

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA

**MOSAICO DO QUIABEIRO: ETIOLOGIA,
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOLÓGICA
E DIVERSIDADE GENÉTICA DO PATÓGENO**

SÍLVIA DE ARAÚJO ARANHA

BRASÍLIA

2008

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA

**MOSAICO DO QUIABEIRO: ETIOLOGIA, CARACTERIZAÇÃO E
DIVERSIDADE**

Sílvia de Araújo Aranha

Orientadora: Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Fitopatologia.

BRASÍLIA
2008

Dissertação de Mestrado realizada junto ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília sob orientação da Pesquisadora Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata. Apoio institucional da Embrapa Hortaliças e financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Banca examinadora:

Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata (Orientadora)

Universidade de Brasília - UnB

Embrapa Hortaliças - CNPH

Dr. Renato de Oliveira Resende

Universidade de Brasília - UnB

Dra. Marília Santos Silva

Embrapa Cerrados - CPAC

Aos meus pais, **Maria Olga e Marcos**, que investiram no meu sonho acreditando que era possível torná-lo realidade.

Às minha avós, **Olga e Rosa**, que me apoiaram durante toda esta jornada.

Ao meu namorado, **Magno**, que me fez descobrir a Fitopatologia e abraçá-la com todo entusiasmo.

Dedico.

Agradecimentos

À Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata, por toda orientação prestada durante o mestrado, pelos ensinamentos, conselhos, incentivos, amizade e, principalmente, pelo esforço demonstrado para que tudo desse certo no decorrer da elaboração desta dissertação.

Aos meus pais, por terem me proporcionado a “vida” em Brasília, pela confiança longe dos olhos e, acima de tudo, pelo amor incondicional. Particularmente à minha mãe, Maria Olga, por me ensinar que é dever do comandante do navio chegar ao porto de destino, custe o que custar! Por todas as lições de vida e por todas as frases mágicas que me fizeram seguir em frente, sempre. Especialmente ao meu pai, Marcos, por estar sempre disposto a me ouvir, por me orientar nas minhas escolhas e por sua paciência.

À minha irmã, Marília, por ser tudo: irmã, mãe e amiga! Pelos conselhos, incentivos, amizade, paciência e por acreditar na realização dos meus sonhos. Ao meu cunhado, Flávio, que sempre me incentivou e acreditou no meu potencial.

Aos meus sobrinhos, Felipe e Cecília, por todos os momentos de alegria e pelo carinho e amor que irradiam, me fazendo sentir a pessoa mais amada do mundo.

Às minhas avós, Olga e Rosa, por tudo que me proporcionaram, por todo carinho e por todos os mimos.

Ao meu namorado, Magno, por todo carinho e compreensão, por entender cada etapa deste caminho, por me acolher e confortar nos momentos de estresse, fazendo-me sentir confiante até o final desta jornada.

À Dra. Cristiane Macedo, por fazer parte do meu crescimento profissional. Sem sua orientação e incentivo não teria chegado até aqui.

Ao Dr. Antônio Carlos Torres, por ter me concedido a oportunidade de trabalho junto a sua equipe na Embrapa Hortaliças no início da minha carreira científica.

Às minhas amigas natalenses, Flavinha, Ceíça, Carol, Bruna e Milena, que mesmo longe dos olhos, estão no meu coração. Às amigas brasilienses, Hylida, Michelle, Izabella e Viviane, que sempre se fizeram presentes.

Aos colegas de curso, Eliane, Gisele, Jaqueline, Leandro, Leonardo Braúna, Leonardo Lopes, Patrícia, Paulo, Rafael e, especialmente, a Ana Paula e Keize, por todos os momentos de alegria e superação vividos durante este curso.

Aos colegas dos laboratórios de Biologia Molecular e Virologia, Anelise, Edmércia, Érico, Lúcio, Mariana Martins, Oneilson, Pedro Paulo e Vinícius e em especial aos amigos, Cristiane, Leonardo, Mariana Hallwass e Sarah, por todos os ensinamentos, conselhos, amizade e momentos de alegria.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Fitopatologia, pelos ensinamentos, e aos funcionários, em especial ao Ribamar e a Silene.

Aos membros da banca examinadora, pela atenção dispensada.

A CAPES, pelo auxílio financeiro concedido.

À Embrapa Hortaliças, por oferecer a infra-estrutura para a execução dos experimentos.

À Universidade de Brasília, por me proporcionar essa grande oportunidade.

A todos que contribuíram para realização deste trabalho, o meu “muito obrigada!”

Sumário

Resumo	1
Abstract	2
Capítulo 1: Introdução	3
1. O Quiabeiro	3
2. Vírus em quiabeiro	4
3. Família <i>Geminiviridae</i>	6
4. Taxonomia da família <i>Geminiviridae</i>	8
5. Gênero <i>Begomovirus</i>	11
5.1. “Cassava mosaic disease”	13
5.2. “Cotton leaf curl disease”	14
5.3. “Tomato yellow leaf curl disease”	15
5.4. “Pepper golden mosaic”	16
6. Begomovírus no Brasil	16
6.1. Begomovírus em tomateiro no Brasil	18
6.2. Begomovírus em plantas invasoras no Brasil	20
7. O genoma dos begomovírus	21
8. Transmissão de begomovírus por mosca-branca	24
9. Replicação dos geminivírus na planta hospedeira	27
10. Movimento dos geminivírus na planta hospedeira	28
11. Mecanismos de diversidade genética de begomovírus	29
12. Escopo da dissertação	30
Capítulo 2: Primeiro relato de um begomovírus infectando quiabeiro no Brasil	33
Capítulo 3: Caracterização molecular e biológica de um begomovírus infectando quiabeiro no Brasil	36
1. Introdução	36
2. Material e Métodos	37

3. Resultados	40
4. Discussão	53
Capítulo 4: Sequência nucleotídica completa de uma nova espécie de Begomovirus infectando quiabeiro	56
Considerações finais	66
Referências	68
Anexos	81

MOSAICO DO QUIABEIRO: ETIOLOGIA, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOLÓGICA E DIVERSIDADE GENÉTICA DO PATÓGENO

