parte do território do Brasil permitem o cultivo de várias espécies de plantas durante o ano todo, ou apenas uma única espécie vegetal pode ser cultivada em qualquer época do ano, desde que haja suprimento de água. Tais condições favorecem a multiplicação contínua da mosca-branca (Faria et al., 2000). Segundo Morales & Jones (2004), a área favorável à sobrevivência e ao aumento populacional de mosca-branca apresenta uma temperatura ótima que flutua entre 15-33°C e extenso período de tempo sem chuva abundante, o que inclui o estado de São Paulo dentro desta área.

Relatos de begomovírus infectando tomateiro vem sendo divulgados desde a década de 90 (Zerbini et al., 1996; Faria et al., 1997; Ribeiro et al., 1998; Ambrozevicius et al., 2002). Em pimentão, infecção por begomovírus foi observada em amostras coletadas no ano de 1997 nos estados da Bahia e Pernambuco (Lima et al., 2001) e em 2005 no estado de São Paulo (Nozaki et al., 2006). Devido às poucas informações sobre as espécies ocorrendo em pimentão, iniciou-se uma análise da variabilidade genética dos isolados coletados em diferentes regiões produtoras no estado de São Paulo e a caracterização biológica, molecular e citológica de um dos isolados (ToSRV[PJU]) proveniente de Pirajú, São Paulo. Esses estudos servirão como base para um trabalho de melhoramento genético do pimentão visando a obtenção de plantas resistentes a begomovírus.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Taxonomia e etiologia do gênero *Begomovirus*

Os vírus pertencentes à família *Geminiviridae* são caracterizados pela morfologia de partículas icosaédricas geminadas e genoma composto por DNA de fita simples circular (Hanley-Bowdoin et al., 1999; Stanley et al., 2005). A família é dividida nos gêneros *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus*, com base no número de componentes do genoma, tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros e relacionamento filogenético (Stanley et al., 2005).

No gênero *Begomovirus* são incluídas as espécies com dois componentes genômicos, transmitidas pela mosca-branca, *Bemisia tabaci* para plantas dicotiledôneas, sendo o membro tipo o *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV). Desde a constatação deste gênero, mais de 100 espécies distintas foram relatadas (Stanley et al., 2005). Os begomovírus podem ser divididos em dois grandes grupos, os originados do Novo Mundo (Américas- Hemisfério Ocidental) e os do Velho Mundo (Europa, Ásia e África – Hemisfério Oriental) (Faria & Zerbini, 2000). Alguns isolados de *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV),

possuem apenas um componente genômico, mas encontram-se no gênero *Begomovirus* devido a similaridade na organização do genoma e serem transmitidos por mosca-branca. Pequenos DNAs satélites de fita simples e circulares, conhecidos como DNA-β com tamanho de aproximadamente 1,3 kb são associados a diversos begomovírus monopartidos do Velho Mundo (Stanley et al., 2005).

As espécies que ocorrem no continente americano possuem tipicamente genoma dividido em dois componentes de DNA, com tamanho variando entre 2,5 a 2,8 kb cada. Cada um dos componentes (DNA-A e DNA-B) é responsável por etapas distintas do processo de infecção, sendo o DNA-A envolvido na replicação viral, transcrição e formação da capa protéica, e o DNA-B responsável pelo movimento (célula-a-célula e longa distância) do vírus na planta (Faria & Zerbini, 2000; Rojas et al., 2005; Stanley et al., 2005). Ambo os componentes são essenciais para a infecção sistêmica eficiente do vírus na planta.

Os critérios para estabelecimento de uma nova espécie no gênero *Begomovirus* incluem o número de componentes (com presença ou ausência do componente B); a organização do genoma (presença ou ausência da ORF AV2); identidade da seqüência de nucleotídeos completa (quando esta for menor que 89% considera-se uma nova espécie, porém levando-se em conta também as propriedades biológicas do isolado, devido a alta freqüência de recombinação entre begomovírus); formação de pseudorecombinantes viáveis; características da proteína capsidial (identidade menor que 90% nesta região e propriedades sorológicas diferentes podem ser indicativo de uma nova espécie); a gama de hospedeiro natural e sintomas observados (Stanley et al., 2005).

4.2. Organização do genoma e replicação do gênero *Begomovirus*

O DNA-A e DNA-B de begomovírus não apresentam identidade de seqüências, com exceção da região comum (RC), conhecida também como região intergênica (IR), que apresenta cerca de 200 nucleotídeos com identidade superior a 90% entre os componentes. Dentro da região comum, localiza-se uma seqüência conservada de nove nucleotídeos (5' TAATATTAC 3') que está presente em todos os begomovírus, contendo o

domínio funcional da origem de replicação, além dos promotores de síntese dos mRNAs virais. A transcrição do genoma dos begomovírus é bidirecional nos dois componentes (A e B). Os nove nucleotídeos mencionados anteriormente se encontram dentro de um contexto de 29 a 32 seqüências de nucleotídeos capazes de formar uma estrutura em forma de grampo ou “stem loop”, sendo considerado um elemento conservado estruturalmente e essencial para replicação denominado SCE (*structurally-conserved element*). Estas seqüências variam entre espécies de begomovírus, no entanto a estrutura está sempre presente (Lazarowitz et al., 1992; Faria & Zerbini, 2000; Stanley et al., 2005).

Como representado na Figura 1, no componente A as ORFs (“open reading frames”) AV1 (CP) e AV2 são transcritas no sentido viral, enquanto as ORFs AC1 (Rep), AC2 (TrAP), AC3 (REn) e AC4 no sentido complementar. A ORF AV2 não encontra-se presente nos begomovírus bipartidos do Novo Mundo. No componente B a ORF BV1 (NSP) é transcrita no sentido viral e a ORF BC1 (MP) no sentido complementar (Faria et al., 2000; Rojas et al., 2005; Stanley et al., 2005).

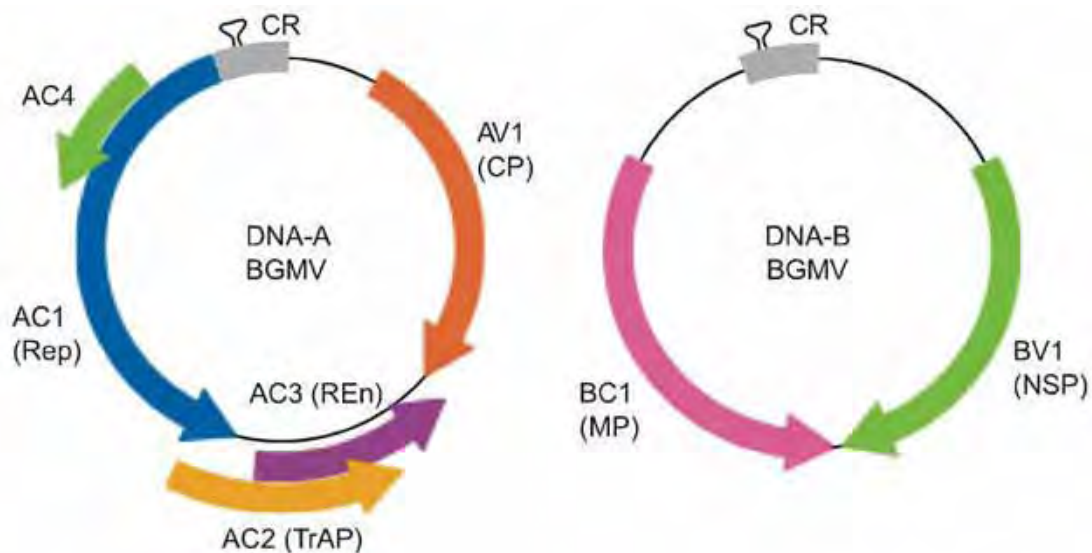


Figura 1. Organização típica do genoma de begomovírus bipartido, *Bean golden mosaic virus*, composto de aproximadamente de 2,6 kb (Figura extraída de Rojas et al., 2005).

A ORF AV1 codifica a proteína capsidial dos begomovírus que pode estar envolvida no movimento sistêmico do vírus dependendo do hospedeiro (Azzan et al., 1994). A ORF AC1 codifica a proteína Rep (*replication-associated protein*) que liga-se aos sítios de iniciação de replicação dentro da região comum e introduz um corte na seqüência conservada TAATATTAC. A Rep se liga a ‘iterons’ com seqüência altamente específica e determina a formação ou não de pseudorecombinantes viáveis, não sendo considerada uma replicase e sim uma enzima associada a replicação, já que a atividade de DNA polimerase é realizada por enzimas do hospedeiro. A ORF AC2 codifica a proteína transativadora da transcrição TrAP (*transactivation protein*) influenciando a transcrição e subsequente expressão dos genes CP e NSP no sentido viral dos componentes A e B, respectivamente (Hanley-Bowdoin et al., 1999). Além disto a proteína age como supressora do silenciamento gênico (Voinnet et al., 1999). A ORF AC3 codifica a proteína REn (*replication enhancer protein*) que é requerida para replicação eficiente do DNA viral, possivelmente por interagir com Rep no reconhecimento da origem de replicação (Settlage et al., 1996). O produto da ORF AC4 estimula a proliferação celular (Rojas et al., 2005).

O movimento dos begomovírus no interior de uma planta é mediado pelas proteínas codificadas pelos genes presentes no DNA-B. A ORF BV1 codifica a proteína NSP (*nuclear shuttle protein*) necessária para o tráfico intracelular pelo núcleo e a ORF BC1 codifica a proteína MP (*movement protein*) envolvida no movimento célula-célula, via plasmodesmas (Noueiry et al., 1994; Sanderfoot et al., 1996). Ainda não está claro a forma e a natureza do complexo de DNA que trafega pelos plasmodesmas, porém evidência direta por meio de ensaios de microinjeção indica que NSP (BV1) entra no núcleo e media o transporte de DNAs de fita simples e dupla pelo poro nuclear (Noueiry et al., 1994).

Após a introdução de partículas virais na célula vegetal pela mosca-branca e em seguida ao desencapsulamento da partícula, o processo de replicação dos begomovírus ocorre no núcleo, onde o DNA de fita simples (ssDNA) é convertido em DNA de fita dupla (dsDNA) intermediário (denominado de forma replicativa, RF). Esta etapa inicial depende totalmente do sistema enzimático do hospedeiro, responsável pela síntese da proteína viral REP e posterior replicação e formação dos RFs e de novas fitas ssDNA no sentido viral. O sítio de início da replicação viral está localizado na região comum (razão da conservação da seqüência de nucleotídeos entre os dois componentes do genoma viral). Em seguida ocorre a

síntese de uma molécula de ssDNA linear de sentido viral, contendo várias unidades do genoma (multímero ou concatômero), utilizando como molde a fita complementar do RF. O concatômero é clivado, formando monômeros e estes re-ligados, gerando moléculas circulares de ssDNA, correspondendo ao genoma viral. A clivagem é realizada pela proteína Rep e ocorre na seqüência conservada de nove nucleotídeos da região comum, sendo o ponto de corte sempre no mesmo local (TAATATT \times AC) (revisado por Faria & Zerbini, 2000; Stanley et al.; 2005). A REP não cliva o DNA sem a presença da estrutura SCE, daí ela estar presente em todos os begomovírus (Faria & Zerbini, 2000). A replicação ocorre da mesma forma para o DNA B. Mutações nos genes Rep, TrAP, NSP e MP podem bloquear a infectividade viral (Hanley-Bowdoin, 1999).

4.3. Importância epidemiológica dos begomovírus

O primeiro relato de uma doença comprovadamente causada por begomovírus no Brasil foi feito por Costa (1965) em feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). O vírus foi denominado *Bean golden mosaic virus* (BGMV). Na época, o mosaico dourado do feijoeiro causado pelo BGMV foi considerado uma doença de importância econômica secundária, mas hoje vem causando grandes perdas em pelo menos 12 países da América Latina (Faria et al., 2000; Gilbertson et al., 1991). O aumento populacional de *Bemisia tabaci* durante a década de 70 foi determinante para a disseminação do BGMV e foi atribuída ao acréscimo em área plantada com soja, uma excelente hospedeira da praga (Costa, 1975).

No Estado de São Paulo, a partir de 1992, observou-se a presença de um novo biótipo (biótipo B) da mosca-branca, possivelmente introduzida da Europa ou EUA, pela importação de plantas ornamentais (Melo, 1992). O biótipo B de *B. tabaci* (também conhecido como *B. argentifolii*), quando comparado ao biótipo A (o único até verificado no Brasil) apresenta uma gama de hospedeiros mais ampla, incluindo várias solanáceas, e um maior grau de adaptação climática e dispersão (Bedford et al., 1994, Morales & Jones, 2004).

Em solanáceas, especificamente o tomateiro, o primeiro relato de infecção por begomovírus foi feito por Matyis et al. (1975). Esta cultura é altamente suscetível

à colonização pelo biótipo B e nos últimos anos uma alta incidência vem sendo relatada simultaneamente em diferentes Estados brasileiros como São Paulo, Bahia, Pernambuco e Distrito Federal, acarretando em perdas de 40 a 100% na produção de tomate (Ribeiro et al., 1994, 1996, 1998; Zerbini et al., 1996; Bezerra et al., 1997; Faria et al., 1997). A caracterização molecular parcial do genoma dos begomovírus presentes nas regiões Sudeste e Nordeste indicou a presença de sete novas espécies até 2003 (Ribeiro et al., 2003). Ambrozevicius et al. (2002) observaram três espécies distintas em tomateiro nos Estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo. A hipótese mais aceita para essa rápida emergência de begomovírus em tomateiro é baseada na presença de vírus nativos infectando plantas silvestres e daninhas, tendo a mosca-branca permitido que esses vírus infectassem a cultura. Por meio de ensaios de recombinação e pseudo-recombinação, esses vírus teriam evoluído rapidamente e gerado novas espécies mais adaptadas ao novo hospedeiro (Hou et al., 1992; Ribeiro et al., 2003; Fernandes et al., 2006).

Infecção por begomovírus em pimentão foi observada primeiramente nos Estados Unidos por Stenger et al. (1990). Tratava-se do Texas pepper virus (TPV ou TPGV) hoje considerado uma estirpe do *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) (Fauquet & Stanley, 2005). Da mesma forma, o Serrano golden mosaic virus (Brown & Poulos, 1990), considerado atualmente como uma estirpe do PepGMV, foi identificado na Costa Rica em pimentas “Tabasco” e “Habanero”, por Lotrakul et al. (2000) e está amplamente distribuído no sul dos Estados Unidos e México (Brown & Poulos, 1990). Em 1989, foi relatada infecção de pimentão, no norte do México, pelo *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) e pelo Sinaloa tomato leaf curl virus, considerado como uma espécie tentativa (Garzon-Tiznado et al., 1993; Idris et al., 1993; Stanley et al., 2005). O PHYVV, em 1996, foi detectado em todo território mexicano (Torres-Pacheco et al., 1996). O *Pepper leaf curl virus* (PepLCV) foi encontrado e caracterizado na Indonésia (Tsai et al., 2006).

O *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), agente etiológico de uma das mais drásticas doenças de tomate no mundo, que devasta anualmente grandes áreas de produção de tomate na Europa e Oriente Médio (Morales, 2001), também foi verificado constatado em pimentão, na República Dominicana (Salati et al., 2002). No Brasil, ainda não foi verificada ocorrência desta espécie de begomovírus.

Em nosso país, o primeiro relato de begomovírus na cultura de

pimentão foi feito por Lima et al. (2001), que verificou 43,8% de infecção do total de amostras da cultivar S-59 e o híbrido Tango coletadas nos municípios de Curaçá (Bahia) e Petrolina (Pernambuco), no Submédio do Vale São Francisco, causando em média 20% de perda na produção (Lima et al., 2001). Bezerra et al. (2006) observaram em Petrolina de Goiás (Estado de Goiás) sintomas de mosaico amarelo e distorção de folha em pimenta dedo-de-moça, tendo sido verificada a espécie ToSRV (AY029750). No Estado de São Paulo foi verificada a mesma espécie ocorrendo em pimentão, no ano de 2005 (Nozaki et al., 2006).

Os begomovírus são frequentemente encontrados em infecções mistas. Paplomatas et al. (1992), ao amplificar um fragmento do componente A do *Chino del tomato virus* (CdTV) a partir de plantas de tomate e pimentão coletadas no México, observaram a presença de um segundo vírus com seqüência de nucleotídeos completamente divergente do CdTV. Outro relato de infecção mista em pimentão foi feito por Garzón-Tiznado et al. (1993), ao estudar a ocorrência da espécie tentativa Pepper mild tigre virus (PMTV) em pimentão em Tamaulipas, norte do México, sendo o sintoma relatado para a doença denominado “rizado amarillo” (encarquilhamento amarelo). A análise filogenética baseada em seqüências parciais dos componentes A e B e análise por hibridização, revelou a presença de possivelmente dois begomovírus diferentes, o PHYVV e um outro não caracterizado. Plantas inoculadas apenas com o PHYVV apresentaram somente amarelecimento internerval.

A infecção simultânea de uma planta por duas ou mais espécies de begomovírus permite a troca de componentes genômicos (pseudo-recombinação) ou de porções de um mesmo componente (recombinação). Esses eventos são comuns entre begomovírus e resultam na grande diversidade genética observada entre as espécies do gênero e entre estirpes da mesma espécie (Gilbertson et al., 1993; Faria & Zerbini, 2000). O primeiro relato de pseudo-recombinação entre duas espécies distintas foi realizado por Gilbertson et al. (1993), que verificaram que o *Tomato mottle virus* (ToMoV) apresentava seqüências muito próxima a *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV) e a *Abutilon mosaic virus* (AbMV). Um pseudo-recombinante pode gerar begomovírus com capacidades de se adaptar a novos hospedeiro (Gilbertson et al., 1993).

No Brasil foram relatados vários casos de begomovírus recombinantes. Foi identificado que o DNA-A do *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMV-[MG-Bt1]) possui um genoma híbrido, com o módulo de replicação (AC1 e origem de

replicação) provavelmente doado pelo ToCMoV-[BA-Se1] e as demais seqüências do *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), originando um isolado com propriedades biológicas distintas de seu antecessor (Galvão et al., 2003)

A possibilidade de obter a pseudo-recombinação entre as espécies virais distintas é uma das formas de estudar o relacionamento evolutivo dos begomovirus. Devido ao *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) induzir sintomas mais severos e precoces que o *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) em tomate e em *N. benthamiana*, Andrade et al. (2006) construíram dois clones recombinantes, ToYSV com genes *mp* e *nsp* de ToRMV, e o ToRMV com genes *mp* e *nsp* de ToYSV, no entanto o primeiro clone apresentou sintomas mais atenuado que o segundo, sugerindo que os genes *mp* e *nsp* estão envolvidos na adaptação do ToYSV a tomateiro e *N. benthamiana*.

4.4. Modalidade de transmissão do vírus

A mosca-branca *B. tabaci*. Genn. (Homoptera: Aleyrodidae) é considerada uma praga de maior importância do século 20, sendo cosmopolita, polífaga e vetora de fitovírus. Até 2001, mais de 100 espécies diferentes de begomovírus foram transmitidos pela mosca-branca para plantas ornamentais, feijão comum, tomate, pimenta, pimentão, cucurbitáceas, mamão e outras culturas hortícolas (Morales, 2001; Morales & Jones, 2004).

Atualmente, o complexo *B. tabaci* é constituído de aproximadamente 41 biótipos, sendo que apenas dois biótipos (biótipo A e B) deste complexo são encontrados no Brasil (Gaimari, 2005; Rabello et al., 2005). O biótipo Q é encontrado na região do Mediterrâneo (Espanha, Portugal e Itália), Israel, China e Japão e, em 2004, foi observado no Arizona (EUA). O biótipo Q é morfologicamente semelhante ao B sendo a diferença no período de desenvolvimento, preferência de hospedeiro, eficiência na transmissão de vírus e são altamente resistentes a produtos que controlam o biótipo B (Gaimari, 2005; Rabello et al., 2005).

A mosca-branca pode produzir 15 gerações por ano, sendo que cada

fêmea, com período de vida de 3 a 6 semanas, que passam por 3 a 4 instares e pupa até emergir o adulto pode depositar 200 ovos em média. As moscas-brancas, além de atuarem como vetoras de vírus, podem causar danos diretos na planta como a redução dos nutrientes ao sugarem a seiva, alterações fisiológicas (amarelecimento da estruturas vegetais ou manchas cloróticas) e liberam excreções açucaradas que favorecem o crescimento de fumagina que interfere na de fotossíntese. São insetos polípagos com pelo menos 500 espécies de plantas hospedeiras em 74 famílias (Morales, 2001).

A modalidade de transmissão de begomovírus por moscas brancas é do tipo circulativa não propagativa (Faria et al., 2000), porém também é dependente da espécie de begomovírus. Santos et al. (2003) estudaram o relacionamento de ToRMV com o biótipo B de mosca-branca em tomate ‘Santa Clara’ e verificaram utilizando 5 insetos por planta, que com o período de aquisição de 15 minutos, a porcentagem de transmissão foi de 6%, sendo que com 24 horas de aquisição a eficiência de transmissão aumentou para 65%. O período de inoculação mínimo foi de 30 minutos, acarretando em 18% de transmissão e quando este era de 24 horas elevou-se para 67%. O término do período de latência foi observado a 16 horas após o vetor adquirir o vírus. Evidenciou-se a transmissão à progênie pela detecção do vírus em ovos, ninfas e adultos provenientes de fêmeas virulíferas, contudo, a transmissão do vírus pelos adultos não foi observada. Porém, em uma espécie de begomovírus, o TYLCV-Israel foi comprovada transmissão transovariana e entre indivíduos de sexos diferentes, ou seja, machos virulíferos para fêmeas sadias e de fêmeas virulíferas para machos sadios, e os insetos provenientes destes cruzamentos capazes de inocular o vírus em plantas de tomate, evidenciando o modo de transmissão circulativo-propagativo (Ghanim & Czonek, 2000).

A temperatura é um dos fatores do meio ambiente que mais afeta a dinâmica populacional de *B. tabaci*. Nos trópicos a temperatura ótima flutua em torno de 28°C, com a temperatura mínima e máxima respectivamente de 15-33°C. Outros fatores que afetam são umidade relativa, chuvas fortes e freqüentes, correntes de ar com frentes frias e altitudes elevadas (1000 m acima do nível do mar) (Morales & Jones, 2004).

Alguns begomovírus podem ser transmitidos por extrato vegetal infectado. Stenger et al. (1990) verificaram que o *Texas pepper virus* (TPGV), atualmente uma estirpe do PepGMV, ocorre dependendo da espécie hospedeira utilizada como fonte de inoculo e da espécie a ser inoculada. Quando o extrato vegetal provinha de pimentão ou *N.*

benthamiana, a transmissão para cultivares de pimentão era menor que 20%, sendo que a transmissão ocorria em 80-100% de *N. benthamiana* para *N. benthamiana*. Resultados similares foram observados por Fernandes et al. (2006), que verificaram o sucesso na transmissão via extrato vegetal do ToRMV só era possível quando ocorreu de tomate para *N. benthamiana* e deste para tomate, e nunca de tomate para tomate.

A enxertia seria outro método de transmissão de fitovírus. Fernandes et al. (2006), utilizando tomates infectados com o ToRMV, obtiveram sucesso na transmissão por enxertia para *Solanum tuberosum*, *Datura stramonium* e para outros cultivares de tomate (Angela Hipper, Rutgers e Santa Clara) e para várias espécies de fumo (*Nicotiana rustica*, *Nicotiana tabacum* cultivares Havana 425, Sansum, TNN, Turkish, White Burley e Xanthi).

A agroinoculação, que consiste na transferência do genoma viral ao interior da planta através da bactéria *Agrobacterium tumefaciens*, é altamente eficiente, uma vez obtido o clone infectivo, permite a inoculação de milhares de plantas em poucas horas. Elmer et al. (1987) inoculando o *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), relataram que o método é o mais eficiente, comparado com outros métodos, obtendo-se até 100% de infecção.

Por fim, a transmissão via biobalística ou bombardeamento de partículas virais é outro método altamente eficaz de transmissão, porém apresenta alto custo e depende de equipamentos específicos.

4.5. Modificação citológica no hospedeiro

Os vírus infectam sistematicamente no hospedeiro, invadindo células distantes do local de inoculação. Os tipos específicos de células e tecidos que serão infectados definem uma propriedade do vírus chamada de tropismo de tecido. No caso de begomovírus, o BGMV exibe tropismo limitado ao floema enquanto que TGMV invade as células do mesófilo, quando analisados em *Nicotiana benthamiana* (Morra & Petty, 2000).

Kim et al. (1978) observaram mudanças na estrutura do núcleo de células de *P. vulgaris*, quando infectadas com BGMV, sendo tais modificações diferentes das causadas por outros vírus de plantas. As mudanças observadas somente no núcleo de células

infectadas do floema, em ordem de ocorrência, eram: 1) hipertrofia do nucléolo podendo ocupar até 1/4 do volume nuclear; 2) segregação dos componentes do nucléolo em discretas porções fibrilares e granulares sendo tal processo similar ao induzido em células animais por alguns antibióticos ou produtos carcinogênicos; 3) aparecimento de anéis fibrilares condensados em vários números e tamanhos; 4) observação de partículas virais solitárias, agregadas e compactadas ou arranjadas em forma de cristais hexagonais, sendo estes mais numerosos aos 9 a 12 dias após a inoculação.