Resumo - O mosaico do quiabeiro era encontrado com certa frequência durante a década de 1960 no Brasil, no entanto, sua importância diminuiu com a introdução da cultivar resistente Santa Cruz 47. Acreditava-se que este mosaico fosse causado por um begomovírus, contudo seu agente etiológico nunca foi confirmado. Visitas foram realizadas em lavouras de quiabeiro no cinturão verde do Distrito Federal e Goiás para avaliação de ocorrência de begomovírus na cultura. Amostras foliares de plantas foram coletadas ao acaso ou dirigidas para plantas com sintomas de infecção viral. DNA total foi extraído e utilizado em testes de detecção via PCR com primers universais para begomovírus. Cento e oito amostras sintomáticas ou assintomáticas foram avaliadas, sendo que em três (#5157, 6319 e 6328) detectou-se a presença de begomovírus. DNA circular das três amostras foi amplificado por replicação via círculo rolante e introduzido em plantas de quiabo por bombardeamento de partículas. A infecção foi comprovada para as três amostras. O DNA-A e DNA-B dos três isolados foi clonado (exceto DNA-B da amostra #6328) e as seqüências nucleotídicas determinadas revelaram características típicas dos begomovírus bipartidos do novo mundo. Clones do DNA-A e DNA-B do isolado #5157 foram infectivos em quiabeiro, *Sida santaremnensis* e algumas hospedeiras da família Solanaceae quando realizada inoculação por biobalística. De acordo com os critérios taxonômicos atuais para o gênero *Begomovirus*, os clones do isolado #5157 pertencem à espécie *Sida micrantha mosaic virus* enquanto os clones dos outros dois isolados (# 6319 e # 6328) pertencem a uma nova espécie, cujo nome é tentativamente sugerido como Okra mottle virus. Esse é o primeiro relato de begomovírus infectando quiabeiro no Brasil. Até o presente, não se conhecia a real ocorrência de begomovírus em quiabeiro, porém nessa pequena busca foram encontradas duas espécies, o que sugere haver uma grande diversidade de espécies de begomovírus em quiabeiro no Brasil.

**OKRA MOSAIC DISEASE: ETIOLOGY, MOLECULAR AND BIOLOGICAL
CHARACTERIZATION AND PATHOGEN DIVERSITY**

Abstract – Okra mosaic disease was frequently observed in the 60's in Brazil, but its importance decreased after the use of the resistant cultivar 'Santa Cruz 47'. It was believed that this disease was caused by a begomovirus, but the etiology was never confirmed. Several okra production fields were visited in central Brazil (Federal District and Goiás state) for evaluation of occurrence of begomovirus. Samples from plants showing chlorotic spots, mosaic symptoms or asymptomatic ones were collected and tested by using begomovirus universal primers. Among one hundred and ninety eight collected symptomatic or asymptomatic plants, begomovirus were detected in three samples (samples #5157, 6319 and 6328). Total DNA was subjected to rolling circle amplification (RCA) and introduced into okra seedlings by biobalistics. All three DNA bombarded samples gave rise to infected okra plants, confirmed by PCR, demonstrating that they were infectious to okra plants. DNA-A and DNA-B of three isolates were cloned (except for sample DNA-B of #6328) and their nucleotide sequences exhibited typical properties of new world bipartite begomoviruses. Clones of DNA-A and DNA-B from isolate #5157 were infectious to okra, *Sida santaremnensis* and some Solanaceae plants when inoculated by biolistics. According to the new taxonomic criteria for the *Begomovirus* genus, clones of the isolate #5157 belong to *Sida micrantha mosaic virus* species, while clones of the isolates #6319 and 6328 belong to a new species, tentatively named Okra mottle virus. This is the first report of a begomovirus infecting okra in Brazil. Until recently, the presence of a begomovirus in okra plants was not recognized, but in the present small-scale survey, two species were found, suggesting a considerable diversity of okra infecting begomoviruses species within Brazil.

Capítulo 1

Introdução

1. O Quiabeiro

O quiabeiro, *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench, sobre o qual se aborda uma virose na presente dissertação, é uma hortaliça de alto valor alimentício pertencente à família Malvaceae, sendo a única olerácea desta família com importância econômica (Mitidieri, 1973; Teixeira et al., 1986). A planta é arbustiva com crescimento indeterminado, de 0,5 a 2,5 m de altura, de caule ereto, com flores hermafroditas, semi-lenhosa, anual e cultivada em zonas tropicais e subtropicais. O quiabeiro resiste ao calor e a períodos de seca, porém o frio provoca o abortamento de frutos jovens indicando que temperaturas muito baixas são inviáveis ao seu cultivo (Teixeira et al., 1986; Minami et al., 1997; Moraes Junior et al., 2005).

Primeiramente, o quiabeiro foi classificado por Lineu, em 1737, como *Hibiscus esculentus*. Contudo, em 1924, esta espécie foi colocada no gênero *Abelmoschus* devido às características do cálice. Durante anos, pesquisadores levantaram várias dúvidas quanto a sua classificação, até que em 1974 definiu-se a espécie *Abelmoschus esculentus* (Nagai, 1993; Minami et al., 1997).

Sua origem africana, relatada por vários autores, indica que o quiabo chegou à América do Sul através dos escravos na época da colonização, sendo difundido no Brasil nos estados de Pernambuco, Bahia, Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo (Mitidieri, 1973; Teixeira et al., 1986; Nagai, 1993; Minami et al., 1997).

Quanto à utilização do quiabeiro, além do consumo dos frutos na alimentação humana, o quiabeiro também pode ser utilizado na produção de óleo comestível a partir das sementes ou ainda na produção de fibras, com o uso da casca do caule, formando papel e papelão de qualidade inferior como também tecidos de boa qualidade quando suas fibras são adicionadas às de outras plantas. Rico em vitaminas A, B e C, o quiabo também apresenta propriedades medicinais, sendo utilizado no tratamento de doenças das vias respiratórias e urinárias bem como laxante do aparelho digestivo. Na Ásia e na

África, as plantas são usadas como forrageiras na alimentação do gado (Mitidieri, 1973; Teixeira et al., 1986; Minami et al., 1997).

Segundo Mitidieri (1973), as variedades de quiabeiro são classificadas de acordo com o porte, tamanho do fruto, cor do fruto fresco e secção do fruto. A variedade Santa Cruz-47, obtida por Sudo em 1974, é até hoje a mais plantada. Apresenta estatura média, folhas com limbo bem recortado, frutos longos, roliços, lisos e de cor verde-brilhante. Esta variedade é resistente ao vírus do mosaico (Sudo et al., 1974; Teixeira et al., 1986; Nagai, 1993; Minami et al., 1997; Sonnenberg & Silva, 2002).

O quiabeiro é susceptível a várias doenças, dentre as quais se destacam as viroses. Algumas viroses podem causar prejuízos econômicos à cultura e são, portanto, assunto abordados no presente estudo.