Bass et al. (2000) observaram grandes inclusões no núcleo de células infectadas com TGMV e o aumento do tamanho do núcleo em até seis vezes após a infecção. Além disto, a maioria das células infectadas possuíam modificações na estrutura da cromatina.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Local do experimento

Os experimentos foram realizados no Departamento de Produção Vegetal, da Faculdade de Ciências Agrônomicas da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu. Os ensaios de transmissão por mosca branca, foram realizados no Instituto Agrônomico de Campinas – Laboratório de Virologia e ensaios de biobalística foram realizados no Departamento de Fitopatologia/BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa.

5.2. Coleta de material vegetal e preservação

Plantas de pimentão, apresentando sintomas de amarelecimento e distorção foliar, foram coletadas para verificar a presença de begomovírus, no período compreendido entre novembro de 2004 a maio de 2006, em 16 propriedades produtoras nas

oito regiões. Em campo de produção de pimentão em cultivo aberto foram coletadas 119 amostras de plantas de pimentão ‘Magali R’, ‘Ikeda Casca Dura’, ‘P36R’ e ‘Nathalie’ distribuídos nos municípios de Elias Fausto, Botucatu (distrito de Vitoriana), Paulínia e Mogi-Guaçu/Itaquí. Sob estufa foram coletadas 43 amostras de híbridos de pimentão ‘P36’, ‘Lilac’ e ‘Mandarin’ nos municípios de Paranapanema e Piraju, e 66 amostras de pimenta Dínamo e híbridos de pimentão ‘Atlantic’ e ‘Máximo’ na região de Marília, municípios de Alvilândia e Ubirajara (Figura 2). As localidades de coleta das amostras (Figura 2) e histórico relatando a presença ou ausência de mosca-branca está representada na Tabela 1.



Figura 2. Mapa representativo dos locais de coleta das amostras de pimentão no Estado de São Paulo.

Tabela 1. Relação das amostras coletadas, localidade e histórico da área.

Amostras	Cultivar	Localidade	Sistema de cultivo ^a	População de Mosca-branca	Data de coleta
112 a 140	Magali R	Elias Fausto	Cca	Ausente	10/11/04
141 a 164	Ni	Paulínia	Cca	Ausente	10/11/04
106, 107, 165 a 168	Ikeda Casca Dura	Vitoriana/ Botucatu	Cca e Ce	baixa	03/01/05
169 a 181	P36R	Paranapanema	Ce	Alta	04/02/05
182 a 200	Lilac	Piraju	Ce	Alta	04/02/05
201 a 211	Mandarin	Piraju	Ce	Alta	04/02/05
228 a 237; 253 a 273	Atlantic	Alvinlândia	Ce	Baixa	02/06/05
274 a 282	Pimenta Dínamo	Alvinlândia	Ce	Baixa	02/06/05
240 a 251	Máximo	Ubirajara	Ce	baixa	02/06/05
283 a 296	Pimenta Dínamo	Ubirajara	Ce	Baixa	02/06/05
307 a 310	P36R	Itaqui/ Mogi-Guaçu	Cca	Baixa	01/11/05
311 a 314	Nathalie	Itaqui/ Mogi-Guaçu	Cca	Baixa	23/02/06
315 a 324	Magali R	Elias Fausto	Cca	Alta	23/02/06
328 a 345	P36R	Itaqui/ Mogi-Guaçu	Cca	Alta	16/05/06
347 a 358	Nathalie	Itaqui/ Mogi-Guaçu	Cca	Alta	16/05/06
359 a 371	Magali R	Elias Fausto	Cca	Alta	16/05/06

^a Cca= cultivo em campo aberto; Ce= cultivo em estufa e Ni= não identificada

Todas as amostras coletadas com raiz foram transplantadas e mantidas em casa de vegetação, as estacas foram colocadas em areia umidecida, para fins de enraizamento e as folhas foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas a -80°C.

5.3. Extração de DNA total e detecção viral

A detecção viral foi feita por PCR, após extração de DNA genômico total de todas as amostras, utilizando-se o método de Dellaporta et al. (1983).

Pedaços de folhas das amostras coletadas (0,2g) foram colocados em tubos de microcentrífuga com capacidade de 1500 μ L e macerados com 500 μ L de tampão de extração (100 mM Tris-HCl pH8,0, 50 mM EDTA pH8,0, 500 mM NaCl, 10 mM β -mercaptoetanol). Adicionou-se 33 μ l de SDS 20% e as amostras foram incubadas em banho-maria à 65°C por 10 min, sob agitação. Adicionou-se 160 μ L de acetato de potássio 5M às amostras e agitou-se por 2 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g durante 10 minutos. Após a centrifugação, foi retirado 550 μ L do sobrenadante, a qual foi adicionado 0,5 volumes de isopropanol, para precipitação do DNA. Centrifugou-se novamente a 12.000 g por 10 minutos. Logo após, retirou-se cuidadosamente o sobrenadante sem remover o “pellet” e lavou-se com 500 μ L de etanol 70%, centrifugando-se por 5 minutos. As amostras foram secas a vácuo por 5 minutos. Após a secagem, o “pellet” foi ressuscitado em 150 μ L de água ultrapura (Mili-Q). A qualidade e concentração do DNA foram verificadas colocando-se alíquotas de 4 μ l de cada amostra de DNA, misturadas com 4 μ L de tampão carregamento (0,25% de azul de bromofenol e 40% de sacarose) em gel de agarose a 1% em tampão TBE (0,1M Tris-HCl, 0,1M ácido bórico e 0,02 mM EDTA pH 8,3). O gel foi submetido a eletroforese por 5 V/cm, as bandas foram coradas com brometo de etídio (10 mg/ml) (Sambrook et al., 1989) e observadas através de transluminador UV. Todas as amostras de DNA extraídas foram mantidas a -20°C.

A reação de PCR foi realizada com os oligonucleotídeos universais PALIv1978/PAR1c496 (Tabela 2), que amplificam um fragmento com aproximadamente 1100 bp do DNA-A de begomovírus correspondente a parte da ORF AC1 (Rep), a região comum e parte da ORF AV1 (CP) (Rojas et al., 1993). Para a amplificação, realizou-se uma reação de 25 μ L contendo 2,5 μ L de tampão de reação 10X (Invitrogen), 3,5 mM de MgCl₂, 1mM de dNTPs, 1mM de cada oligonucleotídeo, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 0,17% de triton X-100 e 5 μ L de DNA viral.

O termociclador (Mastercycler Gradient - Eppendorf) foi programado

para uma desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguido de 25 ciclos a 94°C por 1 minuto, 57°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Uma alíquota de 6 µL da reação foi misturada a 1 µL de tampão de carregamento e separada em gel de agarose 1% em tampão TBE. Os fragmentos foram separados por eletroforese a 5V/cm e observados em transluminador UV.

Tabela 2. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR e para as reações de sequenciamento dos isolados de begomovírus.

Oligonucleotídeo	Sequência (5' → 3')	Referência
PAR1c496	AATACTGCAGGGCTTYCTRTRACATRGG	Rojas et al., 1993
PAL1v1978	GCATCTGCAGGCCACATYGTCTTYCCNGT	Rojas et al., 1993
PAR1c715	GATTTCTGCAGTTDATRTTYTCRTCCATCCA	Rojas et al., 1993
PRv324	GCC(CT)AT(GA)TA(TC)AG(AG)AAGCC(AC)AG	Wyatt & Brown, 1996
PRc889	GG(AG)TT(ATG)GA(GA)GCATG(TCA)GTACATG	Wyatt & Brown, 1996
PPBL1v2040	GCCTCTGCAGCARTGRTCKATCTTCATACA	Rojas et al., 1993
PCRc1	CTAGCTGCAGCATATTTACRARWATGCCA	Rojas et al., 1993

D=A,G,T; H=T,C,A; K=G,T; M=A,C; N=A,C,G,T; R=A,G; Y= C,T e W=A,T

Amostras positivas para begomovírus foram re-amplificadas por PCR para obtenção de um fragmento correspondente à região do gene que codifica a proteína capsidial com o par de oligonucleotídeos PrV324 e PrC889 (Wyatt & Brown, 1996) (Tabela 2). A reação de PCR foi realizada em um total de 25 µL contendo 2,5 µL de tampão de reação 10X (Invitrogen), 2,5 µM de MgCl₂, 150 µM de dNTPs, 20pMoles de cada oligonucleotídeo, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), e 5 µL de DNA viral.

No termociclador (Mastercycler Gradient - Eppendorf) foi programado para uma desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 92°C

por 1 minuto, 60°C por 20 segundos e 72°C por 30 segundos e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os fragmentos foram separados em gel de agarose conforme descrito na reação feita anteriormente.

5.4 Seqüenciamento e análise do DNA-A

As amostras resultantes da reação de PCR, foram purificadas em coluna Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega), conforme o protocolo do fabricante e quantificadas em gel de agarose com o uso de Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). A reação de seqüenciamento foi realizada com o oligonucleotídeo PrV324 em seqüenciador ABI Prisma 377.

As seqüências de nucleotídeo obtidas de cada amostra foram comparadas entre si e com outras seqüências de begomovírus do Brasil depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) como: *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV, número de acesso AF291705), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV, AF490004), *Sida mottle virus* (SiMoV, AY090555), *Tomato golden vein virus* (ToGVV, AY751742), *Bean golden mosaic virus* (BGMV, M88686-7), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV, AY029750 e DQ207749) e *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV, DQ3559770). As seqüências foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal X 1.8 (Thompson et al., 1997) e a árvore filogenética foi construída com o programa MEGA versão 3.1 (Kumar et al., 2004), utilizando o método de “neighbor-joining”, com valor de “bootstrap” 2000.

5.5. Clonagem do DNA-A e DNA-B do isolado de ToSRV[PJU] coletado de pimentão em Pirajú, São Paulo

O DNA extraído de plantas de pimentão infectada foi submetido à amplificação com o kit Templi Phi (Amersham Biosciences). O método utiliza a DNA polimerase do bacteriófago ϕ 29, que amplifica exponencialmente fita simples ou dupla de DNA circular por círculo rolante.

A amplificação do DNA genômico viral pelo kit Templi Phi foi realizada adicionando-se 5 µL do tampão da amostra e 1 µL do DNA extraído pelo método de Dellaporta et al. (1983). O DNA foi desnaturado a 95°C por 3 minutos e imediatamente transferida para gelo. A essa mistura, foram adicionados 5 µL do tampão de reação e 0,2 µL da enzima. A reação foi incubada a 30°C por 18 horas. Após o término da incubação, a enzima foi inativada aquecendo-se a reação a 65°C por 10 minutos.

A reação de amplificação do DNA foi diluída adicionando-se 30 µL de TE (10mM Tris e 1mM EDTA pH 8.0).

5.5.1. DNA-A.

O DNA amplificado por Templi Phi foi clivado, independentemente com diversas endonucleases de restrição, com a finalidade de se encontrar uma enzima que clivasse o genoma viral em apenas um único ponto, gerando um fragmento linear de aproximadamente 2600 nucleotídeos (nt) correspondente ao genoma completo.

A reação de clivagem foi realizada utilizando-se 1 µL da amostra amplificada por Templi Phi, 1 µL de enzima, 1 µL de tampão 10X com acréscimo de BSA 1X (albumina de soro bovina) e 7 µL de água Milli-Q autoclavada. As reações foram incubadas a 37°C por 1 hora. As enzimas utilizadas foram: *BamH I*, *Xho I*, *Kpn I*, *Pst I*, *EcoR I*, *Hpa II*, *Sph I*, *Xba I* e *Hind III*.

Os resultados foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, a 5V/cm em tampão TBE (0,1M Tris-HCl, 0,1M ácido bórico e 0,02mM EDTA pH 8,3), corado com brometo de etídio (10 mg/ml).

Uma vez identificada a enzima de clivagem única, foi realizada uma reação de clivagem em 30 µL contendo 10 µL do DNA amplificado com Templi Phi, 1,5 µL da enzima, 3 µL de tampão da enzima 10X com acréscimo de BSA 1X (albumina de soro bovino) e 15,5 µL de água Milli-Q autoclavada.. As reações foram incubadas a 37°C por 2 horas. O vetor pBluescript II KS+, utilizado para clonagem também foi clivado com a mesma enzima e defosforilado com a enzima fosfatase alcalina (Promega) de acordo com indicações do fabricante. Ambos foram purificados utilizando-se o kit Wizard PCR Prep DNA

Purification System (Promega), conforme o protocolo do fabricante.

A reação de ligação consistiu em uma mistura que continha a relação de proporcionalidade de massa de 1:3 (vetor: inserto), utilizando-se a enzima T4 DNA Ligase (Jena Bioscience) e incubou-se a 16°C por 12 horas. A transformação foi realizada por eletroporação, utilizando-se 40 µL de células competentes de *Escherichia coli* estirpe XL1, 2 µl da reação de ligação e 40 µl de glicerol 10%. A mistura foi transferida para cubeta de eletroporação de 2mm de espessura. As cubetas foram colocadas em um eletroporador BioRad Gene Pulser II onde receberam um pulso de 1,8kV/25 µF/200ohms. Após a eletroporação foram adicionados 600 µL de meio SOC (bacto triptona 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 10mM, KCl 2,5mM e MgCl₂ 10mM) e as células foram transferidas para um tubo de 15 mL e incubadas por 45 minutos a 37°C, sob agitação de 100 rpm. Em seguida foram plaqueadas em meio LB-ágar (peptona, extrato de levedura, NaCl e Agar 1,5%) contendo ampicilina (100 µg/ml), X-gal 2% (66 µg/ml) e IPTG (80 µg/ml), sendo mantidas em incubadora a 37°C por 12 a 18 horas.

As colônias foram analisadas por PCR utilizando-se os oligonucleotídeos PAR1c715/ PAL1v1978 (Tabela 1). A reação foi realizada de acordo com o descrito no item 5.3 utilizando-se 1µL de cada colônia crescida em meio de cultura LB (triptona, extrato de levedura e NaCl). O termociclador (Mastercycler Gradient - Eppendorf) foi programado para uma desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguido de 25 ciclos a 94°C por 1 minuto, 57°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Para as PCRs positivas foram realizadas as minipreparações plasmidial seguida de clivagem com a enzima específica para análise do fragmento liberado. Clones recombinantes foram cultivados em 6 ml de meio LB contendo ampicilina (100 µg/ml) e o DNA plasmidial foi extraído utilizando-se o kit “Concert Rapid Plasmid Purification Systems” (Invitrogen).

A qualidade do DNA, o tamanho do fragmento e a quantificação foram estimados em gel de agarose utilizando-se o marcador de comprimento 1 Kb DNA Ladder e o marcador de massa Hight Mass Ladder (Invitrogen).

O seqüenciamento do DNA-A foi realizado inicialmente com os

oligonucleotídeos PAL1v1978, PRv324, PAR1v684 (sentido viral), PAR1c496, PAR1c715, PAL1c1949 e PrC889 (sentido complementar) (Rojas et al., 1993; Wyatt & Brown, 1996) (Figura 3) e com os oligonucleotídeos universais T3 e T7 (Tabela 2).

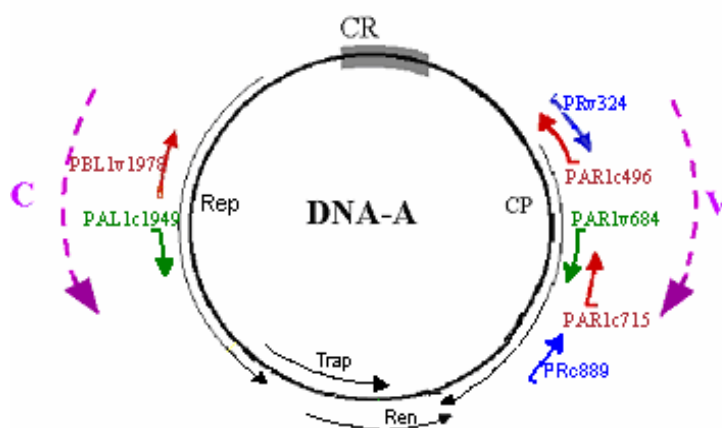


Figura 3. Localização dos oligonucleotídeos no componente A de begomovírus. As ORFs representadas pelas setas pretas, com suas respectivas denominações. Na figura: V representa o sentido viral e C o sentido complementar.

Para complementar as seqüências do DNA-A foram desenhados oito oligonucleotídeos, sendo quatro no sentido viral e quatro no sentido complementar (Tabela 3).

5.5.2. DNA-B.

A obtenção do clone do componente B do ToSRV procedeu-se primeiramente com uma reação de PCR com os oligonucleotídeos univesais PBL1v2040 e PCRc1, que amplificam parte do componente B (Figura 4).

A reação de PCR, foi constituída de 2,5 µL de tampão de reação 10X (Invitrogen), 3,5 mM de MgCl₂, 1mM de dNTPs, 1mM de cada oligonucleotídeo, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 1µL de DNA viral amplificado por Templi Phi e água ultrapura suficiente para 25 µL. O programa adotado no termociclador foi de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 45°C por 2 minutos e 72°C por 2 mintus seguido de uma extensão final de

72°C por 10 minutos.

As amostras resultantes da reação de PCR, foram purificadas em coluna Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega), conforme o protocolo do fabricante e quantificada em gel de agarose com o uso de Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) e seqüenciadas com os oligonucleotídeos PBL1v2040 e PCRC1 (Figura 4). Através dos resultados obtidos com seqüenciamento anterior foram obtidos oligonucleotídeos em sentido opostos GemiBa2 (5'CAA TTC CCT TCA ACG GCG 3') e GemiBs3 (5' CCG TTG AAG GGA ATT GAA GC 3') que permitiram amplificar o componente completo. O produto foi purificado, em coluna Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega). A reação de ligação foi realizada utilizando-se o vetor pGEM-T (Promega) e incubada a 20°C, por 12 horas.

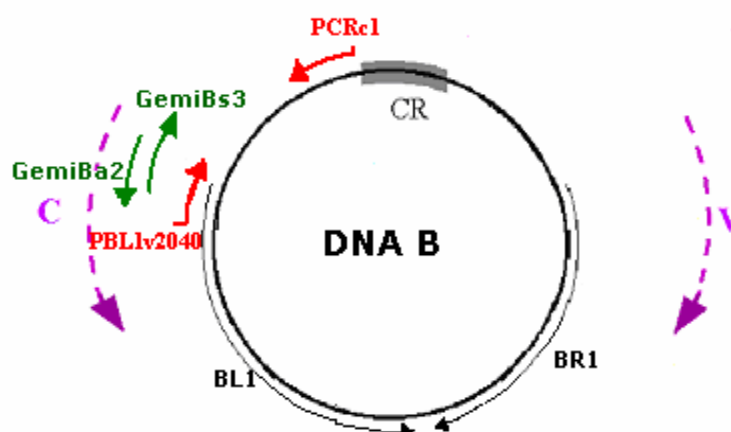


Figura 4. Localização dos oligonucleotídeos utilizados para seqüenciamento do DNA-B do ToSRV[PJU]. As ORFs são representadas pela setas pretas, com suas respectivas denominações. Na figura V representa o sentido viral e C o sentido complementar.

A transformação foi realizada de acordo com o item 5.5.1. e a seleção do clone realizada por PCR com os oligonucleotídeos GemiBa2 e GemiBs3. Para os PCRs que apresentavam tamanho de fragmento desejado de 2600 nt, foi realizado uma reação de clivagem com a colônia com a enzima *EcoRI*, para verificar a presença do clone. Os clones recombinantes foram cultivados em 6 ml de meio LB contendo ampicilina (100 µg/ml) e o

DNA plasmidial foi extraído utilizando-se o kit “Concert Rapid Plasmid Purification Systems” (Invitrogen). O seqüenciamento do clone B foi inicialmente realizado com os oligonucleotídeos GemiBa2, GemiBs3, PBL1v2040 e PCRC1 e posterior elaboração de novas combinações de oligonucleotídeos.

Tabela 3. Lista de oligonucleotídeos utilizados para seqüenciamento do componente A e B do ToSRV[PJU].

Oligonucleotídeo	Seqüência (5' → 3')	Sentido	Temperatura de anelamento	DNA amplificado
GemiA297a	TGG GCT TCC TGT ACA TGG G	Complementar	52°C	A
GemiA1081a	ACT GAC AGC TTC TGG GAC G	Complementar	45°C	A
GemiA1202s	TGG TAG ACT CTG CTC GCG G	Viral	50°C	A
GemiA1303	ATG GAT TCA CGC ACA GGG G	Complementar	55°C	A
GemiA1664s	ACT TTA GAT AGT GCG GTG CG	Viral	52°C	A
GemiA1876a	CTC TTT CAC TAG CGT ACC G	Complementar	50°C	A
GemiA2146s	TAG GAT TTG ACG TCG GAC G	Viral	52°C	A
GemiA2422s	TGA GGA AAT AAT TCT TCG C	Viral	45°C	A
GemiBs1	CGA GAA ATA AGG AGA CGA CG	Viral	52°C	B
GemiBa1	CTT TCC CAT GAT CTA ACC G	Complementar	53°C	B
GemiBa2	CAA TTC CCT TCA ACG GCG	Complementar	52°C	B
GemiBs3	CCG TTG AAG GGA ATT GAA GC	Viral	52°C	B
GemiB182s	CTT ATC TGC TAC GTG GCG	Viral	53°C	B
GemiB369s	CGT GGT GTA ATT ACA ACC G	Viral	52°C	B
GemiB1024a	ATT GCC AGG TTA CCA TGG C	Complementar	53°C	B
GemiB1163a	CCA TTA CAT GAT TCA CGG	Complementar	52°C	B
GemiB1559a	TAA TGG TGC TCA AAG GGC	Complementar	55°C	B
GemiB1665a	TTA AGC CCA TCA GAG GCG GGC	Complementar	55°C	B

Foi utilizado o programa DNAMAN v.4 (Lynnon Biosoft) para obtenção do consenso para o componente A e B do ToSRV[PJU].

5.6. Caracterização biológica

5.6.1. Transmissão por extrato vegetal

As sementes de plantas indicadoras e híbridos de pimentão, foram semeadas em vasos contendo terra autoclavada e substrato em casa de vegetação, na proporção de volume 3:1. As mudas foram, transplantadas para vasos com solo previamente adubado.

Pedaços de folhas (1,0g) oriundas da planta de pimentão original para o isolado de ToSRV[PJU] foram macerados em tampão fosfato de potássio 0,5 M pH 7,0 gelado contendo sulfito de sódio a 0,1%, 0,1% de 2-mercaptoetanol e 0,1% de Kaolin (Stenger et al., 1990 - protocolo modificado). O macerado foi inoculado na terceira ou quarta folha verdadeira utilizando-se carborudum (400 mesh) das seguintes plantas: *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium quinoa*, *Cucumis melo*, *Datura stramonium*, *Vigna unguiculata*, *Phaseolus vulgaris* ‘Pérola’, *Gomphrena globosa*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana occidentalis*, *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana rustica*, *Nicotiana tabacum* TNN, *Nicotiana tabacum* ‘Havana’, *Nicandra physaloides*, *Physalis floridana*, *Petunia hybrida*, *Lycopersicon esculentum* ‘Santa Clara’, *Capsicum annuum* ‘Magda’, ‘Magali R’, ‘Rubia R’, ‘Martha R’, ‘Bruna R’, ‘Paloma’, ‘Italiano Amarelo’, ‘Impacto’, ‘Doce comprida’, *Capsicum frutescens*, *Glycine max* ‘Conquista’. A inoculação foi realizada por três vezes consecutivas com intervalos de dois dias, utilizando-se 10 plantas de cada espécie. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, sob temperatura de 25 a 30°C por aproximadamente 30 dias, para observação de sintomas. Após 20 dias da última inoculação, foi retirada uma porção de folha de cada planta indicadora, feita a extração de DNA e PCR para comprovação da infecção. Este teste de transmissão por extrato vegetal a partir de pimentão infectado foi repetido 3 vezes.

5.6.2. Transmissão por enxertia

Plantas de pimentão ‘Magda’, ‘Magali R’ e ‘Rubia R’ com aproximadamente 30 cm de altura e com dois pares de folhas definitivas, foram utilizadas para ser enxertadas lateralmente em plantas com ramos de pimentão infectados com o isolado ToSRV[PJU]. O enxerto foi fixado com fita de parafilme, acondicionado em saco plástico, e as plantas foram mantidas em casa de vegetação sob temperatura de 25 a 30°C. Foram enxertadas um total de 20 plantas, sendo oito de pimentão ‘Magali R’, sete de pimentão ‘Rubia R’ e cinco em ‘Magda’.

5.6.3. Transmissão com seringa

O DNA amplificado pelo kit Templi Phi (Amersham Biosciences), sem inativação final da enzima foi diluído em água destilada na proporção de 1:3 (reação:água) sendo 50µL desta solução aplicados no caule de seis plantas de pimentão cv. ‘Magda’, com idade de 30 dias após germinação, com auxílio de uma seringa de 1 mL. A seringa foi mantida por 10 minutos no caule para permitir entrada do DNA viral.

5.6.4. Transmissão por mosca-branca

O teste de transmissão por mosca branca foi realizado no Instituto Agrônomo de Campinas, Laboratório de Virologia. O biótipo das moscas-brancas utilizadas foram identificadas por Judith K. Brown, da Universidade do Arizona, como biótipo B.

Foram avaliadas as mesmas espécies de plantas utilizadas na transmissão mecânica, todas oriundas de sementes saudáveis. Utilizou-se como fonte de inóculo plantas de tomate cv. ‘Rutgers’ infectadas com o ToSRV[PJU] obtidas por transmissão biobalística.

As moscas, mantidas em tomates e sojas em estufas no IAC, foram capturadas e colocadas dentro de gaiola de plástico com a planta de tomate positiva para o

ToSRV[PJU], permitindo a aquisição do vírus (Figura 5a). A gaiola foi mantida no escuro por um período de 24 horas. Em seguida 20 moscas supostamente virulíferas foram transferidas para cada planta hospedeira sadia com idade de 20 dias após emergência, onde permaneceram por 48 horas no escuro a fim de transmitir o vírus (Figura 5b). Após a transmissão, as plantas foram pulverizadas com imidacloprid (Confidor 700 GrDA). As plantas foram mantidas em casa de vegetação sob temperatura de 25 a 30°C por um período de 2 meses, sendo analisadas semanalmente para surgimento de sintomas. Após 30 dias da transmissão, foi realizada extração de DNA e PCR para comprovação da infecção, conforme descrito anteriormente

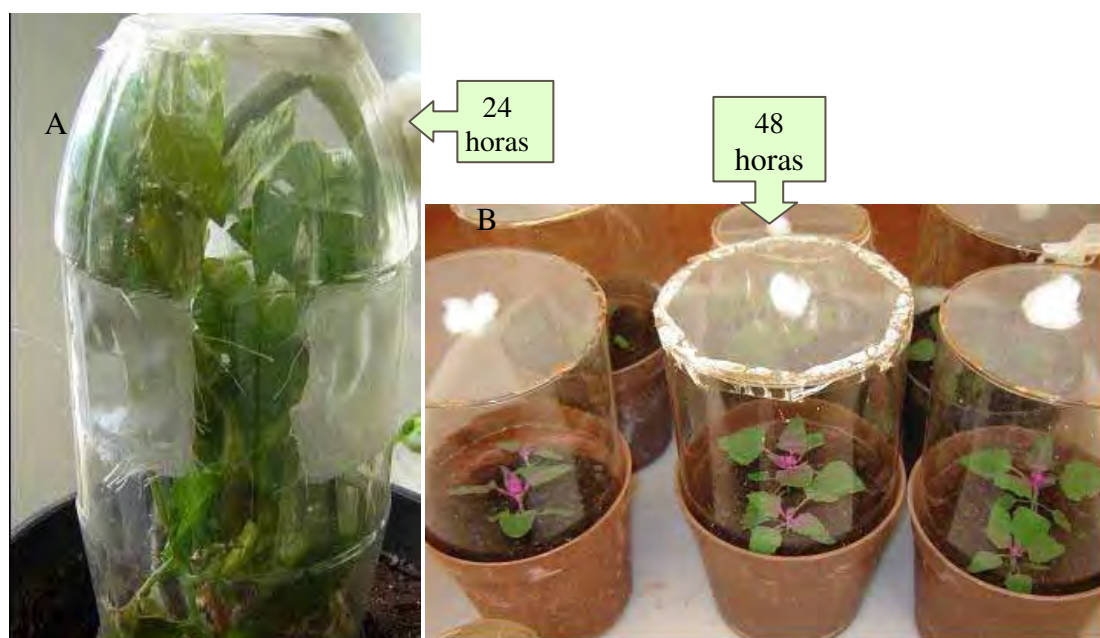


Figura 5. A) Gaiola de garrafa plástica, utilizada no experimento de transmissão de begomovirus. B) Plantas testes em gaiola de vidro com mosca branca para aquisição do vírus.

Para o teste de transmissão foram utilizadas 10 plantas de cada espécie, sendo todas as plantas avaliadas por PCR para presença do vírus.

5.6.5. Transmissão por biobalística

Utilizou-se na inoculação por biobalística a forma replicativa viral (RF) e o DNA amplificado por Templi Phi. A RF foi extraída utilizando-se tecido foliar infectado de pimentão (2g) triturado com nitrogênio líquido. Foi adicionado 15 mL de tampão de extração (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA pH 7.5, 1% SDS e 0,1% de β -mercaptoetanol) e homogeneizado. Após homogeneização, a solução foi centrifugada por 20 min. a 10000 rpm (rotor Beckman Ti70). O sobrenadante foi transferido para novo tubo e adicionado NaCl 5M até concentração final de 1 M e incubou-se a 37°C por uma noite. A solução foi centrifugada novamente por 1 hora a 25000 rpm (rotor Beckman Ti70) e o sobrenadante foi transferido novamente para novo tubo com adição de 1 volume de fenol:clorofórmio (1:1), com a finalidade de retirar o excesso de proteína e submetido novamente a centrifugação por 10 min a 8000 rpm (rotor Beckman Ti70). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado 1 volume de clorofórmio para retirar o excesso de fenol, centrifugando por 10 min a 8000 rpm (rotor Beckman Ti70). O sobrenadante foi transferido para tubo novo e o DNA foi precipitado com 0,1 volume de NaOAc 3 M e 1 volume de isopropanol e incubado a -20°C por uma noite. A solução foi centrifugada por 10 min a 8000 rpm (rotor Beckman Ti70) e o “pellet” obtido foi lavado com 5 ml de etanol 70% e centrifugado por 10 min a 10000 rpm (rotor Beckman Ti70). O “pellet” foi secado a vácuo por 10 minutos e ressuscitado em 200 μ l de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH8,0).

A amplificação por kit Templi Phi foi realizada conforme descrito no item 5.5. deste projeto.

Plantas com duas a quatro folhas verdadeiras de tomate cv. ‘Rutgers’, pimentão Ikeda e *N. benthamiana* foram inoculadas via biobalística utilizando-se o RF e o DNA-TP (DNA - Templi Phi). Em microtubo de 1,5 mL foi adicionado 50 μ L de micropartículas de tungstênio ressuscitado em glicerol 50%, 50 μ L de CaCl₂ 2,5M, 20 μ L de RF-DNA ou DNA-TP e 20 μ L de espermidina 0,1 M. Os microtubos foram submetidos a agitação por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugados por 7 segundos a 14000g . Após a centrifugação o sobrenadante foi cuidadosamente retirado com auxílio de uma pipeta e foi adicionado 200 μ L de etanol absoluto gelado, agitado em sonicador e centrifugando novamente a 14000g por 7 segundos. Esta lavagem foi realizada 2 vezes. Logo após a última

centrifugação o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido por sonificação em 36 μL de etanol absoluto. Foram distribuída alíquotas de 6 μL na região central de seis membranas carreadoras para cada tubo. Os discos contendo as micropartículas cobertas com DNA foram armazenadas em placa de petri e usadas posteriormente para bombardear.

As partículas de tungstênio com o DNA viral foram projetadas na parte superior da folha, com uma pressão de gás hélio de 800 a 1200 psi. As plantas bombardeadas foram mantidas no laboratório por 12 horas antes de serem transferidas para casa-de-vegetação.

Para cada solução (RF e TP) foram bombardeadas seis *N. benthamiana*, seis Pimentão ‘Casca Dura Ikeda’ e seis tomates ‘Rutgers’. As plantas foram plantadas em copo descartáveis de café e bombardeadas com 20 dias após a germinação. A transmissão foi confirmada por PCR com oligonucleotídeos 496/1978 (Rojas et al., 1993).

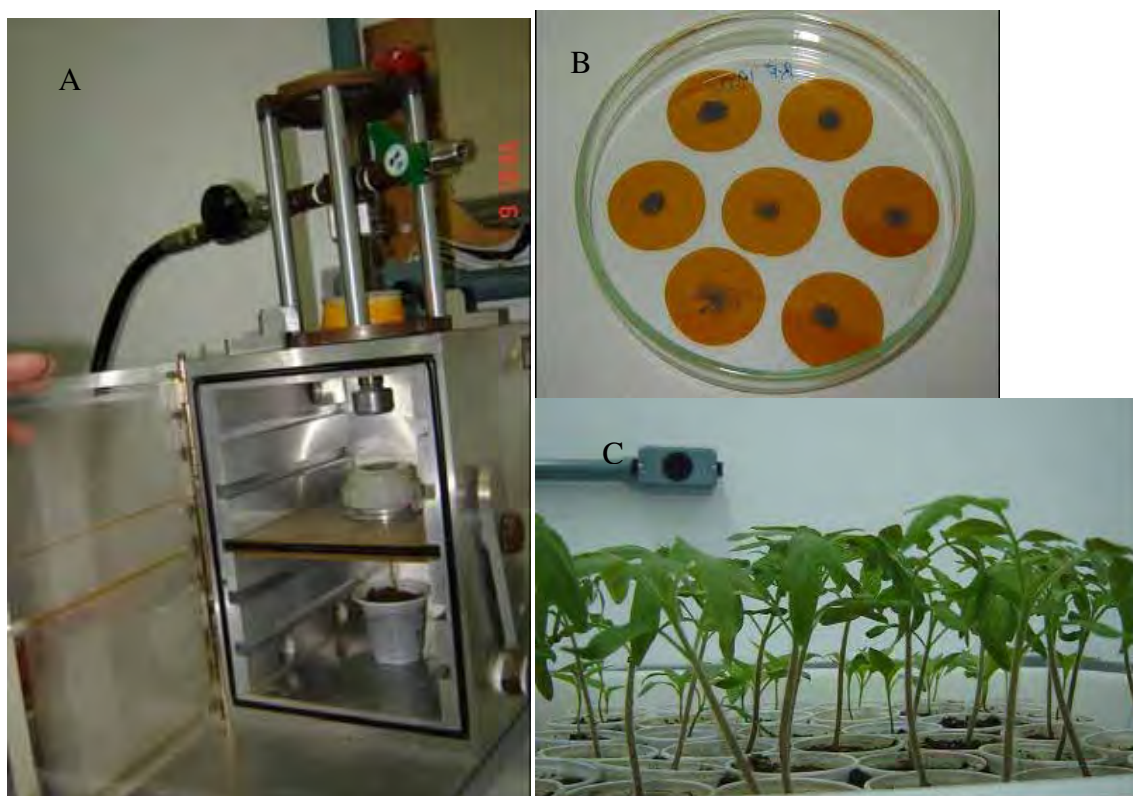


Figura 6. A) Foto de parte do equipamento, câmara formadora de vácuo, onde coloca-se a planta para ser bombardeada. B) Membrana carreadora, com partículas de tungstênio envolto com DNA viral; C) Plantas de tomates e pimentão (no fundo) para serem bombardeadas, com o primeiro par de folhas formada.

5.7 Análise citológica

Nervuras de folhas de pimentão infectados foram cortadas e transferidas para uma gota de tampão de fixação Karnovsky (paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2% e tampão fosfato 0,1 M), para posterior corte transversal (fragmentos de 3x1 mm). Os fragmentos foram mergulhados em tampão de fixação por um período de 24 horas e lavados 3 vezes com tampão fosfato 0,1 M pH 7,3. A pós-fixação foi realizada deixando os fragmentos por 2 horas em tetróxido de ósmio 1%. A desidratação foi realizada em série crescente de acetona a 50, 70, 90 e 100%, sendo cada passo realizado por 3 vezes a 10 minutos. A infiltração do material foi realizada em série, mergulhando o material em acetona/resina araldite, na proporção de 1:1 e 2:1 por 12 horas e em resina pura por 1 hora. A inclusão foi feita em blocos com resina araldite pura e incubada a 60°C, por 48 horas.

A trimagem dos blocos, retirada de excesso de resina, foi realizada com auxílio de uma lupa e lâmina de barbear. Em seguida foram realizados cortes semi-fino de 0,5 micrômetros que foram colocados sob uma lâmina de vidro e corado com azul de toluidina sob ar quente. Os cortes foram examinados no microscópio óptico para realização do corte ultrafino de 50 Å (Angstrom) em ultramicrótomo. Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados ao microscópio eletrônico de transmissão Philips CM 100.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Detecção viral e análise da diversidade genética

Os oligonucleotídeos PALiv1978/PAR1c496 permitiram a amplificação de um fragmento de 1100 nucleotídeos (Figura 7) em 30 amostras das 228 plantas coletadas, mostrando-se uma ferramenta bastante útil na detecção de begomovírus em pimentão.

Nos municípios de Paulínia, Botucatu/Vitoriana e na primeira coleta em Elias Fausto nenhuma das amostras coletadas mostrou-se infectada por begomovírus. De fato, não foram observadas moscas brancas nos locais de coleta, ou incidência estava muito baixa. No município de Paranapanema sete das 13 amostras foram positivas correspondendo a 53,8% das amostras coletadas. Em Piraju, das 30 amostras coletadas, nove foram positivas (30%). Em Alvinlândia, região de Marília, das 40 plantas coletadas apenas uma mostrou-se infectada (2,5%) e em Ubirajara, região de Bauru, das 26 amostras, uma era positiva (3,85%). Em Mogi-Guaçu foram coletadas 38 plantas de pimentão sendo que seis mostraram-se positivas por PCR (15,79%) e, em Elias Fausto, de 23 plantas coletadas apenas seis

mostraram-se infectadas ou positivas por PCR (Tabela 4).

Tabela 4. Presença de begomovirus em pimentão diagnosticado por PCR.

Município	Plantas Coletadas	Cultivar	Positivas	%	Mosca branca	Amostras positivas
Paranapanema	13	P36R	7	53,8	+	172p, 173p, 174p, 175p, 176p, 179p e 181p
Piraju	30	Lilac e Mandarin	9	30	+	183p, 188p, 189p, 190p, 192p, 196p, 197p, 200p e 205p
Alvinlândia	40	Atlantic	1	2,5	+	233p
Ubirajara	26	Máximo	1	3,85	+	295p
Mogi-Guaçu	38	P36R, Nathalie	6	15,79	+	308p, 312p, 329p, 347p, 351p e 356p
Elias Fausto	23	Magali R	6	26,1	+	318p, 319p, 320p, 321p, 324p e 364p

Nas amostras coletadas na região de Paranapanema e Piraju verificaram-se na maioria das plantas infecção mista por begomovírus e potyvírus, por meio de análises ao microscópio eletrônico de transmissão (dados não apresentados), através de leaf dip e quando não era observado nenhuma partícula a amostra era submetida a RT-PCR para potyvírus. Apenas uma amostra denominada de 190p, apresentava infecção simples por begomovírus, sendo escolhida para os estudos subsequentes de transmissão e seqüenciamento completo do genoma viral.

Nas regiões onde foram encontradas amostras infectadas de pimentão com begomovírus havia presença de grandes populações de mosca-branca. Em Paranapanema e Piraju o pimentão havia substituído cultivos anteriores de tomate. Na região de Marília, o cultivo de pimentão, estava sendo realizado intercalado com o cultivo de tomate.

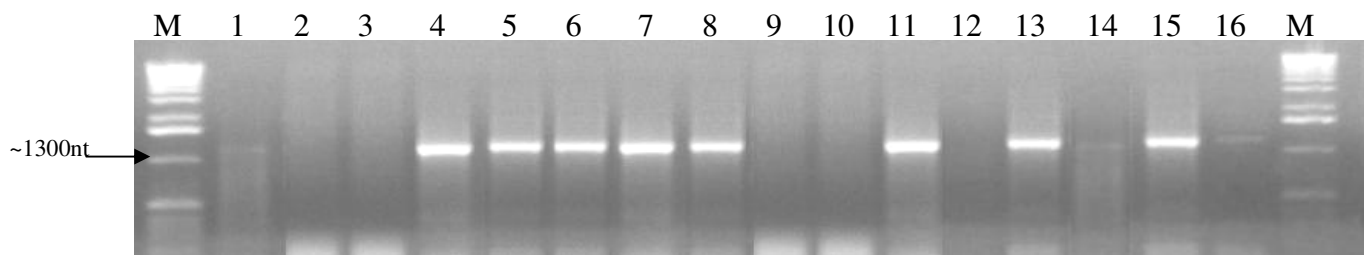


Figura 7. PCR com os oligonucleotídeos universais PALIv1978/PAR1c496 para detecção de begomovírus. M= marcador de comprimento (1 kb DNA ladder, Invitrogen). Amostras 4, 5, 6, 7, 8, 11 e 13= plantas positivas; 14= planta sadia, 15= controle positivo e 16= água.

As amostras positivas para begomovírus foram em seguida submetidas a re-amplificação com os oligonucleotídeos PrV324/PrC889 para estudo da diversidade genética e identificação das prováveis espécies presentes. Este par de oligonucleotídeos amplifica um fragmento de aproximadamente 576 nucleotídeos (Figura 8) correspondente ao gene que codifica a proteína capsidial (CP), localizado no DNA-A dos begomovírus. Segundo Brown et al. (2001) e Stanley et al. (2005), identidades de nucleotídeos menores que 90% na porção 5' do gene que codifica a proteína capsidial são o indicativo de uma nova espécie, porém, com a ressalvas das ocorrências de recombinações freqüentes entre isolados de begomovírus e o problema de se utilizar uma pequena região genômica para a classificação em espécie do isolado (Padidam et al., 1999).

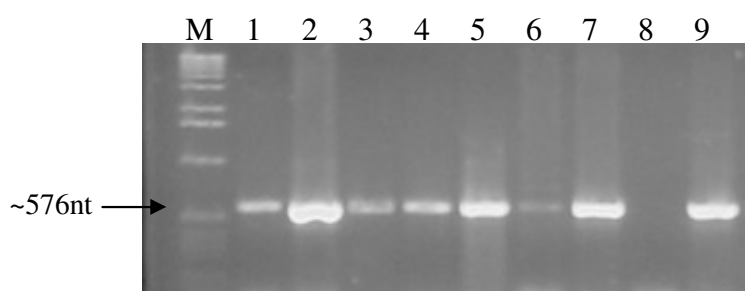


Figura 8. PCR para detecção de begomovírus com os oligonucleotídeos PrV324 e PrC889. M= marcador de comprimento (1 kb DNA ladder, Invitrogen). Amostras 1 a 7= isolados; 8 = água e 9 = controle positivo.

Foram seqüenciados parte da região capsidial de cinco isolados das regiões de Paranapanema, oito de Piraju, um de Alvinlândia, um de Ubirajara, cinco de Mogi-Guaçu e três da região de Elias Fausto.

A comparação das seqüências obtidas com as demais seqüências disponíveis no GenBank, demonstrou duas espécies distintas de begomovírus ocorrendo em pimentão. A análise permitiu a separação de dois ramos filogenéticos (Figura 9). O primeiro ramo compreendendo isolados de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV-AY029750), foi constituído pelos isolados oriundos das regiões de Paranapanema (172p, 173p, 174p, 175p, 176p), Piraju (183p, 188p, 189p, 190p, 192p, 196p, 197p, 200p), Ubirajara (295p), Mogi-Guaçu (312p, 329p, 351p, 356p) e Elias Fausto (320p, 324p, , 364p). No segundo ramo, foram agrupados o isolado de Alvinlândia (233p), da região de Marília, um isolado de Mogi-Guaçu (308), a espécie tentativa *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) e o *Tomato golden vein virus* (ToGVV). A maioria dos isolados apresentaram identidade variando de 98 a 100% com o ToSRV, seqüenciado de pimenta na região de Petrolina de Goiás, indicando predominância desta espécie nos campos analisados no Estado de São Paulo. O isolado 233p de Alvinlândia e o 308p de Mogi-Guaçu apresentaram identidade de 98 e 95% com ToYVSV respectivamente.

Durante a análise destes resultados, foi verificado que o ToGVV e *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) são possivelmente isolados de uma mesma espécie de begomovírus. A identidade entre as seqüências de nucleotídeos dos isolados coletados e os demais begomovírus analisados pode ser observada na Tabela 5.

Bemisia tabaci biótipo B foi observada pela primeira vez em 1994, colonizando tomate no Brasil (França et al., 1996). Devido ao seu hábito alimentar polífago e a sua crescente disseminação, novas espécies hospedeiras para begomovírus poderão surgir através dos tempos. Os resultados aqui obtidos revelam que as espécies ToSRV e ToYVSV, até então relatadas no Brasil apenas em tomateiro, também infectam o pimentão, embora com uma incidência menor do que a verificada em tomateiro. Até o momento não foi verificado em pimentão um grave dano econômico, no entanto este resultado ressalta a necessidade de constante observação de begomovírus em pimentão, pois espécies ou isolados mais agressivos poderão surgir e predominar na cultura, já que ela se mostrou hospedeira das espécies nativas brasileiras que ocorriam somente em tomate.



Figura 9. Árvore filogenética baseada na seqüência parcial de nucleotídeos do gene que codifica a proteína capsidial obtida pelo programa MEGA v3.1 utilizando-se método de neighbor-joining, com valor de "bootstrap" 2000. Os isolados do GenBank está representado

em preto e os isolados coletados está representado em cores. *Isolado utilizado na caracterização do genoma completo.

Tabela 5. Porcentagem de identidade entre as seqüências de nucleotídeos parciais do gene *cp* de begomovírus e os

18 isolados coletados de pimentão no estado de São Paulo, obtido através de Clustal W.

	ToSRV. DQ207749	ToSRV AY029750	ToYVSV DQ355977	ToGVV AY751742	ToRMV AF291705	ToCMoV AF490004	BGMV M88686	SiMoV AY090555	172p	173p	174p	175p
ToSRV. DQ207749	-											
ToSRV. AY029750	98%	-										
ToYVSV.DQ355977	80%	81%	-									
ToGVV. AY751742	79%	80%	95%	-								
ToRMV. AF291705	82%	80%	82%	82%	-							
ToCMoV. AF490004	81%	81%	82%	83%	91%	-						
BGMV. M88686	81%	81%	81%	84%	83%	82%	-					
SiMoVM. AY090555	84%	84%	82%	82%	88%	87%	82%	-				
172p	99%	97%	80%	79%	82%	81%	81%	84%	-			
173p	99%	97%	80%	79%	82%	81%	81%	84%	99%	-		
174p	99%	97%	80%	79%	81%	80%	81%	84%	99%	98%	-	
175p	97%	95%	79%	78%	81%	82%	80%	83%	97%	96%	96%	-
176p	97%	95%	80%	78%	81%	82%	80%	83%	97%	96%	96%	100%
183p	99%	97%	80%	79%	81%	80%	81%	84%	99%	98%	99%	96%
188p	98%	97%	78%	77%	80%	81%	79%	82%	98%	98%	98%	96%
189p	100%	98%	80%	79%	82%	81%	81%	84%	99%	99%	99%	97%
190p	99%	97%	80%	79%	81%	80%	81%	83%	99%	99%	98%	97%
192p	99%	97%	80%	79%	81%	80%	81%	84%	99%	99%	99%	97%
196p	99%	97%	80%	79%	81%	80%	81%	84%	99%	98%	99%	96%
197p	99%	97%	80%	79%	81%	80%	81%	84%	99%	98%	99%	96%
200p	99%	97%	80%	79%	81%	80%	81%	84%	99%	98%	99%	96%
233p	80%	80%	98%	94%	83%	82%	82%	82%	80%	80%	80%	80%
295p	99%	97%	80%	79%	81%	80%	81%	84%	99%	98%	99%	96%
308p	76%	77%	95%	91%	80%	79%	78%	80%	76%	77%	76%	73%
312p	99%	97%	80%	79%	81%	80%	81%	84%	99%	98%	99%	96%
320p	98%	96%	79%	78%	78%	79%	80%	82%	98%	97%	97%	95%
324p	100%	97%	80%	79%	81%	81%	81%	84%	99%	99%	99%	97%
329p	99%	97%	80%	79%	81%	80%	81%	84%	99%	99%	99%	97%
351p	99%	97%	80%	79%	81%	80%	81%	84%	99%	98%	99%	96%
356p	99%	97%	80%	79%	81%	80%	81%	84%	99%	98%	99%	96%
364p	99%	97%	80%	79%	81%	80%	81%	83%	99%	98%	98%	96%

Continuação.