2. Vírus em quiabeiro

As viroses podem causar perdas consideráveis na produção e qualidade dos frutos do quiabeiro (Ndunguru & Rabaju, 2004). Em 1996, Brunt et al. relataram 19 espécies de vírus capazes de infectar o quiabeiro: um alfamovírus, *Alfafa mosaic virus*; um curtovírus, *Beet curly top virus*; um cucumovírus, *Cucumber mosaic virus*; cinco begomovírus, *Abutilon mosaic virus*, *Bhendi yellow vein mosaic virus*, *Cotton leaf curl virus*, *Okra leaf curl virus* e *Rhynchosia mosaic virus*; um ilarvírus, *Tobacco streak virus*; dois luteovírus, *Beet western yellows virus* e *Cotton anthocyanosis virus*; um nepovírus, *Sweet potato ringspot virus*; um ourmiavírus, *Epirus cherry virus*; dois potyvírus, *Beet mosaic virus* e *Watermelon mosaic virus* e três tymovírus, *Abelia latent virus*, *Clitoria yellow vein virus* e *Okra mosaic virus*

Já segundo Jones (2003) o quiabeiro é susceptível a: *Bhendi yellow vein mosaic virus* (= *Okra yellow vein mosaic virus*; BYVMV), *Cotton leaf curl Multan virus* (CLCuMV), *Okra leaf curl India virus* (OkLCuIV), *Okra leaf curl virus* (OkLCuV), *Okra mosaic Mexico virus* (= *Okra yellow mosaic virus*; OkMMV) e *Okra yellow vein mosaic virus* (OYVMV), sendo todos do gênero *Begomovirus*.

Atualmente, são relatados os seguintes begomovírus em quiabeiro: *Abutilon mosaic virus*, *Bhendi yellow vein mosaic virus*, *Okra yellow crinkle virus*, *Okra yellow mosaic Mexico virus*, *Okra yellow mottle Iguala virus*, *Okra yellow vein mosaic virus*, *Pepper golden mosaic virus*, *Pepper huasteco yellow vein virus* (Fauquet et al., 2008). Além destas espécies aceitas, são relatadas mais cinco espécies tentativas: *Okra leaf curl India virus*, *Okra leaf curl virus*, *Okra mosaic Mexico virus*, *Okra yellow mottle Iguala virus* e *Okra yellow mottle virus* (Fauquet et al., 2008).

Os vírus relatados com mais frequência na cultura do quiabeiro são os begomovírus *Okra leaf curl virus* (OLCV) e *Bhendi yellow vein mosaic virus* (BYVMV) e o tymovírus *Okra mosaic virus* (OkMV) descritos a seguir.

O OLCV pertence à família *Geminiviridae* e gênero *Begomovirus*, sendo transmitido pela mosca-branca de modo persistente (N'Guessant et al., 1992; Brunt et al., 1996). Este vírus é uma grande ameaça à produção de quiabo em diversas partes da África ocidental e do Oriente médio, constituindo-se a doença mais séria do quiabeiro nessas regiões. O OLCV causa mosqueado verde-amarelado nas folhas que se tornam curvadas e irregulares. As plantas se tornam enfezadas, apresentando frutos amarelos ou enrugados com pontos pretos (Ndunguru & Rabaju, 2004).

Em Bangladesh, as viroses ocasionam severas perdas na produção de quiabo. O *Yellow vein mosaic virus* (= *Bhendi yellow vein mosaic virus*; BYVMV), transmitido pela mosca-branca, é o vírus mais importante. É comum encontrar campos de produção com 100% das plantas infectadas, alcançando perdas de até 94% de produtividade, dependendo do estágio da cultura no momento da infecção (Ali et al., 2000).

A *Yellow vein mosaic disease* é o principal fator limitante da produção de quiabo na Índia. Pesquisadores demonstraram que essa doença é causada por um complexo que consiste do begomovírus monopartido, *Bhendi yellow vein mosaic virus* (BYVMV), e um pequeno componente de DNA satélite β (Jose & Usha 2003). O BYVMV foi relatado pela primeira vez em Bombai, Índia (Kulkarni, 1924). Plantas de quiabeiro infectadas pelo BYVMV apresentam sintomas persistentes de clareamento de nervuras seguido de amarelecimento. Folhas e frutos apresentam tamanho reduzido e há uma significativa queda na produção dos frutos (Pun & Doraiswamy, 1999; Jose & Usha 2003).

O BYVMV pode infectar o quiabeiro sistemicamente por agroinoculação, porém, induz apenas um leve enrolamento foliar nesta hospedeira. Com a associação com o DNA-β, o vírus induz sintomas típicos de bhendi yellow vein mosaic disease (BYVMD) em quiabeiro. BYVMD representa um novo membro do grupo emergente dos begomovírus bipartidos que necessitam um DNA satélite para indução de sintomas (Jose & Usha 2003).

O OkMV foi relatado pela primeira vez em 1969 ocasionando clorose, mosaico e escurecimento de nervuras em folhas de quiabeiro na Costa do Marfim (Givord & Hirth, 1973; Lana et al., 1975; Stephan et al., 2008). OkMV é um *Tymovirus* com simetria icosaédrica, formado de RNA e transmitido tanto mecanicamente quanto pelo besouro *Podagrica decolorata* Duvivier (Givord & Den Boer, 1980). As características biológicas e a seqüência completa do genoma são conhecidas para um isolado nigeriano (Stephan et al., 2008). Infecções precoces em quiabeiros podem levar a perdas de 12 a 19,5% de produtividade (Stephan et al., 2008).

Na Tanzânia, o quiabo é cultivado principalmente nas áreas costeiras do Oceano Índico e na bacia do Lago Victoria. Em estudos de detecção na bacia do Lago Victoria, utilizando testes sorológicos DAS-Elisa, foi detectado OkMV em 97% das amostras testadas. Tal virose reduziu a produção dos frutos em 34,7% (Ndunguru & Rabaju, 2004).

O OkMV também foi relatado no Quênia, na Nigéria e em Serra Leoa na África (Brunt et al., 1996) causando diversos sintomas como mosaico, clorose ou escurecimento de nervura e enfezamento (Brunt et al., 1990). Esta virose provoca diminuição da altura da planta, do comprimento do fruto e do número de frutos por planta (Ndunguru & Rabaju, 2004).