	176p	183p	188p	189p	190p	192p	196p	197p	200p	233p	295p	308p	312p	320p	324p	329p	351p	356p	364p	
ToSRV. DQ207749																				
ToSRV. AY029750																				
ToYVSV.DQ355977																				
ToGVV. AY751742																				
ToRMV. AF291705																				
ToCMoV. AF490004																				
BGMV. M88686																				
SiMoVM. AY090555																				
I72p																				
I73p																				
I74p																				
I75p																				
I76p	-																			
I83p	96%	-																		
I88p	96%	98%	-																	
I89p	97%	99%	98%	-																
I90p	97%	99%	98%	99%	-															
I92p	97%	100%	98%	99%	99%	-														
I96p	96%	99%	98%	99%	99%	100%														
I97p	96%	99%	98%	99%	99%	100%	100%													
200p	96%	99%	98%	99%	99%	99%	99%	99%	-											
233p	80%	80%	78%	80%	80%	80%	80%	80%	80%	-										
295p	96%	99%	98%	99%	98%	99%	99%	99%	99%	80%	-									
308p	73%	76%	78%	76%	76%	76%	76%	76%	76%	93%	76%	-								
312p	96%	99%	98%	99%	99%	100%	99%	99%	99%	80%	99%	77%	-							
320p	95%	98%	97%	98%	97%	98%	98%	98%	98%	79%	97%	78%	98%	-						
324p	97%	99%	98%	100%	99%	99%	99%	99%	99%	80%	99%	76%	99%	98%	-					
329p	97%	100%	98%	99%	99%	100%	100%	100%	99%	80%	99%	76%	100%	98%	99%	-				
351p	96%	99%	98%	99%	99%	100%	100%	100%	99%	80%	99%	76%	99%	98%	99%	100%	-			
356p	96%	99%	98%	99%	99%	100%	99%	99%	99%	80%	99%	76%	99%	98%	99%	100%	99%	-		
364p	96%	99%	98%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	80%	98%	76%	99%	98%	99%	99%	99%	99%	-	

6.2. Caracterização do genoma viral

Para o seqüenciamento completo do genoma viral foi utilizado o isolado 190p, proveniente da região de Piraju, amplificando-se exponencialmente seu DNA, com o kit TempliPhi. As endonucleases de restrição que clivaram e linearizaram o genoma foram as enzimas *BamH* I, *Kpn* I, *EcoR* I, *Xba* I e *Hind* III. Estas geraram um fragmento do tamanho esperado para begomovírus (2600 nucleotídeos, como pode ser verificado na Figura 10).

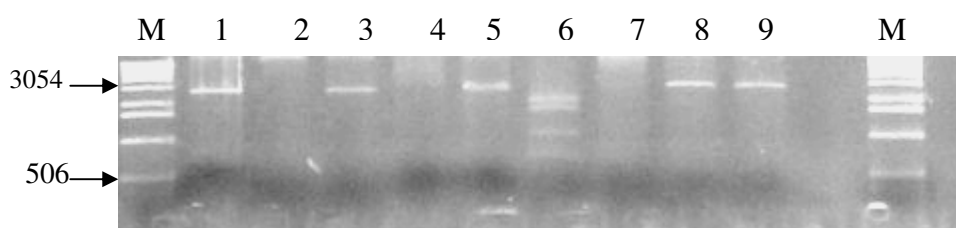


Figura 10. Clivagem do DNA genômico do ToSRV amplificado com a enzima Templi Phi. M = marcador de comprimento (1kb DNA ladder), 1= *BamH* I, 2= *Xho* I, 3= *Kpn* I, 4= *Pst* I, 5= *EcoR* I, 6= *Hpa* II, 7= *Sph* I, 8= *Xba* I, 9= *Hind* III.

A transformação realizada a partir de reação de ligação do vetor e inserto clivados com *BamH* I gerou 5 clones para o componente A do ToSRV, confirmados por PCR com os oligonucleotídeos PALiv1978/PAR1c715. Durante o processo de clonagem verificou-se que um dos sítios *BamH* I foi perdido. A confirmação da clonagem foi realizada utilizando a clivagem simultânea com as enzimas *Hind* III e *Xba* I (Figura 11, 12 e 13), no entanto este fato não influenciou na caracterização completa do DNA-A.

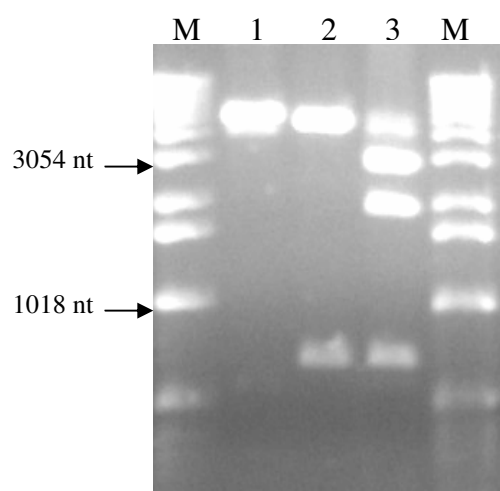


Figura 11. Clivagem do possível clone recombinante com enzimas de restrição. M: marcador de comprimento (1 kb DNA ladder, Invitrogen), 1= DNA plasmidial do clone 190p clivado com *Xba* I, 2= DNA plasmidial do clone 190p clivado com *Hind* III e 3= DNA plasmidial do clone 190p clivado com *Hind* III e *Xba* I.

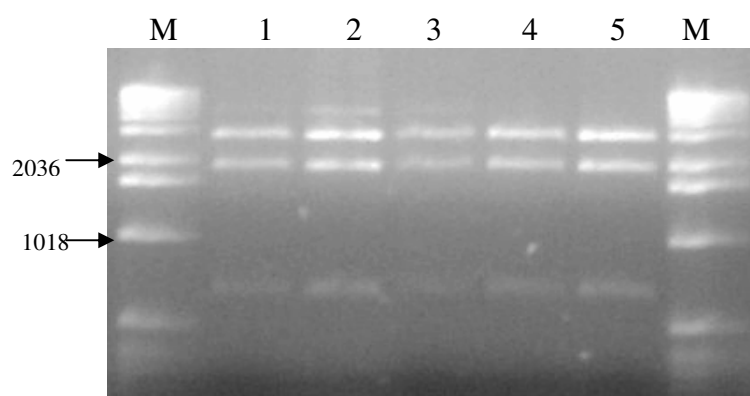


Figura 12. Clivagem com *Hind* III e *Xba* I dos clones positivos por PCR (amostra 1 a 5), M: marcador de comprimento (1 kb DNA ladder, Invitrogen).

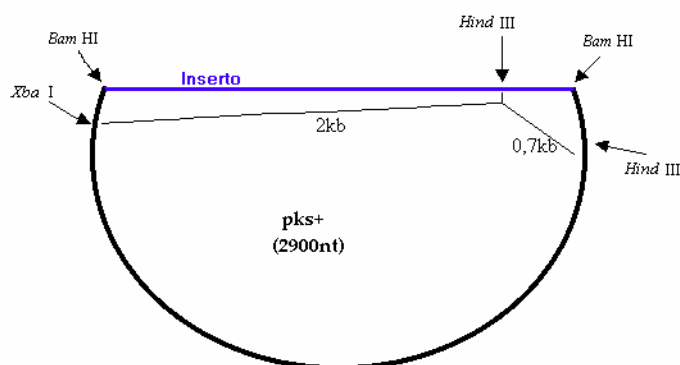


Figura 13. Representação esquemática do clone recombinante correspondente ao DNA-A completo do isolado 190p, clonado no vetor pks+. Os sítios de clivagem das enzimas *BamH I*, *Xba I* e *Hind III* estão indicados, assim como os comprimentos dos fragmentos gerados após a clivagem com essas enzimas.

Dos oito oligonucleotídeos desenhados para completar o sequenciamento de componente A, sendo quatro no sentido viral e quatro no sentido complementar, apenas o sequenciamento de GemiA1303 não obteve-se boas seqüências do PCR e do clone. As reações de PCR com as combinações dos oligonucleotídeos GemiA1876a/1202s, GemiA2146s/297a, GemiA1664s/297a e GemiA1081a/2422s nos permitiram ampliações de fragmentos de 800, 800, 1300 e 1300 nucleotídeos respectivamente (Figura 14).

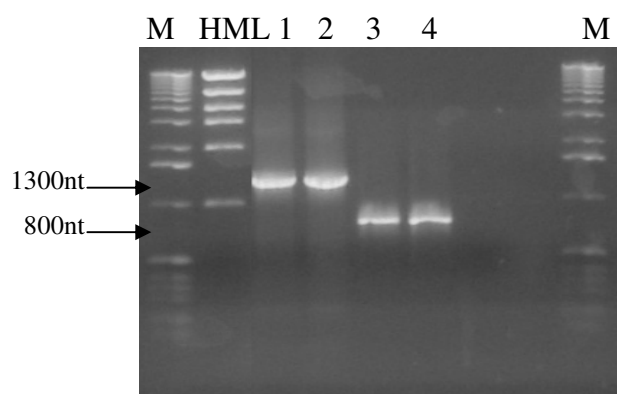


Figura 14. PCR com oligonucleotídeos desenhados para complementar a seqüência genômica do DNA-A de ToSRV. M= marcador de comprimento (1 kb DNA ladder, Invitrogen); HML= marcador de peso (High mass ladder, Invitrogen); 1= amplificação com

GemiA1081a/2422s; 2= amplificação com GemiA1664s/297a; 3= amplificação com GemiA1876a/1202s e 4= amplificação com GemiA2146s/297a.

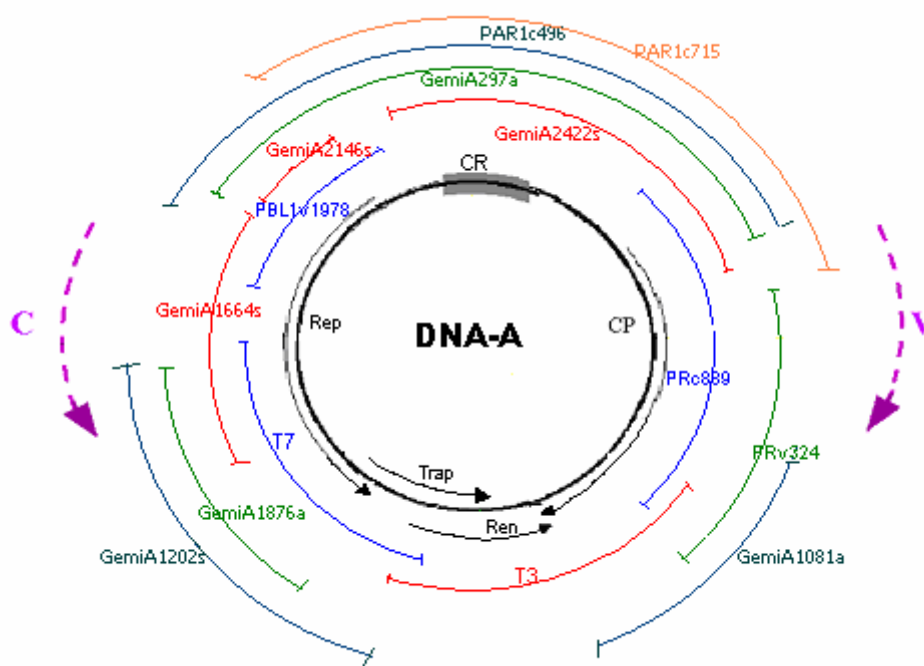


Figura 15. Representação esquemática dos fragmentos seqüenciados com oligonucleotídeos especificados, formando o consenso correspondente ao genoma completo do DNA-A do ToSRV[PJU].

O genoma caracterizado neste trabalho (Figura 15) foi denominado de ToSRV-A [PJU] para o componente A e ToSRV-B [PJU] para o DNA-B. O seqüenciamento do DNA-A completo permitiu a conclusão que o ToSRV-A [PJU] possui 2591 nucleotídeos, com organização genômica semelhante a outros begomovírus do hemisfério ocidental, principalmente ao ToSRV de Petrolina de Goiás proveniente de pimenta, cuja identidade de seqüência completa foi de 99%, enquanto que para o ToSRV-AY029750 de Minas Gerais proveniente de tomate a identidade foi de 97%. Deste modo foi comprovada a identidade viral do isolado ToSRV[PJU] caracterizado. Foi verificada variação no comprimento do tamanho do genoma do componente A, sendo que o ToSRV-A [PJU] possui 2591 nucleotídeos, enquanto que o ToSRV de pimenta possui 2593 nucleotídeos e o de tomate de Minas Gerais

2588 nucleotídeos.

O clone de ToSRV-A [PJU] apresentou todas as sequências conservadas (iterons) necessárias para a replicação do genoma viral (Figura 18). Comparando-se a identidade de sequências de nucleotídeos dos genes presentes no componente A foi observada maior identidade de todos os genes com os do ToSRV-A coletado de pimenta e caracterizado por Bezerra-Agasie et al., 2005. Curiosamente o gene AC1 do ToSRV possui alta identidade com o do ToRMV (AF291705) como pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6. Comparação da porcentagem de identidade das seqüências de nucleotídeos dos genes do componente A do genoma de diferentes espécies de begomovírus.

Espécies de begomovírus	Genes			
	AC1 (Rep)	AC2 (TrAP)	AC3 (Ren)	AV1 (CP)
ToSRV-A [DQ207749] Pim	99	99	99	99
ToSRV-A [AY029750] To	96	97	97	98
ToRMV [AF291705]	96	83	86	81
SiMoV [AY090555]	75	80	81	83
BGMV [M88686]	79	82	83	81
ToCMCV [AY090557]	76	84	86	80
ToCMV [AF490004]	76	83	86	82

Dificuldades na clonagem do componente B foram encontradas. Um total de 1064 colônias obtidas por meio de clonagem com *Xba* I e *Eco*R I foram analisadas e não foram encontrados clones correspondentes ao DNA-B, por análise via PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos PBL1v2040/PCRC1, que amplificam um fragmento em torno de 500 nucleotídeos do DNA-B dos begomovirus. Portanto, adotou-se a estratégia de amplificação do genoma completo do componente B por meio de oligonucleotídeos (GemiBa2 e GemiBs3) desenhados na porção amplificada pelos oligonucleotídeos PBL1v2040/PCRC1. Estes oligonucleotídeos amplificaram um fragmento em torno de 2600 bases (Figura 16). Após o

seqüenciamento do ToSRV-B[PJU] completo, foi observado que a região cortado por *Xba* I está dentro da região amplificada com os oligonucleotídeos PBL1v2040/PCRC1, explicando o porque não conseguimos a triagem por este método.

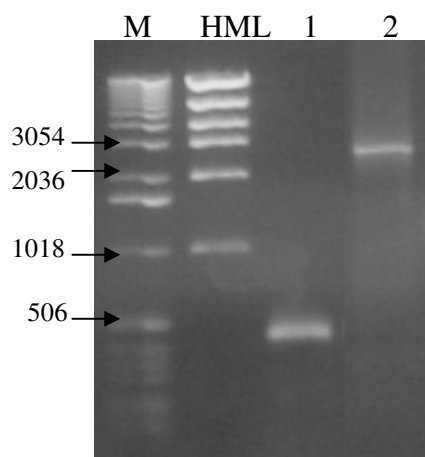


Figura 16. PCR do componente B de ToSRV. M= marcador de comprimento (1 kb DNA ladder, Invitrogen); HML= marcador de peso (High mass ladder, Invitrogen); 1= amplificação com oligonucleotídeos universais PPBL1v2040 e PCRC1 e 2= amplificação com os oligonucleotídeos GemiBa2 e GemiBs3.

As reações de PCR com as combinações dos oligonucleotídeos desenhados GemiB369s/1163a, GemiB182s/1024a, GemiB1559a/Bs1 e GemiB1665a/Ba3 nos permitiram amplificações de fragmentos de 842, 794, 1600 e 2030 nucleotídeos respectivamente (Figura 17).

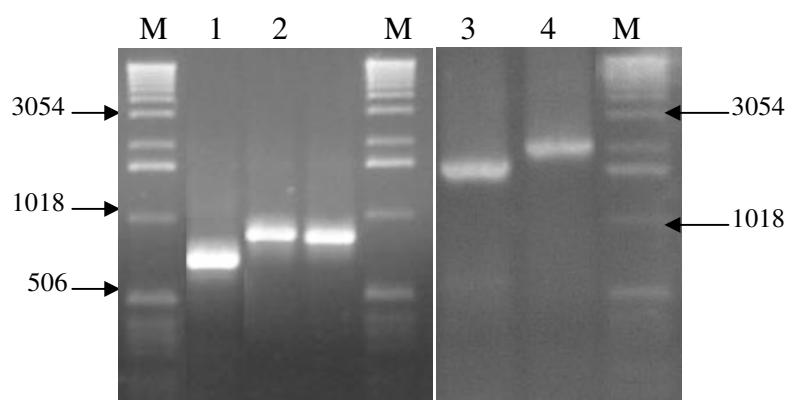


Figura 17 PCR com oligonucleotídeos desenhados para complementar a seqüência genômica do DNA-A de ToSRV. M= marcador de comprimento (1 kb DNA ladder, Invitrogen); 1= amplificação com GemiB369s/1163a; 2= amplificação com GemiB182s/1024a; 3= amplificação com GemiB1559a/Bs1 e 4= amplificação com GemiB1665a/Ba3 .

Foi obtido o seqüenciamento do ToSRV-B[PJU], obtendo-se 2566 nucleotídeos abrangendo a ORF BC1, região comum e ORF BV1. Nos 2566 nucleotídeos analisados o ToSRV-B[PJU] apresentou identidade de 98% com ToRMV-AF291706, isolado de tomate do Triângulo Mineiro, Minas Gerais. Como não há seqüência completa no GenBank para o DNA-B do ToSRV, verificou-se que nos 1136 nucleotídeos disponíveis o ToSRV-B[PJU] apresentou uma identidade de 94% com o ToSRV-AY029751, coletado de tomate de Minas Gerais. Comparando as seqüências de ToRMV-AF291706 com ToSRV-AY029751 parcial, a identidade também foi de 95%. Foram verificadas os elementos conservados (iterons) relevantes para a replicação do DNA (Figura 33). Na região comum entre os componentes A e B do ToSRV[PJU] a identidade de nucleotídeos foi de 96,4% e os elementos conservados (iterons) são idênticos entre eles, indicando que o componente B seqüenciado é o correspondente ao ToSRV-A[PJU] (Figura 18).

	REP-binding site	TATA box	G box
ToSRV-A [PJU]	AATTGGTAGTTATGGTAGCTCT TATATAG TAGAAGT..TCTTTAAGGAGATTCTACACG		
ToSRV-A AY029750	AATTGGTAGTAATGGTAGCTCT TATATAG TAGAAGTTCTCTTTAAGGAGATTGCTACACG		
ToSRV-A DQ207749	AATTGGTAGTTATGGTAGCTCT TATATAG TAGAAGTTCTCTTTAAGGAGATTGCTACACG		
ToRMV-B AF291706	AATTGGTAGTAATGGTAGCTCT TATATAG TAGAAGTTCCCTT.TAAGGAGATTGCTACACG		
ToSRV-B [PJU]	AATTGGTAGTTATGGTAGCTCT TATATAG TAGAAGTTCCCTT.TAAGGAGATTGCTACACG		
ToSRV-B AY029751	AATTGGTAGTTATGGTAGCTCT TATATAG TAGAAGTTCCCTTCTAAGGAGATTGCCACACG		
	***** * ***** * *****		
	Stem	Loop	Stem
ToSRV-A DQ207749	TGG-CGGCCATCCGT TATAATATTAC CGGATGGCCGCGCGATTTTTCCACCCTTTAGTTT		
ToSRV-A AY029750	TGG-CGGCCATCCGT TATAATATTAC CGGATGGCCGCGCGATTTTTCCACCCTTTATTTT		
ToRMV-BAF291706	TGGCCGCCATCCGT TATAATATTAC CGGATGGCCGCCGCGATTTTTCTTATCTGCTACGT		
ToSRV-B [PJU]	TGG-CGGCCATCCGT TATAATATTAC CGGATGGCCGCGCGA.TTTTCTTATCTGCTACGT		
ToSRV-B AY029751	TGG-CGGCCATCCGT TATAATATTAC CGGATGGCCGCGCGATTTTT-TTATCTACTACGT		
	*** ***** * ***** * ***** * ***** * *****		

Figura 18. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos de parte da Região Comum de ToSRV[PJU]-A e ToSRV[PJU]-B e de outros begomovírus. Os elementos conservados (iterons) implicados na replicação, estão indicados sob o alinhamento.

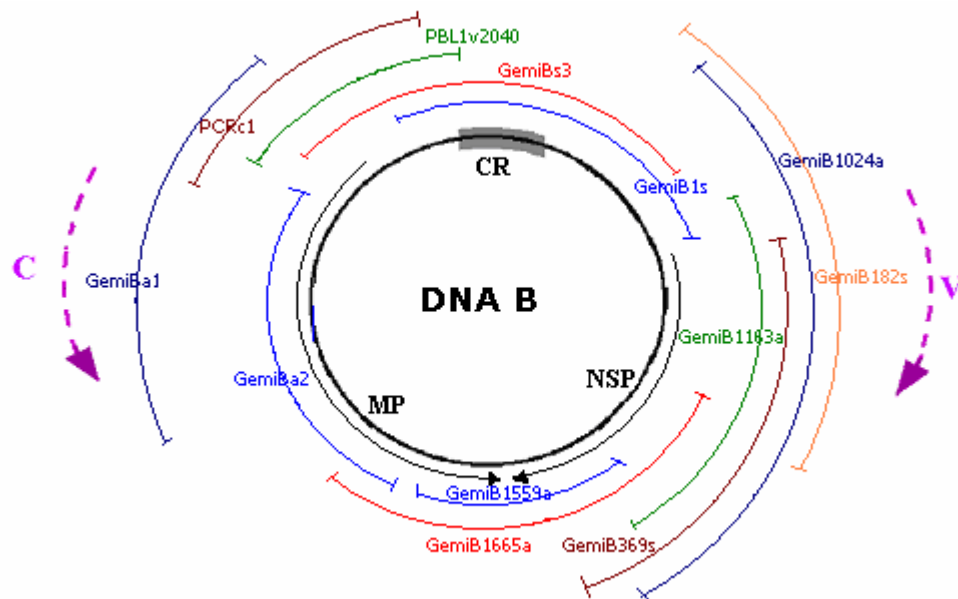


Figura 19. Representação esquemática dos fragmentos seqüenciados com oligonucleotídeos especificados, formando o consenso correspondente ao genoma completo do DNA-B do ToSRV-B[PJU].

Comparando-se a identidade de sequências da ORF BC1 e ORF BV1 do ToSRV-B[PJU], com outras sequências do GenBank, pôde-se observar alta identidade com a BC1 do ToRMV (Tabela 7). Para o componente A foi verificada alta identidade da AC1 (Rep) do ToSRV[PJU] com a AC1 do ToRMV, bem como a análise da região comum entre os isolados de ToRMV e ToSRV indica que esta região que contém os iterons são praticamente idênticos entre estas duas espécies de begomovírus (Figura 18). Os iterons são sítios de ligação vírus específicos da proteína Rep e ajudam o início da replicação viral (Arguello-Astorga et al., 1994; Fontes et al., 1994). A especificidade de ligação da Rep a estas sequências reguladoras da replicação são consideradas o maior determinante para formação de pseudorecombinantes viáveis entre diferentes espécies ou estirpes de begomovírus (Arguello-Astorga et al., 1994; Eagle et al., 1994; Fontes et al., 1994; Chatterji et al., 1999). Deste modo pode-se inferir baseado na análise genômica que o isolado ToSRV[PJU] é provavelmente um pseudorecombinante natural entre um isolado de ToSRV e um de ToRMV. Essa hipótese pode ser testada inoculando na planta o DNA-A de ToSRV e o DNA-B de ToRMV.

Tabela 7. Porcentagem de identidade de nucleotídeos das ORFs BC1 e BV1 presente no DNA-B de diferentes espécies de begomovírus.

Espécie de begomovírus	ORF	
	BC1 (MP)	BV1 (NSP)
Tomato rugose mosaic virus-[Ube] [AF291706]	98	98
<i>Tomato severe rugose virus</i> [AY029751]	Nd	94*
Sida micrantha mosaic virus [AJ557453]	81	78
<i>Bean golden mosaic virus</i> [M88687]	74	69
Tomato mild leaf curl virus - [Uberlândia] [DQ336352]	76	75

Nd= Não disponível; * sequência parcial disponível

6.3. Caracterização biológica

6.3.1. Transmissão por extrato vegetal

A transmissão por extrato vegetal do isolado ToSRV[PJU] a partir de pimentão não foi verificada para nenhuma das espécies de plantas utilizadas, nos três experimentos. Estes resultados indicam que a dificuldade pode ser devido ao vírus estar restrito ao floema, ou que esta planta possui inibidores que dificultam a sua transmissão via extrato vegetal tamponado.

Nos experimentos de transmissão por extrato vegetal tamponado utilizando *Nicotiana benthamiana* positivas para o ToSRV[PJU], obtidas por biobalística o vírus pôde ser transmitido para pimentão ‘Magda’ e *Nicandra physaloides*. O sintoma observado em *N. physaloides* foi a diminuição no tamanho da planta e mosaico internerval (Figura 20). O pimentão demorou três meses para apresentar os sintomas de enrolamento foliar. Resultados semelhantes foram obtidos por Stenger et al. (1990) utilizando o pimentão da cv ‘Jupiter’ ou pimenta ‘Jalapeño’ como fonte de inoculo, verificaram a baixa taxa de transmissão quando comparado a transmissão por extrato vegetal de *N. benthamiana* para *N. benthamiana*.

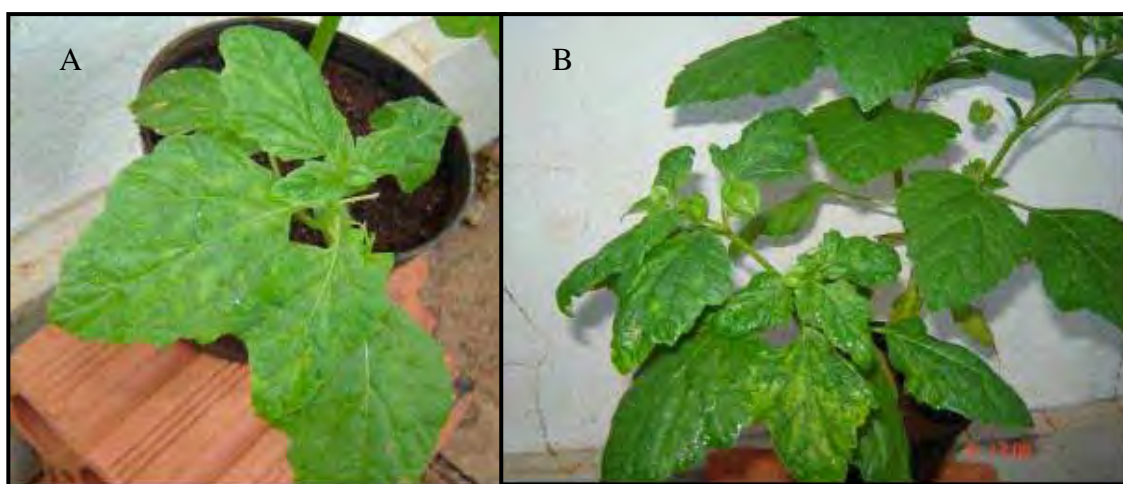


Figura 20. *Nicandra physaloides* inoculada via extrato vegetal a partir de *Nicotiana benthamiana* apresentando A) mosaico internerval e B) drástica redução do tamanho (observar planta sadia ao lado de infectada).

Um outro isolado de ToSRV da planta 192p quando inoculado induziu sintomas de lesão local em pimentão 'Rubia R', mosaico e redução foliar em pimentão 'Magda', amarelecimento e deformação foliar em *Datura stramonium* e *Nicandra physaloides* e clorose seguida de necrose em *Nicotiana rustica* e *N. clevelandi*. Entretanto, quando seqüenciado, este isolado encontrava-se infectado pelo *Pepper yellow mosaic virus*, uma nova espécie de potyvirus frequentemente encontrado em pimentão (Inoue-Nagata et al., 2002). De La Torre-Almaráz et al. (2004), estudando begomovírus em plantas de quiabo, conseguiram eventualmente a transmissão por extrato vegetal para plantas de *D. stramonium* e *N. benthamiana*, sempre em associação com um potyvirus semelhante ao TEV (*Tobacco etch virus*). Mesmo em infecção mista com um potyvirus, o ToSRV não foi capaz de ser transmitido para nenhuma das hospedeiras testadas.

6.3.2. Transmissão por enxertia

Das 20 plantas enxertadas conseguiu-se sucesso no pegamento em apenas oito plantas, sendo três em 'Magali R', duas de 'Rubia R' e três de 'Magda'. Os sintomas nas plantas enxertadas com o isolado ToSRV[PJU] incluíram a distorção foliar, enrolamento da folha, nervuras rendilhadas e tortuosas (Figura 21). Este último sintoma é característico da presença de ácaros em pimentão, porém as plantas em casa de vegetação foram pulverizadas semanalmente, havendo ausência de ácaros que pudessem ocasionar estas alterações nas nervuras. Na planta enxertada os sintomas podem levar até mais de quatro meses para serem visualmente observados.

A detecção viral no porta-enxerto e no enxerto foi realizada via PCR com os oligonucleotídeos universais PALIv1978/PAR1c496 amplificando-se um fragmento com 1100 nucleotídeos (Figura 22).

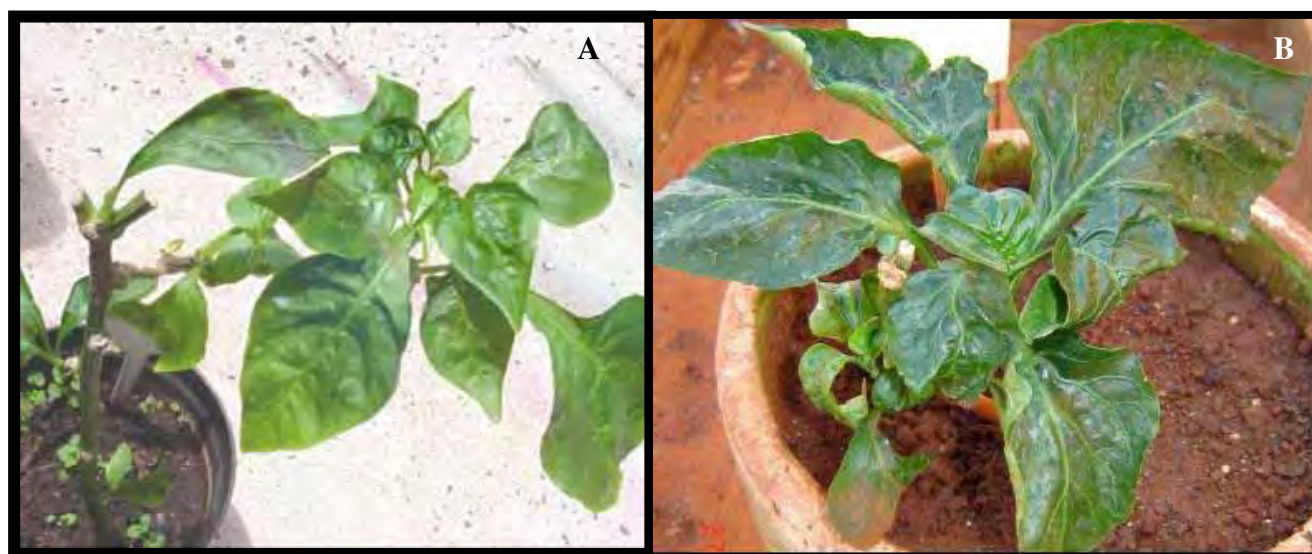


Figura 21. Foto A e B, mostrando a combinação de planta enxertado (enxerto + porta enxerto) com sintomas de distorção foliar, nervuras rendilhadas, tortuosas e enrolamento das folhas.

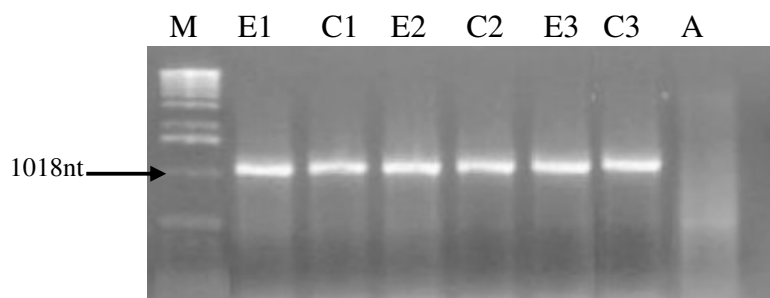


Figura 22. PCR com os oligonucleotídeos universais PALIv1978/PAR1c496 para begomovírus para diagnose de enxertos e porta enxertos. M= marcador de comprimento (1 kb DNA ladder, Invitrogen), A= água; E1= enxerto da planta 1; C1= porta-enxerto da planta 1; E2= enxerto da planta 2; C2= porta-enxerto da planta 2; E3= enxerto da planta 3; C3= porta-enxerto da planta 3.

6.3.3. Transmissão com seringa utilizando o DNA amplificado por Templi Phi

Das seis plantas de pimentão inoculadas com a aplicação direta do DNA amplificado por Templi Phi utilizando-se uma seringa fincada no caule da planta, duas foram positivas para a presença do vírus através de PCR com os oligonucleotídeos universais PALiv1978/PAR1c496. O pimentão começou a apresentar o sintoma típico de enrolamento em torno de 90 dias após a inoculação. Esta técnica mostra-se como uma outra forma alternativa de inoculação de begomovírus, porém apresentando uma alta taxa de escape.

6.3.4. Transmissão por biobalística

O isolado de ToSRV foi transmitido via biobalística para *N. benthamiana*, tomate cv. 'Rutgers' e pimentão 'Ikeda Casca Dura'. Foram observados sintomas de mosaico e amarelecimento em *N. benthamiana* e tomate, assim como enrugamento das folhas e redução no tamanho da planta (Figura 23). Os sintomas foram observados vinte dias após a inoculação. O pimentão 'Ikeda Casca Dura' não mostrou sintomas de enrugamento como observados na cv. Magda, porém foi positivo por PCR.

A transmissão por biobalística foi mais eficiente utilizando-se o DNA amplificado por Templi Phi quando comparado a extração da forma replicativa (RF) tradicionalmente utilizada na inoculação. Talvez este fato esteja relacionado a concentração do DNA viral.

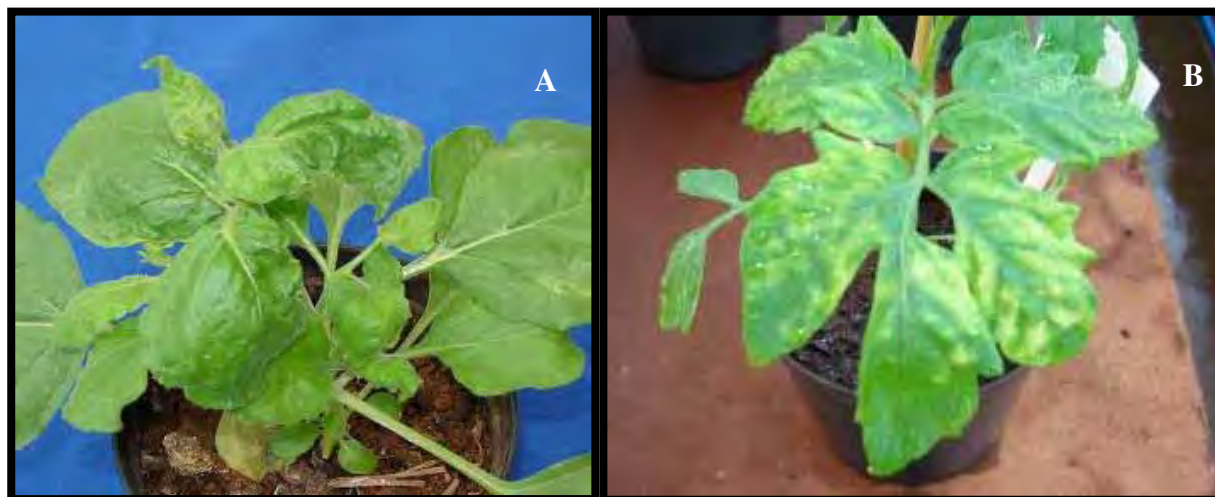


Figura 23. A) *N. benthamiana* inoculada por biobalística com RF apresenta enrugamento foliar e redução no tamanho da planta B) tomate ‘Rutgers’ quando inoculado por biobalística com Templi Phi do ToSRV[PJU], apresentou amarelecimento foliar e mosaico.

6.3.5. Transmissão por mosca branca

Através da mosca-brancas o isolado de ToSRV foi transmitido para 19 espécies das 26 de plantas testadas (Tabela 8). Foram observados diversos sintomas de acordo com a espécie de planta hospedeira testada.

A detecção viral de todas as plantas testadas foi realizada via PCR com os oligonucleotídeos universais PALIv1978/PAR1c496.

Em plantas como *Chenopodium amaranticolor*, *Nicandra physaloides*, *Physalis floridana* e *Lycopersicon esculentum* cv ‘Santa Clara’, após 20 dias da transmissão foi possível a observação de sintomas visuais nas folhas. Para as demais plantas os sintomas apareceram após 35-60 dias. Para algumas plantas de *Capsicum* sp. positiva por PCR, os sintomas foram observados após 90 dias.

Tabela 8. Relação de plantas hospedeiras utilizadas para avaliação e sintomas observados do isolado ToSRV[PJU] transmitidos por mosca-branca.

Espécie testada	PCR	Número de plantas positivas/inoculadas	Sintomas
<i>Capsicum annum</i>			
Magali R	+	7/10	Mq
Magda	+	8/10	Mq
Rubia R	+	8/10	Mq
Martha	+	7/10	Mq
Bruna	+	5/10	Pc e en
Italiano amarelo	+	4/10	-
Paloma	+	1/7	Mq
Impacto	+	3/9	Mq
Doce Comprida	+	5/6	-
<i>Capsicum frutescens</i>	+	4/10	Mq
<i>Chenopodium amaranthicolor</i>	+	2/10	Pc
<i>Chenopodium quinoa</i>	-	0/10	-
<i>Datura stramonium</i>	-	0/10	-
<i>Gomphrena globosa</i>	-	0/10	-
<i>Nicandra physaloides</i>	+	2/10	M e em
<i>Nicotiana rústica</i>	+	1/10	Mq
<i>Nicotiana clevelandii</i>	+	5/10	A
<i>Nicotiana glutinosa</i>	-	0/10	-
<i>Nicotiana tabacum</i>			
TNN	-	0/10	-
Havana 425	-	0/10	-
<i>Petunia hybrida</i>	+	1/10	-
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv 'Pérola'	+	4/9	-
<i>Physalis floridana</i>	+	3/10	Cn e em
<i>Glycine max</i> 'Conquista'	-	0/10	-
<i>Lycopersicon esculentum</i> cv 'Santa Clara'	+	2/10	Ci
<i>Vigna unguiculata</i>	+	5/10	-

(-) : ausência de sintomas; cn: clareamento de nervura; en: enrugamento; M: mosaico; Mq: mosqueado; ci: clorose internerval; Pc: pontos cloróticos; A: amarelecimento

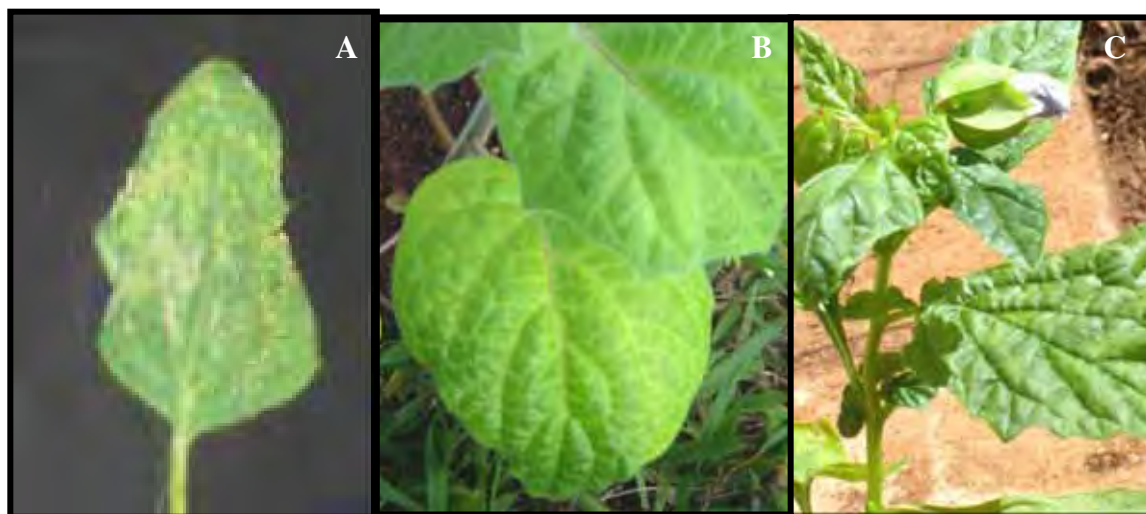


Figura 24. Observação de sintomas 30 dias após a transmissão de vírus com mosca-branca virulíferas. A) *Chenopodium amaranticolor*, pontos cloróticos; B) *Physalis floridana*, clareamento de nervura e enrugamento foliar e C) *Nicandra physaloides*, mosaico e enrugamento foliar.

Tentativas anteriores foram feitas usando como fonte de inóculo pimentão positivo com ToSRV[PJU], observando-se que as moscas brancas (mantidas em plantas de soja no IAC) quando transferidas para aquisição do begomovírus em pimentão apresentavam alta taxa de mortalidade. Este experimento indicou que o pimentão não é um hospedeiro preferencial da mosca-branca, quando presente outra cultura como fonte de alimento. Outra tentativa, realizada no IAC, foi forçar as moscas brancas a formar sua população em plantas de pimentão sadio, no entanto a reprodução destas no pimentão sempre foi insuficiente para realização do teste de transmissão para todas as espécies de plantas propostas no estudo. Durante a coleta de amostras de pimentão, em estufas com alta população de mosca-branca foram obtidas algumas ninfas presentes em planta de pimentão, afim de se iniciar uma colônia a partir de moscas coletadas diretamente desse hospedeiro. Entretanto, foram encontradas dificuldades no estabelecimento de uma colônia com boa população desses insetos. Morales e Jones (2004), estudando a ecologia e epidemiologia da mosca branca,

confirmaram que um dos fatores para o crescimento da população do vetor é a temperatura que deve permanecer com uma média de 24°C ou mais para o desenvolvimento do ciclo do inseto. Durante as tentativas, a temperatura era inferior a 24°C ou ocorria frentes frias frequentemente o que possivelmente explica o insucesso no estabelecimento da praga.

Aproximadamente 50% do feijão 'Pérola' e o feijão caupi foram infectados pelo ToSRV[PJU] utilizando-se a mosca-branca como vetora, indicando que os begomovírus que infectam solanáceas em condições de campo também podem infectar leguminosas como hospedeiras alternativas, porém sem causar danos aparentes dada a ausência de sintomas observados. No caso do ToRMV, espécie que apresentou alta identidade da AC1 e do componente B com o isolado de ToSRV[PJU], o componente B deste vírus já foi verificado infectando naturalmente feijão que se encontrava ao lado de plantações comerciais de tomate, porém não tendo sido encontrado o componente A correspondente, indicando que naturalmente este vírus também poderia infectar feijão (Fernandes et al., 2006). Em condições de laboratório, utilizando-se a transmissão por extrato vegetal e biobalística, o ToRMV nunca foi transmitido para feijão, bem como para o pimentão utilizando-se o extrato e a enxertia (Fernandes et al., 2006), mostrando comportamento diferencial de hospedeiras quando comparado ao ToSRV[PJU]. O isolado ToSRV[PJU] mostrou-se capaz de infectar somente as espécies de fumo *N. rustica* e *N. clevelandii* e curiosamente causou sintomas de pontos cloróticos em *C. amaranthicolor*.

Todas as cultivares de pimentão testados foram infectados pelo ToSRV[PJU] em quantidades variadas, demonstrando sintomas de mosqueado, pontos cloróticos e clareamento de nervura ou ausência de sintomas no caso do pimentão italiano amarelo (Tabela 8), indicando alta suscetibilidade das cultivares atualmente encontradas no mercado.

6.4 Caracterização citológica

As células das plantas infectadas foram examinadas por microscopia eletrônico de transmissão para averiguar possíveis modificações citológicas provocadas pelo ToSRV [PJU] no hospedeiro. A morfologia das células de folhas infectadas e com sintomas da doença foram comparadas com as células de folhas saudáveis.

Foram encontradas algumas modificações no nucléolo das células associadas ao tecido vascular de plantas infectadas com o ToSRV[PJU], semelhantes às causadas pelo BGMV em feijoeiro (Kim et al. 1978). Leve hipertrofia do nucléolo em comparação ao nucléolo da célula saudável (Figuras 25), segregação do nucléolo (Figuras 26) e o aparecimento de anéis fibrilares de vários tamanhos associados com o nucléolo segregado (Figura 27) foram visualizados somente em plantas doentes.

Kim et al. (1978) verificaram que em feijoeiro estas modificações ocorriam após seis dias de inoculação e somente nas células do floema, não tendo sido verificadas alterações do nucléolo em células da epiderme, mesófilo e do xilema. Da mesma forma encontraram partículas virais somente no núcleo de células do floema.

Em células infectadas também foram verificados menor número de cloroplastos em relação à célula saudável e grânulos presentes no interior da mitocôndria (Figura 28). Foram observados grânulos de cristais próximos a parede celular tanto em células infectadas como saudáveis (Figura 29).



Figura 25. Eletrofotomicrografia de células associadas ao tecido vascular de pimentão Lilac sadio. Seta indica nucléolo em célula sadia. Aumento 7.750 X.

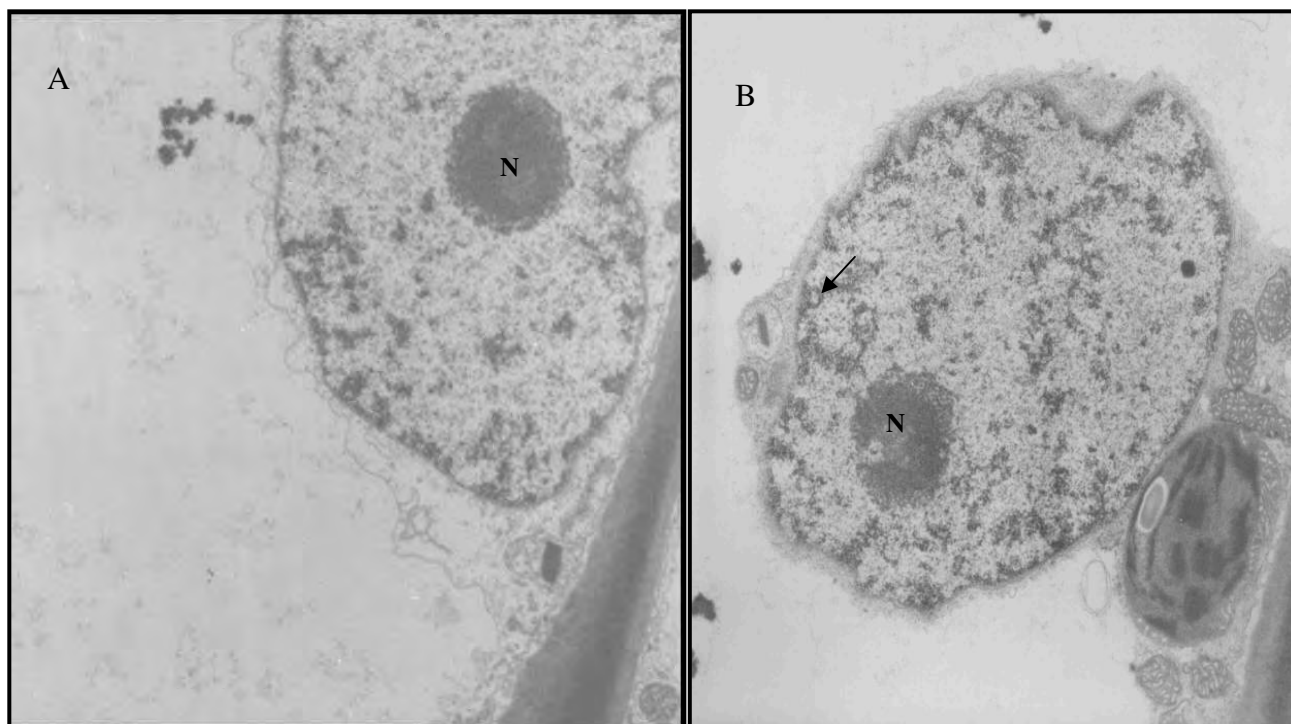


Figura 26. Eletrofotomicrografia de células associadas ao tecido vascular de pimentão Lilac infectado pelo ToSRV[PJU]. A-segregação do nucléolo (N) em célula infectada. B-seta indica a formação de pequeno anel fibrilar e nucléolo e estágio mais avançado de segregação. Aumento 9.750 X e 13.250X, respectivamente.

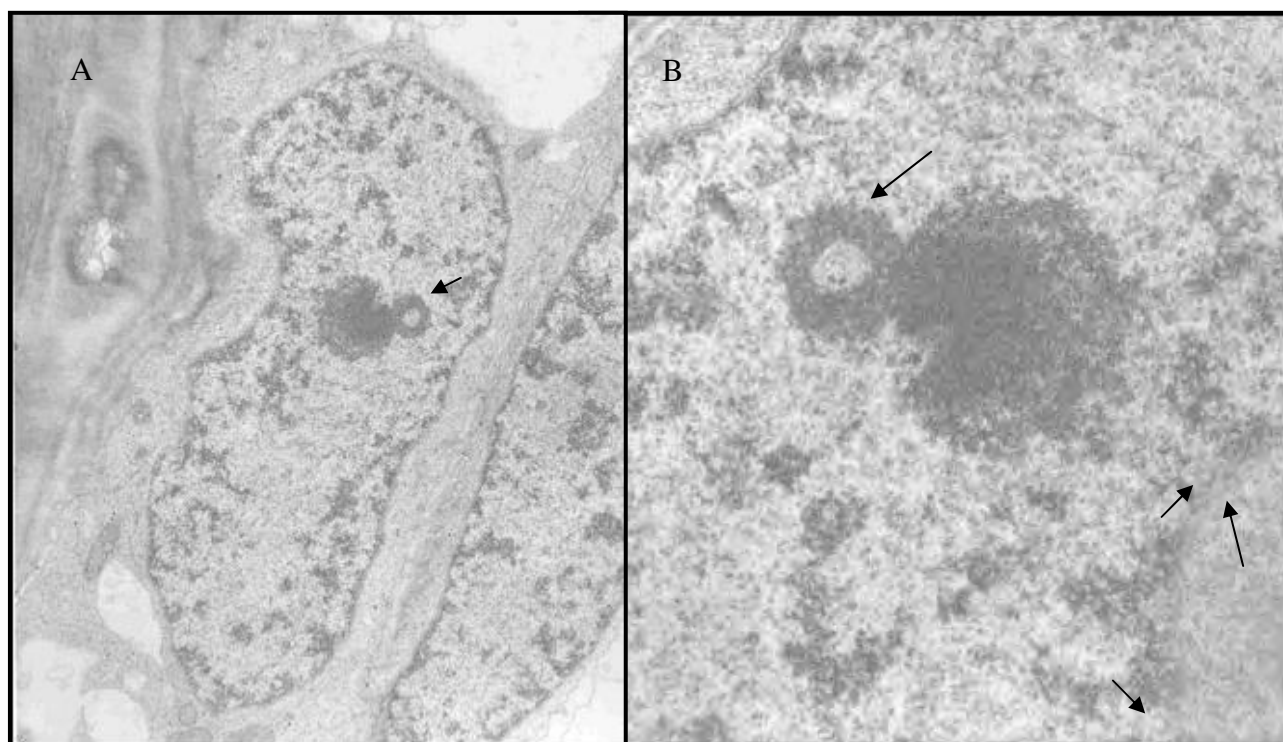


Figura 27. Eletrofotomicrografia de células associadas ao tecido vascular de pimentão Lilac infectado pelo ToSRV[PJU]. A) Anel fibrilar formado apartir do nucléolo segregado em célula infectada e B) setas indicam o anel fibrilar maior e e pequenos anéis. Aumento 9.750 X e 31.500X, respectivamente.