3. Família *Geminiviridae*

Desde a década de 1930 as geminiviroses são relatadas no Brasil, contudo, no final da década de 1980, adquiriram maior importância com a introdução do biótipo B da mosca-branca (Ribeiro et al., 2003; Assunção et al., 2006; Fernandes et al., 2008). O *Abutilon mosaic virus* (AbMV) foi um dos primeiros geminivírus descritos no mundo

(Costa & Carvalho, 1960b). Plantas de *Abutilon* infectadas apresentavam grande valor ornamental devido ao mosaico produzido por este vírus. Muitas plantas eram enxertadas para a transmissão da variação foliar causada pelo vírus (Jovel et al., 2004).

Atualmente, os geminivírus causam significantes perdas em inúmeras plantações ao redor do mundo, constituindo um dos principais problemas fitossanitários de culturas como milho, tomate, pimentão, mandioca, feijão e algodão. Muitos geminivírus têm sido isolados e caracterizados em razão de sua importância econômica e da facilidade da clonagem de seu genoma (Faria et al., 2000; Morales & Anderson, 2001; Fauquet et al., 2003; Assunção et al., 2006).

Os geminivírus são vírus de DNA circular fita simples, de 2,5-3,0 kb, com um ou dois componentes genômicos envoltos por proteínas da capa formando uma partícula geminada, de aproximadamente 18 a 30 nm, de morfologia icosaédrica incompleta. Transmitidos por insetos, infectam monocotiledôneas ou dicotiledôneas (Hanley-Bowdoin et al., 1999; Faria & Zerbini, 2000; Rojas et al., 2005; Fauquet et al., 2008). Todos os geminivírus carregam uma região intergênica (IR) que contém a origem de replicação e uma estrutura em forma de grampo que contém uma sequência conservada de nove nucleotídeos (TAATATTAC) envolvida no ciclo replicativo (Harrison, 1985; Rojas et al., 2005).

Os geminivírus utilizam transcrição bidirecional e sobreposição de genes para codificação de proteínas. Possuem uma proteína capsidial (CP) que é conservada, mas que diverge em termos de especificidade na transmissão por inseto vetor. Outra proteína importantecodificada por geminivírus é a Rep (“replication-associated protein”). Esta proteína é conservada em sequência aminoácida, posição e função sendo essencial para replicação viral (Hanley-Bowdoin et al., 1999; Faria & Zerbini, 2000; Rojas et al., 2005).

A família *Geminiviridae* está dividida em quatro gêneros com base no círculo de hospedeiras, inseto vetor, número de componentes genômicos e em relações filogenéticas (Stanley et al., 2005). Os gêneros *Mastrevirus*, os *Curtovirus* e os *Topocovirus* são denominados monopartidos por possuírem apenas um componente genômico. O gênero *Begomovirus*, em geral, apresenta genoma bipartido, com dois componentes genômicos

(DNA-A e DNA-B) contido no velho mundo são encontrados alguns begomovírus monopartidos (Rojas et al., 2005).

Os *Mastrevirus* e os *Curtovirus* são transmitidos por cigarrinhas (Homoptera, Cicadellidae) para plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas, respectivamente. O genoma dos mastrevirus, representado pela espécie-tipo *Maize streak virus* (MSV), é composto de uma molécula de DNA de aproximadamente 2,7kb contendo quatro ORFs e duas regiões intergênicas, um grande (LIR) e outra pequena (SIR). Há pelo menos duas exceções de *Mastrevirus* infectando dicotiledôneas: *Tobacco yellow dwarf virus* (TobYDV), na Austrália, e *Bean yellow dwarf virus* (BeYDV), na África do Sul (Liu et al., 1997; Gutierrez, 1999; Gutierrez et al., 2004; Rojas et al. 2005; Fauquet et al., 2008).

O genoma dos *Curtovirus*, representado pela espécie-tipo *Beet curly top virus* (BCTV), é composto de um DNA de aproximadamente 3kb apresentando sete ORFs e uma IR com a origem de replicação. Este gênero apresenta cinco espécies: *Beet curly top virus* (BCTV), *Beet severe curly top virus* (BSCTV), *Beet mild curly top virus* (BMCTV), *Horseradish curly top virus* (HrCTV) e *Spinach curly top virus* (SCTV). A maioria dos curtovírus desenvolveu a capacidade de infectar um grande número de hospedeiras. (Rojas et al., 2005; Fauquet et al., 2008).

O gênero *Topocuvirus* possui uma única espécie, *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV), sendo transmitidos por membracídeos (Homoptera, Auchenorrhyncha) para dicotiledôneas. Seu genoma é um recombinante natural entre o genoma dos mastrevírus e o dos begomovírus monopartidos (Briddon et al., 1996; Rojas et al., 2005).

Os *Begomovirus* são transmitidos pela mosca-branca *Bemisia tabaci* Genn., Ordem Homoptera, Família Aleyrodidae, para plantas dicotiledôneas de maneira circulativa persistente (Polston & Anderson, 1997; Fauquet et al., 2003; Stanley et al., 2005). As características moleculares deste gênero estão descritas na seção 7.

4. Taxonomia da família *Geminiviridae*

A primeira padronização dos nomes dos geminivírus foi proposta por Fauquet et al. (2000), que estabeleceu um conjunto de regras para originar nomes de novas espécies

identificadas. Durante os últimos anos, a crescente determinação de seqüências de genoma completo dos geminivírus causou enormes dificuldades na nomenclatura e no estabelecimento de critérios de diferenciação entre espécies e estirpes. Isso resultou em uma rápida evolução dos critérios taxonômicos que é descrita a seguir:

Em 1991, o International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) adicionou as espécies nas categorias de gênero, subfamília, família e ordem na classificação universal dos vírus e endossou a seguinte definição de espécie viral: “Uma espécie viral é uma classe politética de vírus que constitui uma linhagem de replicação e ocupa um nicho ecológico particular” (van Regenmortel, 1990; Fauquet et al., 2003).

O ICTV possui um código universal de nomenclatura que estabelece que o nome de um vírus deve compreender mais de uma palavra em adição a palavra “virus”. Essas palavras adicionais podem incluir nome da hospedeira, descrição dos sintomas e localidade do isolado, no entanto, não pode incluir o nome do descobridor. A palavra “virus” deve ser a última do nome, porém, palavras, letras ou números podem ser adicionados para caracterizar estirpes, sorogrupos, genótipos ou isolados do vírus. Foi proposto que a localização geográfica do primeiro isolado do vírus seja adicionada antes da palavra “virus” (Fauquet et al., 2000). Este sistema é seguido por um grande número de virologistas no mundo, o que tornou a nomenclatura dos geminivírus mais útil e clara (Fauquet et al 2008).

Em 2003, devido a dificuldades inerentes a identificação das espécies, o ICTV propôs novos critérios de demarcação de espécies. O critério mais importante estabelece que 89% de identidade nucleotídica do DNA-A é o limite de identidade para a proposição de uma nova espécie. Neste mesmo ano foi publicada uma lista de espécies e isolados de geminivírus seguindo as regras estabelecidas ICTV (Fauquet et al., 2003).

Mais tarde, foi proposta uma terminologia para descrever entidades virais abaixo do nível de espécie (Fauquet & Stanley, 2005). Estirpe é uma terminologia amplamente utilizada e sua definição é a seguinte: estirpes são vírus que pertencem à mesma espécie e diferem em características biológicas, sorológicas e/ou moleculares estáveis e herdáveis. A identificação de uma estirpe pode incluir ainda a descrição de um sintoma particular, um hospedeiro ou vetor diferente ou uma diferença genética estável significativa como

deleção, repetição ou recombinação de seqüência. Já uma variante é definida como algo que difere sutilmente do normal, como por exemplo, na seqüência genômica, nos sintomas obtidos ou no modo de transmissão. Esse termo é raramente usado para geminivírus, mas pode ser utilizado para acomodar variações entre isolados. Comparações de seqüências apresentando 85 a 96% de identidade nucleotídica correspondem a “estirpe”, enquanto que 92 a 100% de identidade correspondem a “variante”. Existe ainda um “ombro” de 99 a 100% que pode ser atribuído a mutações de ponto ou erros de PCR/sequenciamento (Fauquet & Stanley, 2005).

Recentemente, foi publicada uma revisão do status de demarcação de espécies e estirpes de geminivírus bem como a descrição de 672 isolados de begomovírus (Fauquet et al., 2008). Os novos critérios propõem que quando a identidade entre duas seqüências for menor que 88% o isolado em questão pertence uma nova espécie. Se o alinhamento for igual a 88 ou 89%, o isolado pertence tentativamente à espécie relacionada. E quando a identidade nucleotídica entre as seqüências for maior que 89%, o isolado em questão pertence definitivamente à espécie comparada. Com relação à classificação abaixo do nível de espécie as proposições são as seguintes: identidade de seqüência abaixo de 93% caracteriza nova estirpe dentro da espécie, enquanto que a identidade acima de 94% caracteriza uma variante daquela estirpe. Como consequência, alguns isolados foram classificados como estirpes enquanto outros, previamente classificados como estirpes, foram elevados ao nível de espécie (Fauquet et al., 2008).

Há uma crescente necessidade em estabelecer um conjunto de descrições padronizadas e informativa dos isolados. Uma possibilidade é associar a amostra com quatro descrições: hospedeira original, sintomas originais, data da coleta e coordenadas do ponto de coleta. Com estas informações básicas pode-se precisamente posicionar a amostra viral no espaço e no tempo, e ter a amostra mapeada automaticamente. A data da coleta é importante para estudos evolucionários e epidemiológicos, e isso ainda não é encontrado nos bancos genômicos. Virologistas devem ser encorajados a realizar esses procedimentos que podem ser futuramente adotados pelos bancos de dados (Fauquet e Stanley, 2005; Fauquet et al., 2008).

Dentro da família Geminiviridae, o gênero begomovírus é o mais numeroso, e por isso dedica-se especial atenção ao tópico a seguir.

5. Gênero *Begomovirus*

Os begomovírus causam perdas significativas e freqüentemente totais em culturas importantes para indústria e alimentação em agrossistemas tropicais e subtropicais por todo o mundo (Goodman 1981; Brown, 1994; Morales & Anderson, 2001; Zerbini et al., 2005). O nome dado ao gênero *Begomovirus* é originário da espécie-tipo *Bean golden yellow mosaic virus* (Fauquet et al., 2008).

Espécies de plantas invasoras das famílias Malvaceae, Euphorbiaceae e Fabaceae têm sido relatadas como hospedeiras de begomovírus em vários países (Morales & Anderson, 2001), inclusive no Brasil (Assunção et al., 2006). Plantas invasoras têm chamado a atenção de pesquisadores porque servem como reservatórios para vários geminivírus e, assim, atuam como hospedeiros adequados para recombinação gênica dos vírus. Como muitas invasoras são perenes, estas plantas podem manter populações virais entre as estações de cultivo. Invasoras do gênero *Sida* são interessantes quando consideradas no contexto das epidemias virais, pois são largamente disseminadas pela América Latina e outras regiões tropicais e subtropicais do mundo onde servem como hospedeiras de diversos geminivírus (Jovel et al., 2004). Além disso, plantas deste gênero estão frequentemente associadas com culturas hortícolas tipicamente afetadas por geminivirose (Jovel et al., 2007).

A distribuição dos begomovírus está intimamente relacionada com a disseminação da mosca-branca. Estima-se que esse vetor possui mais de 500 hospedeiras diferentes por todo o mundo (Morales & Anderson, 2001).

Bean golden mosaic virus (BGMV), foi um dos primeiros vírus transmitidos pela mosca-branca a ganhar notoriedade na América Latina. Este vírus foi observado pela primeira vez, em 1961, no estado de São Paulo, infectando feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e feijão lima (*P. lunatus* L.), contudo, naquela época, esta virose foi considerada de importância secundária (Costa, 1965; Morales & Jones, 2004). Dez anos

após o primeiro relato, o BGMV estava presente em praticamente todas as áreas produtoras de feijão do Brasil (Faria et al., 2000; Morales & Anderson, 2001; Zerbini et al., 2005).

O mosaico dourado do feijoeiro também já foi relatado na América Central e no Caribe. Recentemente, foi detectado no sul da Flórida e no estado de Chiapas, México (Gilbertson et al., 1993; Faria et al., 1994; Blair et al., 1995; Garrido-Ramirez et al., 2000). Estudos de begomovírus associados com o mosaico dourado do feijoeiro de diferentes regiões geográficas têm revelado que duas espécies distintas de begomovírus, com seqüências nucleotídicas e propriedades biológicas diferentes, causam o mosaico dourado do feijoeiro (Gilbertson et al., 1993). No entanto, como estes vírus provocam sintomas muito similares, foram nomeados BGMV tipos I e II. Os isolados do BGMV tipo I foram encontrados na América do Sul (Brasil) e não eram transmissíveis mecanicamente (Gilbertson et al., 1993; Faria e Maxwell 1999), enquanto que os isolados do tipo II foram encontrados na América Central, no Caribe e na Flórida e eram transmissíveis mecanicamente (Howarth et al., 1985; Faria et al., 1994; Blair et al., 1995).