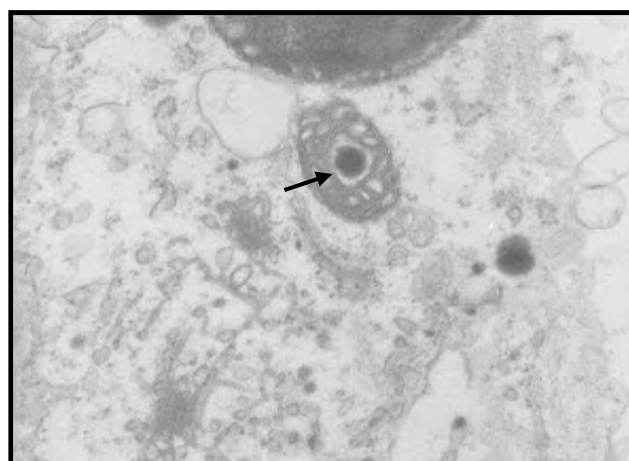


Figura 28. Eletrofotomicrografia de nervura foliar de Pimentão Lilac infectada por ToSRV [PJU]. Observação de grânulos no interior da mitocôndria. Aumento 23.000X

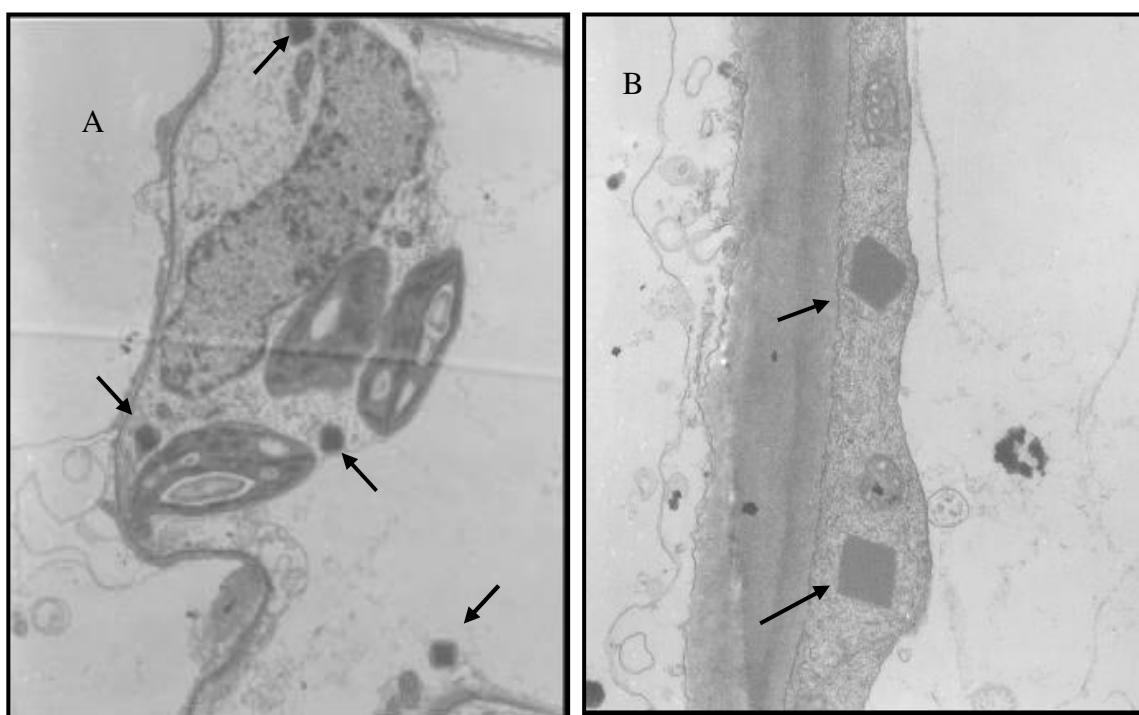


Figura 29. Setas indicando os grânulos de cristais observados em células de plantas sadia (A) e em células de planta infectada por ToSRV[PJU]. Aumento 7750X e 23000X respectivamente.

7. CONCLUSÕES

ToSRV é de baixa ocorrência e pode ser considerado a espécie de begomovírus predominante nas principais áreas de produção comercial de pimentão do Estado de São Paulo;

ToSRV[PJU] é provavelmente um pseudorecombinante natural entre ToSRV e ToRMV, compartilhando um DNA-B do ToRMV;

ToSRV[PJU] é transmitido por extrato vegetal a partir de *N. benthamiana* para *N. physaloides* e pimentão ‘Magda’, porém não é transmitido utilizando-se o pimentão como fonte de inóculo;

ToSRV[PJU] é transmitido por enxertia, biobalística e mosca-branca;

O feijão comum e o feijão caupi são hospedeiros de ToSRV[PJU];

ToSRV[PJU] induz alterações citológicas nas células associadas ao tecido vascular (floema) do pimentão cultivar Lilac, como presença de anéis fibrilares formados a partir do nucléolo e cristais na mitocôndria.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AGRIANUAL, **Revista Anuário da Agricultura Brasileira**, FNP Consultoria & Agroinformática, “Pimentão”, p. 336 , 2006.

ANDRADE, E.C. et al. Análise parcial dos determinantes genéticos virais responsáveis pela indução diferencial de sintomas por begomovírus em tomateiro e *Nicotiana benthamiana*. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, suplemento, p.S225, 2006.

AMBROZEVICIUS, L.P. et al. Genetic diversity of begomovirus infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p.372-377, 2002.

ARGÜELLO-ASTORGA G.R., HERRERA-ESTRELLA, L.; RIVERA-BUSTAMANTE, R. Experimental and theoretical definition of geminivirus origin of replication. **Plant Molecular Biology**, v.26, p.553-556, 1994a.

AZZAM, O. et al. Whitefly transmission and efficient ss-DNA accumulation of bean golden mosaic geminivirus require functional coat protein. **Virology** 204:289–96.1994.

- BASS, H.W. et al. Chromosome condensation induced by geminivirus infection of mature plant cells. **Journal of Cell Science**, v.113, p.1149-1160, 2000.
- BEDFORD, I.D. et al. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographical regions. **Annals of Applied Biology**, v. 125, p. 311-325, 1994.
- BEZERRA, I.C. et al. Occurrence of geminivirus in tomato-producing areas in Submédio São Francisco. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.331, 1997.
- BEZERRA-AGASIE, I.C., et al. First report of *Tomato severe rugose virus* in chili pepper in Brazil. **Plant Disease**, v.90, p.114, 2006.
- BROWN, J. K. et al. The core region of the coat protein gene is highly useful for establishing the provisional identification and classification of begomoviruses. **Archives of Virology**, v.146, p.1581-1598, 2001.
- BROWN, J.K.; POULOS, B.T. Serrano golden mosaic virus - a newly identified whitefly-transmitted geminivirus of pepper and tomato in the United States and Mexico. **Plant Disease**, v. 74, p. 720, 1990
- CHATTERJI, A. et al. Identification of replication specificity determinants in two strains of tomato leaf curl virus from New Delhi. **Journal of Virology**, v.73, p.5481-5489, 1999.
- COSTA, A.S. Three whitefly-transmitted virus diseases of beans in São Paulo, Brazil. **Plant Protection Bulletin F.A.O.**, v.13, p. 2-12, 1965.
- COSTA, A.S. Increase in the populational density of *Bemisia tabaci*, a threat to widespread virus infection of legume crops in Brazil. Pp.171 In: BIRD, J.; MARAMOROSCH, K. (Eds.) **Tropical Diseases of Legumes**. New York: Academic Press, 1975.
- DE LA TORRE-ALMARÁZ, R. et al. Caracterización de un nuevo geminivirus asociado con

* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA Faculdade de Ciências Agrônomicas.
Normas para elaboração de dissertações e teses – ABNT NBR 10520. Botucatu, 2002.

los síntomas de moteado amarillo de la okra (*Abelmoschus esculentum*) en México.

Agrociencia, v. 38, p. 227-238, 2004.

DELLAPORTA, S.L.; WOODS, J.; HICKS, J.B. A plant DNA minipreparation, version II.

Plant Molecular Biology Reporter, v.1, p.19-21, 1983.

EAGLE, P.A; OROZCO, B.M.; HANLEY-BOWDOIN, L. A DNA sequence required for

geminivirus replication also mediates transcriptional regulation. **Plant Cell**, v.6, p.1157-1170.

ELMER, J.S. et al. *Agrobacterium*- mediated inoculation of plants with tomato golden mosaic virus DNAs. **Plant Molecular Biology**, v.10, p.225-234, 1988.

FARIA, J.C. et al. Situação atual das geminiviroses no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 125-137, 2000.

FARIA, J.C.; ZERBINI, F.M. Família Geminiviridae - taxonomia, replicação e movimento.

Revisão Anual de Patologia de Plantas, v. 8, p. 25-65, 2000.

FARIA, J.C. et al. A new geminivirus associated with tomato in the State of São Paulo, Brazil.

Plant Disease, v.81, p.423, 1997

FAUQUET, C.M.; STANLEY, J. Geminivirus classification and nomenclature: progress and problems. **Annals of Applied Biology**, v.142, p.165-189. 2003

FERNANDES, J.J. et al. Biological and molecular properties of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. **Plant Pathology**. v.55, p. 513–522, 2006.

FONTES, E.P.B. et al. Geminivirus replication origins have a modular organization. **Plant Cell**, v.6, p.405-416, 1994.

FRANÇA, F.H.; VILLAS BÔAS, G.L.; CASTELO-BRANCO, M. Ocorrência de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera:Aleyrodidae) no Distrito Federal. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.25, p.369-372, 1996.

- GAIMARI, S. New national records *Bemisia tabaci* (Gennadius), Biotype Q (Aleyrodidae). *In: GAIMARI, S. California Plant Pest & Disease Report*. v.22, n.1, 2005, 78p.
- GALVÃO, R.M. et al. A naturally occurring recombinant DNA-A of a typical bipartite begomovirus does not require the cognate DNA-B to infect *Nicotiana benthamiana* systemically. **Journal of General Virology**, v.84, p.715-726, 2003.
- GARZON-TIZNADO, J.A. et al. Inoculation of peppers with infectious clones of a new geminivirus by a biolistic procedure. **Phytopathology**, v.83, p.514-521, 1993.
- GILBERTSON, R.L. et al. Differentiation of bean-infecting geminiviruses by nucleic acid hybridization probes and aspects of bean golden mosaic in Brazil. **Plant Disease**, v. 75, p. 336-342, 1991.
- GILBERTSON, R.L. et al. Pseudorecombination between infectious cloned DNA components of tomato mottle and bean dwarf mosaic geminiviruses. **Journal of General Virology**, v. 74, p.23-31, 1993.
- GHANIM, M.; CZOSNEK, H. Tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV-Is) is transmitted among whiteflies (*Bemisia tabaci*) in a sex-related manner. **Journal of Virology**, v.74, n.10, p.4738-4745, 2000.
- HANLEY-BOWDOIN, L. et al. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 18, p. 71-106, 1999.
- HOU, Y.M.; MAXWELL, D.P.; GILBERTSON, R.L. Pseudo recombination between two distinct geminiviruses host range determinants reside on the DNA-B component. **Phytopathology**, v. 82, p.1070, 1992.
- IDRIS, A.M.; FLETCHER, D.C.; BROWN, J.K. Identification and partial characterization of a new whitefly-transmitted geminivirus affecting tomato and pepper from Sinaloa, México. **Phytopathology**, v. 83, p. 692, 1993.

IEA, Área e produção dos principais produtos da agropecuária do Estado de São Paulo, Instituto de Economia Agrícola. <http://www.iea.gov.br/>, consultado em 20/10/2005.

INOUE-NAGATA, A.K. et al. *Pepper yellow mosaic virus*, a new potyvirus in sweet pepper *Capsicum annuum*. **Archives of Virology** v.147, p.849-855, 2002.

KIM, K.S. et al. Infection of *Phaseolus vulgaris* by bean golden mosaic virus: Ultrastructural aspects. **Virology**, v.89, p.22-33, 1978.

KUMAR, S. et al. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v. 5, p. 150-163, 2004.

LAZAROWITZ, S.G. Geminiviruses: Genome structure and gene function. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v.11, p.327-349, 1992.

LIMA, M.F. et al. Detection of sweet pepper whitefly-transmitted geminivirus in the “Submédio” of San Francisco Valley. Programa e Resumos, **22º Congresso Paulista de Fitopatologia**, Jaboticabal, SP. p. 106, 1999.

LIMA, M.F. et al. Distribuição de geminivírus nas culturas do tomate e pimentão em doze municípios do Submédio do Vale de São Francisco. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p. 81-85, 2001.

LOTRAKUL, P. et al. Occurrence of a strain of *Texas pepper virus* in tabasco and habanero pepper in Costa Rica. **Plant disease**, vol.84, n.2, p.168-172, 2000.

MATYS, J.C. et al. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v.1, p. 267-275, 1975.

MELO, P.C.T. Mosca branca ameaça produção de hortaliças. Campinas, SP, Brazil. 2p. Asgrow do Brasil Sementes Ltda. Informe Técnico, 1992.

MORALES, F.J. Conventional breeding for resistance to *Bemisia tabaci*-transmitted geminiviruses. **Crop Protection**, v. 20, p. 825-834, 2001.

MORALES, F.J.; ANDERSON, P.K. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. **Archives of Virology**, v. 146, p. 415-441, 2001.

MORALES, F.J.; JONES, P.G. The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. **Virus Research**, v.100, p.57-65, 2004.

MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J. Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. **Virus Research**, v. 71, p. 123-134, 2000.

MORRA, M.R., PETTY, T.D. Tissue specificity of geminivirus infection is genetically determined. **Plant Cell**, v. 12, p.2259-2270, 2000.

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.925-32,1994.

NOZAKI, D.N. et al. First report of *Tomato severe rugose virus* infecting pepper plants in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n3, p.5040, 2006.

PADIDAM, M.; SAWYER, S.; FAUQUET, C. M. Possible emergence of new geminivirus by frequent recombination. **Virology**, v.265, p.218-225, 1999.

PAPLOMATAS, E.J. et al. Geminivirus complexes associated with tomato and pepper disease in México. **Phytopathology**, v. 82, p. 1070, 1992.

POLSTON, J.E.; ANDERSON, P.K. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. **Plant Disease**, v. 81, p. 1358-1369, 1997.

RABELLO, A.R. et al. Diferenciação de biótipos de *Bemisia tabaci* utilizando PCR-RFLP e seqüenciamento da região ITS1 rDNA. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 23p., 2005.

RIBEIRO, S.G. et al. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. **Archives of Virology**, v. 148, p. 281-295, 2003.

RIBEIRO, S.G. et al. Widespread occurrence of tomato geminiviruses in Brazil, associated

with a new biotype of the whitefly vector. **Plant Disease**, v. 82, p. 830, 1998.

RIBEIRO, S.G. et al. Occurrence of geminivirus in tomato plants in Bahia. In: **VIII Encontro Nacional de Virologia** (Anais), p. 290, 1996.

RIBEIRO, S.G. et al. Tomato infection by geminivirus in the Federal District, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**. v.19, p.330, 1994.

ROJAS, M.R. et al. Use of degenerate oligonucleotídeos in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease**, v. 77, p. 340-347, 1993.

ROJAS, M.R. et al. Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. **Annual Review Phytopathology**, v 43, p.361–394, 2005.

ROYE, M.E. et al. *Tomato dwarf leaf curl virus*, a new bipartite geminivirus associated with tomatoes and peppers in Jamaica and mixed infection with *Tomato yellow leaf curl virus*. **Plant Pathology**, v. 48, p. 370-378, 1999.

SALATI, R. et al. *Tomato yellow leaf curl virus* in the Dominican Republic: Characterization of an infectious clone, virus monitoring in whiteflies, and identification of reservoir hosts. **Phytopathology**, v. 92, p. 487-496, 2002.

SANDERFOOT, A.A.; INGHAM, D.J.; LAZAROWITZ, S.G. A viral movement protein as a nuclear shuttle—The geminivirus BR1 movement protein contains domains essential for interaction with BL1 and nuclear localization. **Plant Physiology**, v.110, p.23–33, 1996.

SANTOS, C.D.G., ÁVILA, A.C. & RESENDE, R.O. Estudo da interação de um begomovírus isolado de tomateiro com a mosca branca. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.664-673, 2003.

SETTLAGE, S.B; MILLER, A.B.; HANLEY-BOWDOIN, L. Interactions between geminivirus replication proteins. **Journal of Virology**, v.70, p.6790–95, 1996.

STANLEY, J. Geminiviridae. *IN*: FAUQUET, C.M. et al. **Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**, London, Elsevier/Academic Press; p.301-326, 2005.

STENGER, D.C.; DUFFUS, J.E.; VILLALON, B. Biological and genomic properties of a okra geminivirus isolated from pepper. **Phytopathology**, v. 80, p. 704-709, 1990.

TSAI, W.S. et al. Molecular characterization of *Pepper yellow leaf curl Indonesia virus* in leaf curl and yellowing diseased tomato and pepper in Indonesia. **Plant Disease**, v.90, p.247, 2006.

THOMPSON, J.D. et al. The Clustal X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, 24:4876-4882, 1997.

TORRES-PACHECO, I. et al. Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the Southern United States. **Phytopathology**, v. 86, p. 1186-1192, 1996.

VOINNET, O.; PINTO, Y.M.; BAULCOMBE, D.C. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.96, p.14147–14152, 1999.

WYATT, S.D. & BROWN, J.K. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate oligonucleotídeos and polymerase chain reaction. **Phytopathology**, v.86, p.1288-1293, 1996.

ZERBINI, F.M. et al. Um novo geminivirus isolado de tomateiro (*L. esculentum*) em Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v. 21, p.430, 1996.

APÊNDICE

DNA-A

Definição: *Tomato severe rugose virus* strain Piraju- São Paulo, Brasil segmento do DNA-A, sequência completa.

Palavras chaves:

Tipo *Tomato severe rugose virus*

Organismo *Tomato severe rugose virus*

Virus: ssDNA ; *Geminiviridae*; *Begomovirus*.

Referencia: 1 (bases 1 to 2591)

```
source      1..2591
            /organismo="Tomato severe rugose virus"
            /molécula tipo="DNA genômico"
            /isolado="Piraju- São Paulo"
            /hospedeiro específico="Capsicum annum"
            /segmento="DNA-A"
            /país ="Brazil"
            2268...2591; 1...140
            "região comum"
```

```
gene       138...893
            /gene="AV1"
```

```
CDS        138...893
            /gene="AV1"
            /nota="CP; AR1"
            /codon de início=1
            /produto="capa protéica"
            /trandução=
```

```
1          ATGCCTAAGCGTGATGCCCCATGGCGTTTAAACGGCGGGAACCTTCAAAGGTTTCCCGCTCT
1          M P K R D A P W R L T A G T S K V S R S
61         GTCAATTATTCTCCCCGTGCAGGATATGGACCCAAATATAACAAGGCCGCTGAGTGGGTG
21         V N Y S P R A G Y G P K Y N K A A E W V
121        AACAGGCCCATGTACAGGAAGCCCAGGATCTACCGTACTTTGAGAGGCCCCAGATGTTTCT
41         N R P M Y R K P R I Y R T L R G P D V P
181        AGAGGCTGTGAAGGGCCTTGTAAGGTTTCAGTCTTACGAGTCTCGCCATGATGTTTCCCAT
61         R G C E G P C K V Q S Y E S R H D V S H
```

```

241      GTCGGGAAGGTGATTTGTGTGTCTGACGTTACACGTGGTAACGGTATTACTCACCGTGTT
81      V G K V I C V S D V T R G N G I T H R V
301      GGTAAGCGTTTTCTGCGTGAAGTCTGTATATATTTTAGGGAAGGTATGGATGGACGAGAGC
101     G K R F C V K S V Y I L G K V W M D E S
361     ATCAAGTTGAAGAATCACACAAATAGTGTGATGTTCTGGTTGGTTAGAGATCGGAGACCT
121     I K L K N H T N S V M F W L V R D R R P
421     TATTCGACACCTATGGATTTTTGGCCAGGTGTTCAACATGTTTGACAACGAGCCTAGCACT
141     Y S T P M D F G Q V F N M F D N E P S T
481     GCAACTGTTAAGAACGATCTTCGGGATCGTTTTTCAGGTTCATGCACAAGTTTTATGCCAAG
161     A T V K N D L R D R F Q V M H K F Y A K
541     GTTACTGGTGGACAGTATGCCAGTAATGAGCAGGCATTAGTGAAGCGCTTTTGGAAAGGTC
181     V T G G Q Y A S N E Q A L V K R F W K V
601     AACAACAACGTAGTCTACAACCATCAGGAGGCAGGGAAATACGAGAATCATACTGAGAAC
201     N N N V V Y N H Q E A G K Y E N H T E N
661     GCCTTGCTATTGTATATGGCATGTACTCATGCCTCTAACCCCGTGTATGCTACATTGAAA
221     A L L L Y M A C T H A S N P V Y A T L K
721     ATTCGGATCTATTTTTATGATTTCGATTACTAATTAA
241     I R I Y F Y D S I T N * "

```

gene complemento (890...1288)

/gene="AC3"

CDS complemento (890...1288)

/gene="AC3"

/nota="AL3"

/codon de início=1

/produto="proteína AC3"

/tradução="

```

1      ATGGATTACGCACAGGGGAACCTCATCACTGCACTTCAGGCAGAGAATGGCGTTTTATATT
1      M D S R T G E L I T A L Q A E N G V Y I
61     TGGGAGATATCAAATCCCCTCTATTTCAAGATAAACAGAGTGGAGGATCCAATGTACACC
21     W E I S N P L Y F K I N R V E D P M Y T
121    GCGAGCAGAGTCTACCACGTCCTCAAAATACGGTTCAACCACAACCTGAGGAGAGCATTGCAT
41     A S R V Y H V Q I R F N H N L R R A L H
181    CTCCACAAGAGCTTCCCTCAACTTCCAGATATGGACGACTTCACTGACAGCTTCTGGGACC
61     L H K S F L N F Q I W T T S L T A S G T
241    ACATATTTAAGTAGATTTAAATATTTAGTCTTATTGTATCTAGATCGATTAGGCGTTATT
81     T Y L S R F K Y L V L L Y L D R L G V I
301    TCCATTAATAATGTAATCAGAGCTGTTTCGTTTTCGCAACAGACAAATCATATGTAAATGCT
101    S I N N V I R A V R F A T D K S Y V N A
361    GTACTCGAAAATCATTCAATAAAAATTTAAATTTTATTAA
121    V L E N H S I K F K F Y * "

```

gene complemento (1026...1424)

/gene="AC2"

CDS complemento (1026...1424)

/gene="AC2"
 /nota= "proteína transativadora; AL2"
 /codon de início=1
 /produto="TrAP"
 /tradução="

```

1 ATGCGAAATTCGTCTTCTTAAACACCCCCCTCTATCAAGGTACAACACAGAGCTGCTAAA
1 M R N S S S L T P P S I K V Q H R A A K
61 AAACGAGGAATCAGGAGACGACGAATTGATATAGAGTGCGGGTGCTCTATTTACGTACAC
21 K R G I R R R R I D I E C G C S I Y V H
121 ATCGACTGCAGAGGACATGGATTACGCACAGGGGAACTCATCACTGCACTTCAGGCAGA
41 I D C R G H G F T H R G T H H C T S G R
181 GAATGGCGTTTATATTTGGGAGATATCAAATCCCCTCTATTTCAAGATAAACAGAGTGGA
61 E W R L Y L G D I K S P L F Q D K Q S G
241 GGATCCAATGTACACCGCGAGCAGAGTCTACCACGTCCAAATACGGTTCAACCACAACCT
81 G S N V H R E Q S L P R P N T V Q P Q P
301 GAGGAGAGCATTGCATCTCCACAAGAGCTTCCCTCAACTTCCAGATATGGACGACTTCACT
101 E E S I A S P Q E L P Q L P D M D D F T
361 GACAGCTTCTGGGACGACATATTTAAGTAG
121 D S F W D D I F K * "
```

gene complemento (1366...2424)