A nomenclatura do BGMV foi revisada e foram propostos nomes de espécies diferentes para os tipos I e II do BGMV (Gilbertson et al., 1993). O tipo I continuou sendo chamado de BGMV, visto que foi o primeiro a ser descrito, enquanto que o tipo II foi renomeado para *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV), primeiro nome dado ao BGMV tipo II de Porto Rico (Bird et al., 1975).

O vírus causador do mosaico dourado do feijoeiro provoca mosaico verde-amarelo nas folhas e pode tornar as plantas deformadas e anãs. As perdas podem chegar a 100% se a infecção ocorrer no início do desenvolvimento da cultura, no entanto, a incidência da doença e a extensão das perdas variam de acordo com a população de moscas-brancas, as condições ambientais e práticas culturais (Garrido-Ramirez et al., 2000).

Além do BGMV, diversos begomovírus constituem-se fatores limitantes na produção de várias culturas destacando-se as doenças conhecidas como o “cassava mosaic disease”, “cotton leaf curl disease”, “tomato yellow leaf curl disease” e “pepper

golden mosaic” (Briddon & Markham 2000; Zerbini et al., 2005), que serão descritos a seguir.

5.1. “Cassava mosaic disease”

A planta de mandioca é afetada severamente por diversos begomovírus que causam a “Cassava mosaic disease” (CMD) endêmica na África e na Ásia (Bull et al., 2006). *African cassava mosaic virus* (ACMV) é um típico begomovírus bipartido que infecta mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) no continente Africano. Este vírus é o principal fator limitante na produção de mandioca na África Central e do Sul (Briddon & Markham 2000). Além de ser transmitido pela mosca-branca, o ACMV também é transmitido mecanicamente da mandioca para diversas solanáceas como *Datura* sp. e *Nicotiana* sp. (Fauquet & Fargette, 1990; Briddon et al., 1998). Como a mandioca é propagada vegetativamente, o vírus é perpetuado, sendo disseminado pelo material vegetal infectado (Bull et al., 2006).

No Quênia, a CMD é causada por três begomovírus: ACMV, *East African cassava mosaic virus* (EACMV) e uma variante Uganda EACMV-UG. Plantas infectadas apresentam-se atrofiadas e há uma perda severa na produtividade das raízes. Em experimentos conduzidos no Quênia, a incidência de CMD chegou a 100% na maioria dos campos do oeste do país, enquanto que na costa variou de 25 a 50% (Were et al., 2004).

Legg & Fauquet (2004) relataram seis espécies de begomovírus em associação com a CMD na África: *African cassava mosaic virus* (ACMV), *East African cassava mosaic virus* (EACMV), *East African cassava mosaic Cameroon virus* (EACMCV), *East African cassava mosaic Malawi virus* (EACMMV), *East African cassava mosaic Zanzibar virus* (EACMZV) e *South African cassava mosaic virus* (SACMV). Acredita-se que estes vírus evoluíram de vírus africanos silvestres que se adaptaram a mandioca introduzida durante o século XVIII. Inicialmente, estes vírus existiam em regiões geográficas distintas, porém, recentemente, essa distribuição tornou-se mais complexa com a epidemia ocorrida durante os anos 1990 no norte da Uganda, que disseminou a doença para países vizinhos e continua sendo disseminada pela África Central (Legg &

Fauquet, 2004; Bull et al., 2006). O fenótipo severo da CMD, associado a esta epidemia, é causado por interações sinérgicas entre ACMV e EACMV-UG (Zhou et al., 1997; Pita et al., 2001; Bull et al., 2006).

Plantas de mandioca provenientes de áreas produtoras do Quênia foram submetidas à análise de polimorfismo utilizando a técnica PCR-RFLP. Nesse estudo identificou-se um padrão bem maior de diversidade viral do que já havia sido relatado. Membros representativos de cada população tiveram suas seqüências analisadas e uma nova espécie foi proposta, East African cassava mosaic Kenya virus. Tais estudos demonstram a importância da recombinação na evolução desses vírus (Bull et al., 2006).

5.2. “Cotton leaf Curl disease”

O “cotton leaf curl disease” (CLCuD) é uma séria doença que afeta o algodoeiro e outras malváceas. Seu primeiro relato ocorreu no final dos anos 1960 no Paquistão (Briddon, 2003). Entre 1992 e 1997 esta virose dizimou todos os campos produtores de algodão deste país (Briddon, 2003). Na Índia, a doença surgiu em 1995 e continua se disseminando em direção ao leste (Briddon, 2003). Em 1992, a mosca-branca *Bemisia tabaci* foi identificada como vetor do vírus (Briddon e Markham, 2000). Mansoor et al. (1993) identificaram um begomovírus monopartido como agente causador, o *Cotton leaf curl virus*. Mais tarde, Zhou et al. (1998) relataram a presença de quatro variantes do vírus em uma planta de algodão originária do Paquistão.

A etiologia da CLCuD só foi elucidada dois anos depois por Briddon et al. (2000). Estes autores verificaram que os clones infectivos produziam sintomas diferentes daqueles típicos da doença, sugerindo que algum outro fator era necessário para indução dos sintomas da CLCuD. Estudos para identificação do agente causal da doença levaram a identificação de um novo componente de DNA associado aos begomovírus, o DNA-1 (Briddon et al., 2001; Briddon, 2003). O DNA-1 é um DNA tipo satélite, fita simples de aproximadamente 1350 nt de comprimento que é capaz de se auto-replicar em células hospedeiras (Mansoor et al. 1999). Contudo, esse componente parece não estar relacionado à patogenicidade do begomovírus. A resposta da questão veio na forma de outra molécula de DNA fita simples, o DNA-β. Este componente mostrou ser essencial

na indução de sintomas da CLCuD. Sua origem evolucionária permanece incerta, contudo, algumas similaridades entre o DNA-1 e o DNA- β sugerem que este seja adquirido pela captura de componentes, da mesma forma que ocorre com o DNA-1 (Briddon et al., 2001; Briddon, 2003).

O complexo de begomovírus que causa a CLCuD pode provavelmente infectar outras malváceas, desde que esses patógenos mostrem um alto grau de especificidade com a hospedeira. O quiabeiro e plantas do gênero *Hibiscus* são prováveis candidatos, pois já abrigam complexos similares. Estas espécies, juntamente com o mamão, são hospedeiros alternativos potenciais que podem abrigar o complexo entre plantações de algodão. Estas evidências sugerem que o complexo de begomovírus está se expandindo tanto em termos de hospedeiras quanto de distribuição geográfica (Briddon, 2003).