/gene="Rep"

CDS complemento (1366..2424)

/gene="Rep"

/nota="proteína iniciadora da replicação; AC1; AL1"

/codon de início=1

/produto="Rep"

/tradução="

```

1 ATGCCATCAGCTCCAAAGCGCTTTCAAATAAAAGCGAAGAATTATTTCTCACATATCCC
1 M P S A P K R F Q I K A K N Y F L T Y P
61 AAATGCTCATTATCGAAAGAAGAAGCACTTTCCCAATTAACCCCTAAACACTCCYACA
21 K C S L S K E E A L S Q L K T L N T P T
121 AATAAGAAGTTCATCAAGGTTTGCAGAGAGCTCCATGAAAATGGGGAGCCTCATCTCCAC
41 N K K F I K V C R E L H E N G E P H L H
181 GTGCTTCTTCAATTTGAGGGCAACTACTGCTGCCAAAATCAACGATTCTTCGACCTGGTC
61 V L L Q F E G N Y C C Q N Q R F F D L V
241 TCCCAACAAGGTCAACACATTTCCATCCGAACATTGAGAGAGCTAAGTCATCGTCCGCAC
81 S P T R S T H F H P N I Q R A K S S S D
301 GTCAAATCCTATGTCGACAAGGACGGAGATACTATCGAGTGGGGGAATTCCAAATCGAC
101 V K S Y V D K D G D T I E W G E F Q I D
361 GGAAGAAGTGCTAGAGCGGTGCGCAGACAGCTAACGACGCTGCCGAGAACGCTTGAAC
121 G R S A R G G T C Q T A N D A A E A L N
421 GCACCTTCCAAAGACGTCGCCTTGCAGATAATCCGTGAGAAGCTGCCTGAAAAGTTCTTA
141 A P S K D V A L Q I I R E K L P E K F L
```

```

481      TTTGAGTTTCACAATCTAAATAGTAATTTAGATAGGATATTTACAAGGGCTCCGGAGCCA
161      F Q F H N L N S N L D R I F T R A P E P
541      TGGGCCCTACGTTTCCCCTCTCCTCTTTACTAGCGTACCGAGAGAGATGCAAGCTTGG
181      W A P T F P L S S F T S V P R E M Q A W
601      GCAGATGACTATTTTGGGAGAGGAGCCGCTGCGCGGCCGGAACGACCTATTAGTATCATC
201      A D D Y F G R G A A A R P E R P I S I I
661      ATTGAAGGTGATTCTCGAACGGGAAAGACGATGTGGGCACGTGCATTAGGGGCCATAAT
221      I E G D S R T G K T M W A R A L G A H N
721      TATTTGAGTGGACACCTGGATTTCAATCCTAGGGTTTATTCAAATCATGTTGAATATAAC
241      Y L S G H L D F N P R V Y S N H V E Y N
781      GTCATCGATGACATCGCACCCGCACTATCTAAAGTTAAAGCACTGGAAAAGAAATTGCTTGGG
261      V I D D I A P H Y L K L K H W K E L L G
841      GCCCAAAGGATTGGCAATCAAACCTGCAAATACGGAAAGCCAGTTCAAATTAAGGTGGT
281      A Q K D W Q S N C K Y G K P V Q I K G G
901      ATCCCATGCATCGTGCTTTGCAATCCTGGCGAGGGGGCCAGCTATAAATGTTTCTCGAC
301      I P C I V L C N P G E G A S Y K C F L D
961      AAAGAAGAAAATGCAAGTCTAAATAATTGGACAAAAGCACAATGCGAAATTCGTCCTCCTT
321      K E E N A S L N N W T K H N A K F V F L
1021    AACACCCCTCTATCAAGGTACAACACAGAGCTGCTAA
341      N T P L Y Q G T T Q S C * "

```

gene complemento (2007..2270)

/gene="AC4"

CDS complemento (2007..2270)

/gene="AC4"

/codon de início=1

/produto="proteína AC4"

/tradução=""

```

1      ATGAAAATGGGGAGCCTCATCTCCACGTGCTTCTTCAATTTGAGGGCAACTACTGCTGCC
1      M K M G S L I S T C F F N L R A T T A A
61     AAAATCAACGATTCTTCGACCTGGTCTCCCAACAAGGTCAACACATTTCCATCCGAACA
21     K I N D S S T W S P Q Q G Q H I S I R T
121    TTCAGAGAGCTAAGTCATCGTCCGACGTCAAATCCTATGTCGACAAGGACGGAGATACTA
41     F R E L S H R P T S N P M S T R T E I L
181    TCGAGTGGGGGAATTCCAAATCGACGGAAGAAGTGCTAGAGGCGGTTGCCAGACAGCTA
61     S S G G N S K S T E E V L E A V A R Q L
241    ACGACGCTGCCGAGAAGCCTTGA
81     T T L P Q K P * "

```

```

1      TTTCAATTAA AGTAAAGTGA TTGTCTGTGG CCAATCATA TTGGCCTGT
51     CGAGCTTAGA TATTTGTAAC AACTTAAGGC CCAAGTTGTT AAACGGCTAT
101    AAATTGAACA TACACTTTAC TTTTGCTTTA ATTCAAAAATG CCTAAGCGTG
151    ATGCCCCATG GCGTTTAACG GCGGGAACTT CAAAGGTTTC CCGCTCTGTC
201    AATTATTCTC CCCGTGCAGG ATATGGACCC AAATATAACA AGGCCGCTGA
251    GTGGGTGAAC AGGCCATGT ACAGGAAGCC CAGGATCTAC CGTACTTTGA
301    GAGGCCAGA TGTTCTTAGA GGCTGTGAAG GGCCTGTAA GGTTCAGTCT
351    TACGAGTCTC GCCATGATGT TTCCCATGTC GGAAGGTGA TTTGTGTGTC

```

```

401   TGACGTTACA CGTGGTAACG GTATTACTCA CCGTGTGGT AAGCGTTTCT
451   GCGTGAAGTC TGTATATATT TTAGGGAAGG TATGGATGGA CGAGAGCATC
501   AAGTTGAAGA ATCACACAAA TAGTGTGATG TTCTGGTTGG TTAGAGATCG
551   GAGACCTTAT TCGACACCTA TGGATTTTGG CCAGGTGTTC AACATGTTTG
601   ACAACGAGCC TAGCACTGCA ACTGTTAAGA ACGATCTTCG GGATCGTTTT
651   CAGGTCATGC ACAAGTTTTA TGCCAAGGTT ACTGGTGGAC AGTATGCCAG
701   TAATGAGCAG GCATTAGTGA AGCGCTTTTG GAAGGTCAAC AACACGTTAG
751   TCTACAACCA TCAGGAGGCA GGGAAATACG AGAATCATA TGAGAACGCC
801   TTGCTATTGT ATATGGCATG TACTCATGCC TCTAACCCCG TGTATGCTAC
851   ATTGAAAATT CGGATCTATT TTTATGATTC GATTACTAAI TAAATAAAATT
901   TAAATTTTAT TGAATGATTT TCGAGTACAG CATTTACATA TGATTTGTCT
951   GTTGCGAAAC GAACAGCTCT GATTACATTA TTAATGGAAA TAACGCCTAA
1001  TCGACTAGTA TACAATAAGA CTAAATATTT AAATCTACTT AAATATGTCG
1051  TCCCAGAAGC TGTCAGTGAA GTCGTCCATA TCTGGAAGTT GAGGAAGCTC
1101  TTGTGGAGAT GCAATGCTCT CCTCAGGTTG TGTTGAACC GTATTTGGAC
1151  GTGGTAGACT CTGCTCGCGG TGTACATTGG ATCCTCCACT CTGTTTATCT
1201  TGAATAGAG GGGATTTGAT ATCTCCCAA TATAAACGCC ATTCTCTGCC
1251  TGAAGTGCAG TGATGAGTTC CCCTGTGCGT GAATCCATGT CCTCTGCAGT
1301  CGATGTGTAC GTAAATAGAG CACCCGCACT CTATATCAAT TCGTCGTCTC
1351  CTGATTCCTC GTTTTTTAGC AGCTCTGTGT TGTACCTTGA TAGAGGGGGG
1401  TGTTAAGGAA GACGAATTTT GCATTGTGCT TTGTCCAATT ATTTAGACTT
1451  GCATTTTCTT CTTTGTGCGAG GAAACATTTA TAGCTGGCCC CCTCGCCAGG
1501  ATTGCAAAGC ACGATGCATG GGATAACCACC TTTAATTTGA ACTGGCTTTC
1551  CGTATTTGCA GTTTGATTGC CAATCCTTTT GGGCCCCAAG CAATCTTTC
1601  CAGTGCTTTA ACTTTAGATA GTGCGGTGCG ATGTCATCGA TGACGTTATA
1651  TTCAACATGA TTTGAATAAA CCCTAGGATT GAAATCCAGG TGCCACTCA
1701  AATAATTATG GGCCCCTAAT GCACGTGCCC ACATCGTCTT TCCCCTCGA
1751  GAATCACCTT CAATGATGAT ACTAATAGGT CGTTCCGGCC GCGCAGCGGC
1801  TCCTCTCCCA AAATAGTCAT CTGCCCAAGC TTGCATCTCT CTCGGTACGC
1851  TAGTGAAAGA GGAGAGGGGA AACGTAGGGG CCCATGGCTC CGGAGCCCTT
1901  GTAAATATCC TATCTAAATT ACTATTTAGA TTGTGAAACT GAAATAAGAA
1951  CTTTTCAGGC AGCTTCTCAC GATTATCTG CAAGGCGACG TCTTTGGAAG
2001  GTGCGTCAA GGCTTCTGCG GCAGCGTCGT TAGCTGTCTG GCAACCGCCT
2051  CTAGCACTTC TTCCGTCGAT TTGGAATTCC CCCCCTCGA TAGTATCTCC
2101  GTCCTTGTCG ACATAGGATT TGACGTCGGA CGATGACTTA GCTCTCTGAA
2151  TGTTGCGATG GAAATGTGTT GACCTTGTTG GGGAGACCAG GTCGAAGAAT
2201  CGTTGATTTT GGCAGCAGTA GTTGCCCTCA AATTGAAGAA GCACGTGGAG
2251  ATGAGGCTCC CCATTTTCAT GGAGCTCTCT GCAAACCTTG ATGAACTTCT
2301  TATTTGTAGG AGTGTTTAGG GTTTTTAATT GGGAAAGTGC TTCTTCTTC
2351  GATAATGAGC ATTTGGGATA TGTGAGGAAA TAATCTTCG CTTTATTTG
2401  AAAGCGCTTT GGAGCTGATG GCATATTTGT AAATATGACT CTTGCTACCA
2451  ATTGGTAGCA GCTCTAAAC TCTTATGAAT TGGTAGTTAT GGTAGCTCTT
2501  ATATAGTAGA AGTTCTTTAA GGAGATTTCT ACACGTGGCG GCCATCCGTT
2551  ATAATATTAC CGGATGGCCG CGCGATTTTT CACCCCTTTA G

```

Figura 30. Sequência completo de ToSRV-A [PJU], indicando os genes e a tradução em proteína. A disposição do formato é semelhante ao encontrado no NCBI. Em vermelho e grifado representa o nanonucleotídeo conservado e em azul grifado o tata Box.

ToSRV [PJU] 80 TTGGCCCTGTCGAGCTTAGATATTTGTAAACAACCTTAAGGC
 ToSRV-DQ207749 80 -----g-----
 ToSRV-AY029750 80 -----g-----
 ToRMV-AF291705 76 a--catt--a-----a-----ag--t-----c--
 ** ** ***** ***** ** ***** **

ToSRV [PJU] 160 TTTTGGCTTTAAATTCAAAAATGCTTAAGCGGTGATGCCCCCAATG
 ToSRV-DQ207749 160 -----
 ToSRV-AY029750 160 -----
 ToRMV-AF291705 156 g--aa-----c-----
 ** ***** ***** ** ***** **

TATA Box

ToSRV [PJU] 240 AATTATTCTCCCGTCGAGGATATGGACCCCAATATAACA
 ToSRV-DQ207749 240 -----t-----
 ToSRV-AY029750 239 -----t-----g--a-----
 ToRMV-AF291705 236 --a-----a-----gt---g--acgg--cc---
 *** ***** ***** ** * ** *

ToSRV [PJU] 320 CAGGATCTACCGTACTTTGAGAGGCCAGATGTTCCCTAGA
 ToSRV-DQ207749 320 -----
 ToSRV-AY029750 320 -----
 ToRMV-AF291705 316 --a--a--t--g--tg--at---ac---c-----a--g
 ** *** ** * * ** * ** ***** **

ToSRV [PJU] 400 GCCAIGAI GTTCCCAIGTCGGGAAGGTGATTTGTGTGTC
 ToSRV-DQ207749 400 -----
 ToSRV-AY029750 400 -----
 ToRMV-AF291705 396 -t--c--a-c-----act--t-----g--c--c--
 * ** *** * ***** ** ***** ** ** **

ToSRV [PJU] 480 AAGCGTTCTCGCTGAAGTCTGTATATATTTAGGGAAGG
 ToSRV-DQ207749 480 -----
 ToSRV-AY029750 480 -----c-----
 ToRMV-AF291705 476 -----t--t-----g-----c-g--t--a

ToSRV [PJU]	TATGGATGGACGAGACATCAAGTTGAAGAATCACACAAA	TAGTGTGATGTTCTGGTTGGTTAGAGATCGGAGACCTTAT	560
ToSRV-DQ207749	-----	-----	560
ToSRV-AY029750	-----	-----	559
ToRMV-AF291705	-----t---a-----c-----g-----	c---cc-----c-g-c-t---g---	556
	***** *	**** *	
ToSRV [PJU]	TCGACACCTAIGGAATTTGGCCAGGTGTTCAACAIGTTTG	ACAACGAGCCTAGCACIGCAACTGTTAAGAACGATCTTCG	640
ToSRV-DQ207749	-----	-----	640
ToSRV-AY029750	gg-----	-----	640
ToRMV-AF291705	ggt--c-----c-----t-----t-----c-	-----c-c-----g-a-----c--	636
	** *	** *	
ToSRV [PJU]	GGATCGTTTTCAGGTCATGCACAAAGTTTATGCCAAGGTT	ACTGGTGGACAGTATGCCACTAATGAGCAGGCATTAGTGA	720
ToSRV-DQ207749	-----	-----	720
ToSRV-AY029750	-----a-----t-----	---c-----g---	720
ToRMV-AF291705	t-----a-----t-----c-----t-----c	--a-----a-c-a-c-c-----gc-t--c-	716
	***** *	** *	
ToSRV [PJU]	AGGCCTTTTGGAAAGTCAACAACAACGTTAGTCTACAACCA	TCAGGAGCAGGGAAATACGAGAATCATACTGAGAACGCC	800
ToSRV-DQ207749	-----	-----	800
ToSRV-AY029750	-----g-----	-----	800
ToRMV-AF291705	---g--c-----tc-t-c-----	---a-a-t-a-----g-----	796
	**** *	** *	
ToSRV [PJU]	TTGCTATTGTAATGGCATGTACTCATGCCCTAACCCTCG	TGTATGCTACATTGAAAATCCGGATCTATTTTATGATTC	880
ToSRV-DQ207749	-----	-----	880
ToSRV-AY029750	-----	-----	879
ToRMV-AF291705	c-at-----a-----	---c-a-t-a-----	876
	* *	**** *	
ToSRV [PJU]	GATTACTAA TTA TAAAAATTAAATTTTATTTGAATGATTT	TCGAGTACAGCATTTACATATGATTTGCTGTTCGGAAC	960
ToSRV-DQ207749	-----	-----	960
ToSRV-AY029750	-----a-----	-----a-----	960
ToRMV-AF291705	---a-a-----t--g-c-----c	-----tg-c-----g-	956

ToSRV [PJU] GATTACTAAATAATAAATTTAAATTTTAAATTTTATTGAATGATTT 960
 ToSRV-DQ207749 -----a----- 960
 ToSRV-AY029750 -----a----- 960
 ToRMV-AF291705 -----tg-c-----g- 956
 ***** * ***** * ***** * ***** *
 ToSRV [PJU] TCGATCTAGATACAATAAGACTAAATATTTAAATCTACTTT 1040
 ToSRV-DQ207749 -----g-----g----- 1040
 ToSRV-AY029750 -----t-----t----- 1040
 ToRMV-AF291705 ct-----tg-----c-ta-g-----t-----t----- 1036
 ***** * ***** * * ***** * ***** * ***** * ***** *
 ToSRV [PJU] AAATAIGTCGCCAGAACCTGTCAGTGAAGTCGTCCTCAATA 1120
 ToSRV-DQ207749 ----- 1120
 ToSRV-AY029750 ----- 1120
 ToRMV-AF291705 -----a-----c-----g--t-----g- 1116
 ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** *
 ToSRV [PJU] CCTCAGGTGIGGTGAACCGTATTTGGACGIGGTAGACT 1200
 ToSRV-DQ207749 ----- 1200
 ToSRV-AY029750 ----- 1200
 ToRMV-AF291705 -----g--ctc-----t-g-atg-----g-gt---ac--- 1196
 *** ** ***** * * ***** ** *** * ***** *
 ToSRV [PJU] TGAATAGAGGGGATTTGATATCTCCCAAAATAAAGCC 1280
 ToSRV-DQ207749 ----- 1280
 ToSRV-AY029750 -----g----- 1280
 ToRMV-AF291705 -----a-----t-----g---c----- 1276
 ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** *
 ToSRV [PJU] GAAITCCAIGTCCCTCGCAGTCGATGTACGTAATAAGAG 1360
 ToSRV-DQ207749 ----- 1360
 ToSRV-AY029750 -----c----- 1360
 ToRMV-AF291705 -----gc---a---t-----a-----g--- 1356
 ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** *
 ToSRV [PJU] TCGAGTACAGCATTTACATAATGATTTGTCTGTTCGGAAC 960
 ToSRV-DQ207749 -----a----- 960
 ToSRV-AY029750 -----a----- 960
 ToRMV-AF291705 -----tg-c-----g- 956
 ***** * ***** * ***** * ***** *
 ToSRV [PJU] TCGATCTAGATACAATAAGACTAAATATTTAAATCTACTTT 1040
 ToSRV-DQ207749 -----g-----g----- 1040
 ToSRV-AY029750 -----t-----t----- 1040
 ToRMV-AF291705 ct-----tg-----c-ta-g-----t-----t----- 1036
 ***** * ***** * * ***** * ***** * ***** * ***** *
 ToSRV [PJU] TCTGGAAGTTGAGGAAGCTCTTGTGGAGATGCAATGCTCT 1120
 ToSRV-DQ207749 ----- 1120
 ToSRV-AY029750 -----t----- 1120
 ToRMV-AF291705 -----at-agc-----cc--g-a--- 1116
 * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** *
 ToSRV [PJU] CTGCTCGGGGTGACATTTGGATCCTCCACTCTGTTTAICT 1200
 ToSRV-DQ207749 ----- 1200
 ToSRV-AY029750 -----t----- 1200
 ToRMV-AF291705 -----g--ctc-----t-g-atg-----g-gt---ac--- 1196
 *** ** ***** * * ***** ** *** * ***** *
 ToSRV [PJU] ATTCTCTGCCITGAAGTGCAGTGATGAGTTCCCCCTGTGCCT 1280
 ToSRV-DQ207749 -----c----- 1280
 ToSRV-AY029750 -----c-----c----- 1280
 ToRMV-AF291705 -----t-----t----- 1276
 ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** *
 ToSRV [PJU] CACCCGCACCTCTATAATCAATTCGTCGTCTCCTGATTCCCTC 1360
 ToSRV-DQ207749 ----- 1360
 ToSRV-AY029750 -----t----- 1360
 ToRMV-AF291705 -----g-----g-a-----t---t-gt---ag--- 1356
 ** ***** ** ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** *

ToSRV [PJJ] 1519 ATTTAGACTTGCATTTTCCTTCTTTGTTCGAGGAAACA.TTT ATAGCTGGCCCCCTCGCAGGATTGCAAAGCACGATGCAI
 ToSRV-DQ207749 1519 -----
 ToSRV-AY029750 1519 -----c-tg.-----c-----t-----
 ToRMV-AF291705 1515 -c---atgc--ag--c-----* * * * *
 * * * * * ** ** * * * * *
 * * * * *
 ToSRV [PJJ] 1599 GGGATACCACCCTTTAATTGAACTGGCTTTCGGTATTGCG AGTTTGATTGCCAAATCCCTTTTGGGCCCCCAAGCAATTCTTT
 ToSRV-DQ207749 1599 -----
 ToSRV-AY029750 1599 -----a-----
 ToRMV-AF291705 1595 -----c-----t-----
 * * * * *
 * * * * *
 * * * * *
 ToSRV [PJJ] 1679 CCAGTGTCTTAACTTTAGATAGTGGGTGCGAIGTCAICG ATGACGTTATAATTCACAACATGATTTGAATAAAACCCTAGGAI
 ToSRV-DQ207749 1679 -----a-----
 ToSRV-AY029750 1679 -----a-----
 ToRMV-AF291705 1675 -----
 * * * * *
 * * * * *
 * * * * *
 ToSRV [PJJ] 1759 TGAAATCCAGGTGCCACTCAAAATAATTAATGGGCCCCCTAA TGACCGTGCCACATCGTCTTTCCCGGTTTCGAGAAATCACCT
 ToSRV-DQ207749 1759 -----t-----
 ToSRV-AY029750 1759 -a-----t-----
 ToRMV-AF291705 1755 -----g-----
 * * * * *
 * * * * *
 * * * * *
 ToSRV [PJJ] 1839 TCAATGATGATACTAATAGGTCGTTCCGGCCCGCAGCGG CTCTCTCCCAAAATAGTCACTGCCCAAGCTTGCAATCTC
 ToSRV-DQ207749 1839 -----a-----g-----
 ToSRV-AY029750 1836 -----a-----t-----
 ToRMV-AF291705 1835 -----a-----t-----
 * * * * *
 * * * * *
 * * * * *
 ToSRV [PJJ] 1919 TCTCGGTACGCTAGTGAAAAGAGGAGGGGAAACGTAGGG GCCCATGGCTCCGGAGCCCTTGTAATAATCCATCTATAAT
 ToSRV-DQ207749 1919 -----
 ToSRV-AY029750 1916 -----t-----c-----
 ToRMV-AF291705 1915 -----t-----c-----
 * * * * *
 * * * * *
 * * * * *

ToSRV [PJU]	TACTATTTAGATTGTGAAACTGAAATAAGAACTTTTCAGG	CAGCTTCTCACGGATTATCTGCAAGGCGACGCTTTTGAA	1999
ToSRV-DQ207749	-----	-----	1999
ToSRV-AY029750	-----a-----c--	t-----c-----	1996
ToRMV-AF291705	*****	*-----t-----	1995
	*****	*****	
ToSRV [PJU]	GGTGGCTTCAAGGCTTCTGGGGCAGCGTTCGTTAGCTGTCT	GGCAACCGCCTCTAGCACCTTCTCCGTCGATTTTGGAATTC	2079
ToSRV-DQ207749	-----	-----	2079
ToSRV-AY029750	-----a-----	-----g-----	2076
ToRMV-AF291705	*****	*****	2075
	*****	*****	
ToSRV [PJU]	CCCCCACTCGATAGTATCTCCGTCCTTCGTCGACATAGGAT	TTGACGTCGGACGATGACTTAGCTCTCTGAAATGTTCCGGAT	2159
ToSRV-DQ207749	-----a-----	-----	2159
ToSRV-AY029750	g-----t-----c	-----t-----	2156
ToRMV-AF291705	*****	*****	2155
	*****	*****	
ToSRV [PJU]	GGAAATGTTGACCTTGTGGGGAGACAGGTCGAAGAA	TCGTTGATTTGGCAGCAGTAGTTGCCCTCAAATTTGAAGA	2239
ToSRV-DQ207749	-----	-----	2239
ToSRV-AY029750	-----	-----g-----t--g-	2236
ToRMV-AF291705	*****	*****	2235
	*****	*****	
ToSRV [PJU]	AGCACGTGGAGATGAGGCTCCCAATTT CATGGAGCTCTC	TGCAAAACCTTGATGAACCTCTTATTTGTAGGAGTGTTAG	2319
ToSRV-DQ207749	-----	-----a-----	2319
ToSRV-AY029750	-----	-----a-----a--	2316
ToRMV-AF291705	*****	*****	2315
	*****	*****	
ToSRV [PJU]	GGTTTTAATTGGAAAGTGCTTCTCTTCGATAATGAG	CATTTGGGATATGTAGGAAATAATTTCTTCGCTTTTATT	2399
ToSRV-DQ207749	-----	-----	2399
ToSRV-AY029750	tt-----c-----	-----t-----g-----	2396
ToRMV-AF291705	*****	*****	2395
	*****	*****	

ToSRV [PJU]	2479	TC	TTGCTACCAA	TTGGTAGCAGCTCTAAAAC	CTTTATGAA	
ToSRV-DQ207749	2479	C	-a-	-a-	-t-	-a-
ToSRV-AY029750	2476	C	-a-	-a-	-t-	-a-
ToRMVAF291705	2475	C	-a-	-a-	-t-	-a-
		***	*****	*****	*****	*** **
ToSRV [PJU]	2556	TA	AGGAGATT	TCTACACG	TGG	.CGGCCATCCGT
ToSRV-DQ207749	2558	-	-g-	-g-	-.	-
ToSRV-AY029750	2554	-	-g-	-g-	-.	-
ToRMV-AF291705	2554	-	-g-	-g-	-c-	-a-
		*****	*****	*****	*****	*****
		Rep binding site	TATA BOX	Stem	Loop	
ToSRV [PJU]		TT	ACCGGATGGCCGCGG	ATTTTCA	...CCCCTTTAG	
ToSRV-DQ207749		2591
ToSRV-AY029750		2593
ToRMVAF291705		catcgggcctctgttgggggcctctcacc				2588
		*****	*****	*****	*****	2622
		Loop	Stem			

Figura 31. Alinhamento das seqüências completas de ToSRV-A [PJU], com outras 2 seqüências de ToSRV e uma de ToRMV isolados brasileiros encontradas no GenBank. Em negrito mostra o TATA Box e o nanonucleotídeo.

DNA-B

Definição: *Tomato severe rugose virus* segmento B, seqüências parcial do genoma, isolado ToSRV [PJU]

Palavras chaves: gene BC1; gene BV1; genoma parcial; proteína de movimento completo e proteína nuclear parcial.

Tipo *Tomato severe rugose virus*

Organismo *Tomato severe rugose virus*

Virus: ssDNA ; Geminiviridae; Begomovirus.

Referência 1..2566

/organismo="*Tomato severe rugose virus*"

/tipo de molécula="DNA genômico"

/isolado="ToSRV[PJU]"

/segmento="B"

/país="Brasil"

39...303

/origem de replicação = "região comum"

gene 577..1347

/gene="BV1"

CDS 577..1347

/gene="BV1"

/codon de início=1

/produto=" proteína nuclear shuttle"

/tradução=

```

1      ATGTATCCCATTAAGTATAGACGTGGAATGTTGTTAATCATCGACGAGCTTACTCATCT
1      M Y P I K Y R R G M L F N H R R A Y S S
61     AATCCCGTATTTAAGCGTTTACACGGAGCGAAACGAAGTGATTTCAAGCGTCGTTGAGT
21     N P V F K R L H G A K R S D F K R R S S
121    AATCAGATTAAGAGCATGGATGAGACTAAAATGTCTGTTCAGCGGATTCATGAGAACCAG
41     N Q I K S M D E T K M S V Q R I H E N Q
181    TTTGGCCCTGAATTTGTAATTGGCCACAATTCTGCCATATCCACATTCATTACATTCCTT
61     F G P E F V I G H N S A I S T F I T F P
241    ACTCTTTGTAAGACTGTCCCGAACCGTTGTAGGTCATACATAAAGTTAAGACGACTACGT
81     T L C K T V P N R C R S Y I K L R R L R

```

301 TTTAAAGGTACAATCAAGATTGACCGTGTTTCATGCTGAGGTGAATATGGACGGTACAAGT
 101 F K G T I K I D R V H A E V N M D G T S
 361 CCAATGATTGAAGGAGTCTTCTCTCTGGTTGTAGTCGTTGATCGCAAACCTCATTGGGC
 121 P M I E G V F S L V V V V D R K P H L G
 421 TCATCTGGAACCTCTGCATTCTTTTGGATGAGATATTTGGTGCAAGGATTCATAGCCATGGT
 141 S S G T L H S F D E I F G A R I H S H G
 481 AACCTGGCAATAGTATCCTCTCTGAAAGAGCGTTTTTACATACGTCACGTTTGAAGAAA
 161 N L A I V S S L K E R F Y I R H V W K K
 541 GTAATATCCGTTGAGAAGGATAACAACCATGGTTGATGTTGAAGGAAGTACTATTTTATCT
 181 V I S V E K D T T M V D V E G S T I L S
 601 AACAGGCGTTTTAATTGTTGGTCATCCTTTAAGGATATTGACCGTGAATCATGTAATGGT
 201 N R R F N C W S S F K D I D R E S C N G
 661 GTTTATGCAAACATAAGCAAGAACGCCCTGTTAGTTTATTATTGTTGGATGTCTGATAAT
 221 V Y A N I S K N A L L V Y Y C W M S D N
 721 GTGTCTAAAGCATCGACATTTGTATCATTTGACCTTGATTATGTTGGCTAA
 241 V S K A S T F V S F D L D Y V G *

gene complemento (1472...2353)

/gene="BC1"

CDS complemento (1472...2353)

/gene="BC1"

/codon de início=1

/produto="proteína de movimento"

/tradução ="

1 ATGGAATCTCAGCTTGTGAATCCTCCCAACGCATTTAATTATATAGAATCTAAGCGTGAT
 1 M E S Q L V N P P N A F N Y I E S K R D
 61 GAATATCAGCTTTCCCATGATCTAACCGAGATTATGCTTCAATTCCCTTCAACGGCGTCT
 21 E Y Q L S H D L T E I M L Q F P S T A S
 121 CAATTAAGCGCAAGGCTTAGTCGTAGCTGTATGAAAATCGACCATTGCGTAATAGAATAC
 41 Q L S A R L S R S C M K I D H C V I E Y
 181 AGACAACAGGTACCAATTAACGCCGTAGGTTGAGTTATAGTCGAAATTCATGACAGAAGA
 61 R Q Q V P I N A V G S V I V E I H D R R
 241 ATGACTGACAATGAATCACTACAGGCGTCGTGGACCTTTCCTATCAGATGTAACATAGAT
 81 M T D N E S L Q A S W T F P I R C N I D
 301 CTTCACTACTTTTCGTGTCGTTCTTCTCCCTTAAGGACCCAATTCCATGGAAATTGTAC
 101 L H Y F S S S F F S L K D P I P W K L Y
 361 TACAGAGTATGTGACACGAACGTTACCCAGAGTACCCACTTCGCTAAATTCAAAGGGAGA
 121 Y R V C D T N V H Q S T H F A K F K G R
 421 CTGAAACTCTCGACGGCTAAACATTCGGTTGATATACCTTTCGGTGCCCCAACGGTGAAG
 141 L K L S T A K H S V D I P F R A P T V K
 481 ATCCTTTCAAACAGTTTACAGATAAGGACATTGATTTTCAGTCACGTAGGCTATGGCAAA
 161 I L S K Q F T D K D I D F S H V G Y G K
 541 TGGGAAAGGAAGATGATCAGATCCGCTCAATATCCAGATTGGGCCTGCACAAACCACTT
 181 W E R K M I R S A S I S R L G L H K P L
 601 GAAATAATGCCCGGAGAGTCATGGGCTGTTAGAAGTACTGTAGGCTTAAGCCCATCAGAG
 201 E I M P G E S W A V R S T V G L S P S E
 661 GCGGGCTCAGATATAGAGAACCGGATGCATCCATACAGACAATTACATAGACTGGGTACA
 221 A G S D I E N A M H P Y R Q L H R L G T
 721 GGCACATTAGACCCAGGTGATTCTGCATCCGTAATTGGTGCTCAAAGGGCCCAATCGAAC
 241 G T L D P G D S A S V I G A Q R A Q S N

781 ATAACACTGTCAATGGCCCAATTAAACGAACTTGTTAAAGCAGCGGCCCATGAATGTATA
 261 I T L S M A Q L N E L V K A A A H E C I
 841 AACAGCAACTGTACTCCTTCACAGCCAAAATCTTTAAAATAA
 281 N S N C T P S Q P K S L K * "

1 TTTGCTCTTT AAATAGAATT TTTAAGGC**AA** TGGCATATTT GTAAATATGA
 51 **C**ATTACTACC AATTGGTAGC TGCTCTAAAA CTCATATGAA TTGGTAGTTA
 101 TGGTAGCTCT TATATAGTAG AAGTTCCTTT AAGGAGATTG CTACACGTGG
 151 **CGGCCATCCG** TTATAATATT **ACCGGATGGC** **CGCGCG**GATT T**CTT**ATCTGC
 201 TACGTGGCGA AATCGTGTAC GTTGCCTCGC GCTTTCATT TTAATTGAGC
 251 **GCATTTTGAA** **GTCCGCGAAA** TGAGTTAATT **GTCTTTTTGA** AATCCGCTTT
 301 **TGTGAATCAC** CTTTAATTTG AATTAAGGT TGGATAGTTC GTATTGATCA
 351 ATCATTTCGC TGGTTTATTT CCTATCGTGG TGTAATTACA ACCGTTTCGTT
 401 AAAAATATAA GAAATTTACG ACGTGGACTG TCTAAATTTT ATCTACATAG
 451 TTAATTTGAC AAATGAATGC ATATTTAAAC TCCGCTTTTC TGTTGGTTTA
 501 CACCACGTCT ATACATATTG TCCAGGTTAT TTTGTCTAAG TATAATTTAT
 551 ATTTTGTCTT ATCTTATTAT CTGAAC**ATGT** **ATCCCATTA** **GTATAGACGT**
 601 **GGAATGTTGT** **TTAATCATCG** **ACGAGCTTAC** **TCATCTAATC** **CCGTATTTAA**
 651 **GCGTTTACAC** **GGAGCGAAAC** **GAAGTGATTT** **CAAGCGTCGT** **TCGAGTAATC**
 701 **AGATTAAGAG** **CATGGATGAG** **ACTAAAATGT** **CTGTTCAGCG** **GATTCATGAG**
 751 **AACCAGTTTG** **GCCCTGAATT** **TGTAATTGGC** **CACAATTCTG** **CCATATCCAC**
 801 **ATTCATTACA** **TTCCCTACTC** **TTTGTAAAGAC** **TGTCCCGAAC** **CGTTGTAGGT**
 851 **CATACATAAA** **GTTAAGACGA** **CTACGTTTTA** **AAGGTACAAT** **CAAGATTGAC**
 901 **CGTGTTTCATG** **CTGAGGTGAA** **TATGGACGGT** **ACAAGTCCA** **TGATTGAAGG**
 951 **AGTCTTCTCT** **CTGGTTGTAG** **TCGTTGATCG** **CAAACCTCAT** **TTGGGCTCAT**
 1001 **CTGGA**ACTCT **GCATTCTTTT** **GATGAGATAT** **TTGGTGCAAG** **GATTCATAGC**
 1051 **CATGGTA**ACC **TGGCAATAGT** **ATCCTCTCTG** **AAAGAGCGTT** **TTTACATACG**
 1101 **TCACGTTTGG** **AAGAAAGTAA** **TATCCGTTGA** **GAAGGATACA** **ACCATGGTTG**
 1151 **ATGTTGA**AGG **AAGTACTATT** **TTATCTAACA** **GGCGTTTTAA** **TTGTTGGTCA**
 1201 **TCCTTTA**AGG **ATATTGACCG** **TGAATCATGT** **AATGGTGT**TT **ATGCAAACAT**
 1251 **AAGCA**AGAAC **GCCCTGTTAG** **TTTATTATTG** **TTGGATGTCT** **GATAATGTGT**
 1301 **CTAA**AGCATC **GACATTTGTA** **TCATTTGACC** **TTGATTATGT** **TGGCTAA**ATA
 1351 GTAAGTGTAA TACGTGATTA GTAATAATGT TTA**ACTCTCT** TTAATAATAA
 1401 ATACAAGTAC TTGTT**CAGTA** GTAATGTTCA ACTCGCAGTA ATAAAAAAAAA
 1451 ATGTGTTTTAA TAATATAGAA TTTATTTTAA AGATTTTGGC TGTGAAGGAG
 1501 TACAGTTGCT GTTTATACAT TCATGGGCCG CTGCTTTAAC AAGTTCGTTT
 1551 AATTGGGCCA TTGACAGTGT TATGTT**CGAT** TGGGCCCTTT GAGCACCAAT
 1601 TACGGATGCA GAATCACCTG GGTCTAATGT GCCTGTACCC AGTCTATGTA
 1651 ATTGTCTGTA TGGATGCATC GCGTTCTCTA TATCTGAGCC CGCCTCTGAT
 1701 GGGCTTAAGC CTACAGTACT TCTAACAGCC CATGACTCTC CGGGCATTAT
 1751 TTCAAGTGGT TTGTGCAGGC CCAATCTGGA TATTGAGGCG GATCTGATCA
 1801 TCTTCCTTTC CCATTTGCCA TAGCCTACGT GACTGAAATC AATGTCCTTA
 1851 TCTGTAAACT GTTTTGAAAG GATCTTACC GTTGGGGCAC GGAAAGGTAT
 1901 ATCAACCGAA TGTTTAGCCG TCGAGAGTTT CAGTCTCCCT TTGAATTTAG
 1951 CGAAGTGGT ACTCTGGTGA ACGTTCGTGT CACATACTCT GTAGTACAAT
 2001 TTCCATGGAA TTGGTCTCTT AAGGGAGAAG AACGACGACG AAAAGTAGTG
 2051 AAGATCTATG TTACATCTGA TAGGAAAGGT CCACGACGCC TGTAGTGATT
 2101 CATTGTCAGT CATTCTTCTG TCATGAATTT CGACTATAAC TGAACCTACG
 2151 GCGTTAATTG GTACCTGTTG TCTGTATTCT ATTACGCAAT GGTCGATTTT
 2201 CATACAGCTA CGACTAAGCC TTGCGCTTAA TTGAGACGCC GTTGAAGGGA
 2251 ATTGAAGCAT AATCTCGGTT AGATCATGGG AAAGCTGATA TTCATCACGC
 2301 TTAGATTCTA TATAATTA**AA** TGCGTTGGGA GGATTCACAA GCTGAGATTC
 2351 CATTATTGAA AAATAGGGAG CGCAGCGACA ATGTTTGAGG AAAGTTAATA


```
2401  AGGGAAGATG ATAATATTTT CGTCAACTGA ATATATGACA AGACAATTGT
2451  CCGTTGATCC AATTGGGAAA TTGGAGATGA TAATAACTAA AAAACGAGGA
2501  ATCAGGAGAC GACGAATTGA GAGGAGATGT TGTCTATTTT AGGTGTAATT
2551  GATAAATACC TCTCTA
```

Figura 32. Seqüência completa de ToSRV-B [PJU], indicando os genes e a tradução em proteína. A disposição do formato é semelhante ao encontrado no NCBI. Em vermelho e grifado representa o nanonucleotídeo conservado e em azul grifado o tata Box.

ToSRVB [PJU] TTTGCTCTTTAAATAGAAATTTTAAAGCAATGGCATATTT 79
ToRMV AF291706 -----CC----- 80
ToSRV AY029751 -----C----- 517

GTAATAATGACA.TTACTACCAATTGGTAGCTGCTTAAA
-----C-----

ToSRVB [PJU] ACTCATATGAATTTGGTAGTTATGGTAGCTCT**TATATAGTA** 157
ToRMV AF291706 -----a----- 159
ToSRV AY029751 -----C----- 596

GAAGTTCCCTT.TAAGGAGATTGCTACACGIGGC.GGCCAT
-----C-----

ToSRVB [PJU] CCGT**TATAATATATAC**CGGATGGCCGCGCGA.TTTTCTTAT 235
ToRMV AF291706 -----c-t----- 238
ToSRV AY029751 -----t----- 675

CTGCTACGTGGCGAAATCGTGACGTTGCCCTCGGCG.TTT
-----a-----

ToSRVB [PJU] CCATTTAAATTGAGCGCA.TTTTGAAGTCCGCGAAATGAG 313
ToRMV AF291706 -----tt----- 318
ToSRV AY029751 at-----tt----- 755

TTAATTGCTTTTTGAAAATCCGCT.TTTGIGAAATCACCTT
-----a-----g-a-----

ToSRVB [PJU] TAATTTGAATTAAGGTTGGATAGTTCGTATTGATCAATC 393
ToRMV AF291706 -----g-a----- 398
ToSRV AY029751 -----g----- 835

ATTCGCTGGTTTTATTCCCTATCGTGGTGAATTACAACC
-----g-----

ToSRVB [PJU] GTTCGTTAAAAATAAGAAATTTACGACGTGGACIGTCT 473
ToRMV AF291706 -----g----- 478
ToSRV AY029751 -----c-t----- 914

Rep-binding site TATA BOX

Loop Stem

G box Stem

ToSRVB [PJU] TTTAAACTCGGCTTTCGTGTGGGTTTACACCACGTC**TATA** 553
 ToRMV AF291706 -----t-----
 ToSRV AY029751 -----t-----
 ***** ** *****
TATA BOX
 ToSRVB [PJU] TTGTCTTAICTTATTATCTGAACATGTATCCCA**TTAAGTA** 633
 ToRMV AF291706 -----
 ToSRV AY029751 -a-----
 * *****
 ToSRVB [PJU] **TC**TAA**TCCCGT**AT**TTAAGCGT**TT**TACACGGAGCGAAACGAA** 713
 ToRMV AF291706 -----g-----
 -----t-----

 ToSRVB [PJU] **GG**AT**GAGACT**AAAA**TGTCTGTT**TC**AGCGGATT**CA**TGAGAAC** 793
 ToRMV AF291706 -----

 ToSRVB [PJU] **TA**TCC**CACATT**CA**TACATTCCCTACTCTTTGTAAGAC**IG**T** 873
 ToRMV AF291706 -----

 ToSRVB [PJU] **CG**TTTTAA**AGGTACAATCAAGATTGACCGGTT**CA**TGCTG** 953
 ToRMV AF291706 -----a-----

 ToSRVB [PJU] **CT**T**CTC**IC**IGGTTGTAGTCGTTGATCGAAACCTCA**IT**TG** 1033
 ToRMV AF291706 -----

CATATTGTCACAGGTTAATTTTGTCTAAGTATAATTTATATT 553

 -----t----- 558
 ***** * 990
 TAGACGTGGAA**TGTTGTTTAA**TC**ATCGACGAGCTTACTCA** 633
 -----g-----
 -----c-----a-----g----- 638
 ***** * 1070
 GTG**ATTCAAGCGTCGTT**CG**AGTAA**TC**AGATTAAAGAGCAT** 713

 ***** 1136
 CAG**TTTGGCCCTGAA**TT**TGTAAT**GGCC**ACAAT**CT**GC**CA 793

 ***** 798
 CCC**GAA**CC**GTTG**T**AGGTCATACATAAA**GT**TAAGACGACTA** 873

 ***** 878
 A**GGTGAATA**T**GGACGGTACA**AT**GCCAA**T**GATTGAAGGAGT** 953

 ***** 958
 G**GCTCAT**CT**GGAAC**TC**IGCAT**CT**TTTGATGAGATA**TT**TG** 1033

 ***** 1038

ToSRVB [PJU] **GTGCAAGGATTCATAGCCATGGTAACCTGGCAATAGTATC** 1113
 ToRMV AF291706 **CTCTCTGAAAGAGCGTTTTTACATACGTCACGTTTGAAG** 1118

 a *****

 ToSRVB [PJU] **AAAGTAAATCCGTTGAGAAGGATACAACCATGGTTGATG** 1193
 ToRMV AF291706 **TTGAAGGAAGTACTATTTTATCTAACAGGCGTTTAAATTG** 1198
 -----t-----

 ToSRVB [PJU] **TTGGTCATCCTTTAAAGGATATTGACCCGTGAATCATGTAAT** 1273
 ToRMV AF291706 **GGTGTTTATGCAAAACA TAAGCAAGAACGCCCTGTAGTTT** 1278
 -g-tcatc-----
 * * *****

 ToSRVB [PJU] **ATTATTGTTGGATGCTGATAAATGTGCTAAAGCATCGAC** 1353
 ToRMV AF291706 **ATTTGATCATTTGACCTTGATTATGTTGGCTAAATAGTA** 1358
 ---C-----g-----
 * * * *****

 ToSRVB [PJU] **AGTGTAATACGIGATFAGTAATAATGTTTAAACICICTTTA** 1433
 ToRMV AF291706 **ATAATAAATAACAAGTACTTGTTCAGTAGTAAIGTTCAACT** 1438
 -----g-----
 * * * *****

 ToSRVB [PJU] **CGCAGTAATA.AAAAAAAATGTTTTAATAATAAAGAAAT** 1511
 ToRMV AF291706 **TTATTTTAAAGATTTTGGCTGTGAAGGAGTACAGTTGCTG** 1518
 ---t---ac-----a-----
 * * * * * *****

 ToSRVB [PJU] **TTTATACATTCATGGGCCGCTGCTTTAAACAAGTTCGTTTA** 1591
 ToRMV AF291706 **ATTGGGCCATTGACACAGTGTATGTTCCGATTGGGCCCTTTG** 1598

 * * * * * *****

ToSRVB [PJU] AGACCAATTACGGATGCAGAAATCACCTGGGTCTAAATGTTG
ToRMV AF291706 C-*****
1671 CCCTGTACCAGCTCTAAGTAAATTTGCTGTATGGAATGCATCG
1678 *****

ToSRVB [PJU] CGTTTCTATATACTGAGCCCGCCTCTGATGGGCTTAAGCC
ToRMV AF291706 *****

ToSRVB [PJU] TCAAGTGGTTGTGCAGGCCAAATCTGGATAATTGAGGGG
ToRMV AF291706 g-----a-*****
1831 TCAAGTGGTTGTGCAGGCCAAATCTGGATAATTGAGGGG
1838 *****

ToSRVB [PJU] ACTGAAATCAATGTCTTAATCTGTAAACIGTTTTGAAGG
ToRMV AF291706 t-----t-*****

ToSRVB [PJU] GTTTAGCCGTCGAGAGTTTCAGTCCTCCCTTGAATTTAGC
ToRMV AF291706 *****

ToSRVB [PJU] TAGTACAAATTCCATGGAATTTGGGTCCTTAAGGGAGA
ToRMV AF291706 *****

ToSRVB [PJU] AGGAAAGGTCCACGACGCCCTGTAGTGATTCAATGTCAGTC
ToRMV AF291706 t-----t-c-
ToSRV AY029751 *****

ToSRVB [PJU] CGTTAATGGTACCTGTTGTCTGTATTCTATTACGCAATG
ToRMV AF291706 -----
ToSRV AY029751 gac---aat--.----acagc-g----atgagaatc-gt
*** ** **** * ****

ToSRVB [PJU] CCCTGTACCAGCTCTAAGTAAATTTGCTGTATGGAATGCATCG
ToRMV AF291706 *****

ToSRVB [PJU] TACAGTACTTCTAACAGCCCATGACTCTCCGGGCATTATT
ToRMV AF291706 *****

ToSRVB [PJU] AICTGATCATCTTCCCTTTCCCAATTTGCCATAGCCTACGTG
ToRMV AF291706 *****

ToSRVB [PJU] ATCTTCACCGTTGGGGCACGGAAAGGTATATCAACCGAAT
ToRMV AF291706 *****

ToSRVB [PJU] GAAGTGGGTACTCTGGTGAACGTTCCGTGTCACATACTCTG
ToRMV AF291706 *****

ToSRVB [PJU] ACGACGACGAAAAGTAGTGAAGATCTATGTTACATCTGAT
ToRMV AF291706 *****

ToSRVB [PJU] ATTCTTCTGTCAATGAATTTCCGACATAACTGAACCTACGG
ToRMV AF291706 c-----c-c-
ToSRV AY029751 c-ga---ga-c-tag-t-a
***** * **** * *

ToSRVB [PJU] GTCGATT....TTCATACAGCTACGACTAAGCCTTGGCG
ToRMV AF291706 -----
ToSRV AY029751 a-gtga-ctatc-----

```

ToSRVB [PJU]          TTAATTGAGACGCCGTTGAAGGGAATTGAAGCAATAATCTC          GGTTAGATCAITGGGAAAAGCTGATATTCATCACGCTTAGAT          2306
ToRMV AF291706      -----
ToSRV AY029751      -----
*****
-----a-----
*****
*****

ToSRVB [PJU]          TCTATAAATTAAATGCGTTGGGAGGATTCACAAGCTGAG          ATCCATTATTGAAAAATAGGGAGCGCAGCAATGTTT          2386
ToRMV AF291706      -----
ToSRV AY029751      -----t-----
*****
*****

ToSRVB [PJU]          GAGGAAAGTTAAATAAGGGAAGATGATAATAATTTTCGTCAA          CTGAATATATGACAAGACAATGTCCGTTGATCCAATGG          2466
ToRMV AF291706      -----
ToSRV AY029751      --c---t-----g---g---g---
** **** *****
*****

ToSRVB [PJU]          GAAATTGGAGATGATAATAACTAAAAACGAGGAATCAGG          AGACGACGAAATGAGAGGAGATGTTGTCTATTTTAGGTGT          2546
ToRMV AF291706      t-----
ToSRV AY029751      *-----g-----a-----a-----g-----t-----
* **** *
*****

ToSRVB [PJU]          AATTGATAAAATACCTCICTA          2566
ToRMV AF291706      -----c-----
ToSRV AY029751      --c-----c-----
** *****
*****

```

Figura 33. Alinhamento da sequência de nucleotídeos do ToSRV-B [PJU], ToRMV (AF291706) e sequência parcial de ToSRV AY029751. Os elementos relevantes para a replicação do DNA viral estão indicados.