5.3. “Tomato yellow leaf curl disease”

A “Tomato yellow leaf curl disease” (TYLCD) foi relatada pela primeira vez em Israel no final dos anos 1930 e tornou-se economicamente importante durante os anos 1960, causando perdas de até 100% de produção (Czosnek & Laterrot 1997; Gafni 2003). O *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) é o vírus responsável pelas grandes perdas na produção de tomates na região Mediterrânea, no Oriente Médio e nas regiões tropicais da África e da América Central (Gafni 2003). Em 1994 este vírus foi detectado no Caribe (Polston & Anderson, 1997; Faria et al., 2000), sendo em seguida relatado nos Estados Unidos, na Flórida, Geórgia e Louisiana (Polston et al., 1999). O genoma dos isolados do TYLCV encontrados no Mediterrâneo, na América Central e nos EUA é monopartido, enquanto que o dos isolados da Tailândia é bipartido (Gafni 2003).

Epidemias da TYLCD têm devastado campos de produção de tomate na Espanha desde 1992 com a espécie *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV). Em 1997, outra espécie de TYLCV foi encontrada em associação com TYLCSV, formando um recombinante natural. Esses dois vírus são frequentemente encontrados em infecções mistas em plantas de tomate. Nesta região, foi detectado ainda um recombinante natural entre estes vírus exibindo um novo fenótipo patogênico que provavelmente possui

vantagem seletiva sobre os genótipos parentais (Navas-Castillo et al., 1999; 2000; Monci et al., 2002).

5.4. “Pepper golden mosaic”

No final dos anos 1980, os begomovírus atingiram culturas de pimentão (*Capsicum annum* L.), causando epidemias no sudoeste dos Estados Unidos, no México, Caribe e América Central (Stenger et al., 1990; Torres-Pacheco et al., 1996; Brown et al., 2000; Brown et al., 2005). “Serrano golden mosaic virus” originário do Deserto de Sonora no Arizona e Sinaloa, México, foi o primeiro begomovírus que infecta pimentão a ser descrito e hoje é denominado *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) (Fauquet et al., 2003; Brown et al., 2005).

Pepper huasteco virus (PHV) e *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) são membros do gênero begomovírus já caracterizados molecularmente, que apresentam genoma bipartido (Stenger et al., 1990; Méndez-Lozano et al., 2003). Tais vírus infectam naturalmente diversas dicotiledôneas como pimentão, tomate, tomate arbóreo e fumo (Torres-Pacheco et al., 1996; Méndez-Lozano et al., 2003). No México, estes dois vírus têm sido relatados como os patógenos virais mais importantes na horticultura, sendo inicialmente detectados na mesma região geográfica (nordeste do México e sul do Texas). Uma alta porcentagem de plantas infectadas contém ambos os vírus, mostrando que PHV-PepGMV é uma combinação predominante nas culturas citadas (Méndez-Lozano et al., 2003).

No Brasil, os begomovírus são importantes para várias culturas, como o são em todo o mundo.

6. Begomovírus no Brasil

O vírus da clorose infecciosa das malváceas (CIM) foi relatado infectando *Sida*, *Abutilon* e outras espécies, contudo, até a década de 50, a etiologia da doença era baseada em observações de sintomas, sem nenhuma evidência experimental (Costa, 1954). Ensaio para estudar o círculo de hospedeiras do vírus da CIM foram realizados por

Costa (1954). As inoculações foram feitas com indivíduos da mesma espécie de *Bemisia* alimentados em plantas de *Sida micrantha* St Hill. afetadas pela CIM. Sintomas de mosaico foram produzidos em plantas de *Althea rosae* (L.) Cav., em quiabeiro e em *Sida rhombifolia* L. A infecção ocorreu também em plantas da família *Solanaceae* (*Nicandra physaloides* (L.) Pers) e *Leguminosae* (feijão comum, guar e feijão de porco). Nessa época ainda não se conhecia a importância econômica das moléstias causadas pelo vírus da CIM em feijoads e plantações de quiabeiro (Costa, 1954). Estudos posteriores demonstraram que a CIM pode ser transmitida para representantes das Urticáceas, Tiliáceas, Esterculiáceas, Papilionáceas e Solanáceas (Silberschmidt & Tommasi, 1955; Silberschmidt et al, 1957). Em 1960, Flores et al. relataram a CIM em campos de tomateiro no estado de São Paulo.

O mosaico era uma moléstia comum no algodoeiro na década de 1930. Nos anos seguintes especulou-se sobre a possibilidade deste mosaico ser causado pelo mesmo vírus responsável pela CIM, comumente encontrada em espécies de *Sida* no estado de São Paulo. A descoberta da mosca-branca como vetor da CIM (Orlando & Silberschmidt, 1946) abriu novas possibilidades para se verificar se o vírus causador do mosaico comum do algodoeiro era o mesmo da CIM. Experimentos de transmissão do mosaico comum do algodoeiro de plantas infectadas para plantas sadias através de uma espécie de *Bemisia* apresentaram resultados negativos. Entretanto, quando a mesma espécie de mosca-branca foi alimentada em plantas de *Sida micrantha* infectadas pela CIM e posteriormente colonizada em algodoeiros sadios, estes desenvolveram os sintomas de mosaico comum. Os resultados indicam que o mosaico comum do algodoeiro é causado pelo vírus da CIM e que provavelmente o inseto vetor, embora capaz de infestar o algodoeiro, dificilmente se torna virulífero quando alimentado em algodoeiros infectados pelo mosaico comum. A transmissão de algodoeiro para algodoeiro deve ser rara, e mesmo os casos de infecção tardia observados em algodoads podem ser devidos a insetos virulíferos provenientes de plantas infectadas de *Sida*, que muitas vezes estão presentes na própria plantação ou próximas a esta (Costa, 1954).

No Brasil, na década de 60, uma doença que provocava mosaico amarelo em quiabeiro era encontrada com certa frequência. Especulava-se que tal virose parecia ser causada pelo vírus do grupo da clorose infecciosa das malváceas, comumente encontrado

em várias regiões do país (Kitajima et al., 1979). Segundo Teixeira et al. (1986), o mosaico comum do quiabeiro é causado por vírus existentes em outras malváceas, sendo transmitido por mosca-branca. Plantas com mosaico do quiabeiro apresentavam manchas cloróticas amareladas e bolhas no limbo. A importância do mosaico do quiabeiro diminuiu após a introdução da cultivar resistente ‘Santa Cruz 47’. Acreditava-se que esta doença era causada por um begomovírus, contudo sua etiologia não foi confirmada (Sudo, 1974; Nagai, 1993). Estudos adicionais são necessários para confirmação do agente etiológico do mosaico do quiabeiro visto que o begomovírus relatado como provável causador da doença ainda não foi isolado de plantas de quiabo.

6.1. Begomovírus em tomateiro no Brasil

Os begomovírus constituem-se, atualmente, o principal fator limitante na produção de tomate no Brasil (Ribeiro et al., 2003; Fernandes et al., 2008). O primeiro relato de um begomovírus em tomateiro no Brasil foi feito por Flores et al. (1960). Costa et al. (1975) descreveu seis begomovírus induzindo mosaico dourado em tomateiro no estado de São Paulo. Um desses vírus foi purificado e denominado *Tomato golden mosaic virus* (TGMV; Matyis et al., 1975). Nesta época, a incidência do mosaico dourado em tomateiros foi atribuída a migração da mosca-branca presente em plantações de soja e feijão, reservatórios naturais de geminivírus (Costa, 1976).

O TGMV foi um dos primeiros vírus a ser clonado como DNA infeccioso (Hamilton et al., 1984) e se tornou um modelo para estudos de biologia molecular e de interações vírus-hospedeiro (Hanley-Bowdoin et al., 1999). Contudo, o mosaico dourado do tomateiro nunca foi uma doença economicamente importante, provavelmente porque o biótipo A da mosca-branca presente no Brasil naquela época colonizava tomateiros com baixa eficiência (Bedford et al., 1994). Com a introdução do biótipo B da mosca-branca no final da década de 1980, relatos de begomovírus em tomateiros tornaram-se frequentes causando impacto devastador em diversas regiões do país (Brown et al., 1995; Santos et al., 2003).

No início dos anos 1990 surgiu no Brasil um complexo extremamente diverso de begomovírus contendo quatro espécies reconhecidas [*Tomato golden mosaic virus*

(TGMV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV)] e pelo menos oito espécies tentativas, além das formas recombinantes desses vírus. Esse complexo viral tem devastado plantações de tomate por todo o Brasil (Fernandes et al., 2008).

Em estudos de detecção no Centro-Oeste do estado de São Paulo, verificou-se que cerca de 10% das amostras de tomateiro coletadas com sintomas de mosaico estavam infectadas com um isolado de *Sida mottle virus* (SiMoV) (Cotrim et al., 2004). Callegario et al. (2004) verificaram em Minas Gerais infecção natural de tomateiro com um isolado do *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV).

No Distrito Federal a presença da mosca-branca foi relatada em 1993 (França et al., 1996), ocorrendo, no ano seguinte, o primeiro relato de begomovírus em tomateiro (Bezerra et al., 1996). Em 1995 as perdas na produtividade de tomate no DF variaram de 40 a 100% (Bezerra et al., 1996). Desde 1996, elevada incidência de begomovírus em tomateiro vem sendo observada nos estados de Minas Gerais, Bahia, São Paulo, Pernambuco, Rio de Janeiro, Goiás, Ceará e no Distrito Federal limitando a produção de tomate em várias áreas de cultivo (Faria et al., 2000; Inoue-Nagata et al., 2006).

O Brasil é considerado um dos maiores centros de diversidade de begomovírus bipartidos do mundo (Fernandes et al., 2008). Mais de 40 begomovírus infectando tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) já foram relatados (Fauquet et al., 2003). Comparações de seqüências revelam fortes evidências de recombinação entre os begomovírus brasileiros. Os resultados dessas comparações indicam a existência de um alto grau de diversidade genética pré-existente entre os begomovírus que infectam tomate no Brasil e sugere que esses vírus foram transferidos de hospedeiras naturais para o tomate, após a introdução do biótipo B da mosca-branca no Brasil (Ribeiro et al., 2003; Zerbini et al., 2005).

Nos anos 1970, o mosaico comum do feijoeiro se tornou a maior limitação na produção de feijão no Brasil. Além de infectar feijão, o BGMV também já foi relatado infectando soja (*Glycine max* L.) naturalmente. Em estudos de diversidade de geminivírus em amostras de feijão, feijão lima e *Leonurus sibiricus* L. de diversas regiões do Brasil, foi relatada uma infecção mista de BGMV com AbMV no estado de São Paulo.

Também foi detectado um novo geminivírus em associação com feijão lima no estado de Pernambuco, denominado Lima bean golden mosaic virus (LBGMV-BR) e outro, associado com a daninha *L. sibiricus*, denominado Leonurus mosaic virus. Em condições de campo, os sintomas da doença variam com a idade da planta no momento da infecção e com o genótipo do feijão (Faria & Maxwell, 1999).

6.2. Begomovírus em plantas invasoras no Brasil

Espécies de plantas invasoras das famílias Capparaceae (*Cleome affinis* D.C.), Euphorbiaceae (*Cnidoscolus urens* (L.) Arthur), Fabaceae (*Macroptilium lathyroides* (L.) Urban e *Desmodium* sp.), Labiatae (*Leonurus sibiricus*), Malvaceae (*Sida rhombifolia*, *Herissantia crispa* (L.) Brizicky, *Sida micrantha* e *S. spinosa* L.) e Sterculiaceae (*Waltheria indica* L. e *Triumfetta semitriloba* Jacq.) têm sido relatadas como hospedeiras de begomovírus no Brasil, constituindo um importante reservatório de vírus que podem ser transmitidos para espécies cultivadas (Faria & Maxwell, 1999; Assunção et al., 2006).

Plantas de *Sida* são um dos maiores reservatórios naturais de begomovírus (Jovel et al., 2004; Zerbini et al., 2005). Por várias décadas, um mosaico frequentemente associado a plantas de *Sida* foi considerado como causado por diversas estirpes do AbMV. Um desses complexos virais foi mantido em plantas de *Sida micrantha* por propagação vegetativa durante 25 anos na Alemanha. Nesse estudo foi demonstrado que o *Sida micrantha mosaic* está associado a pelo menos dois begomovírus distintos do AbMV, sendo denominado “*Sida micrantha mosaic associated-viruses*” (SimMV). Esses resultados indicam que uma co-infecção de begomovírus pode persistir por décadas mantendo sua integridade genômica, produzindo um reservatório de geminivírus parcialmente recombinados, porém distintos (Jovel et al., 2004).

Em plantas de *S. micrantha* foi encontrado um par de componentes genômicos virais originado recentemente por recombinação. Ao longo dos anos, dois DNAs-A (A1 e A2) e três DNAs-B (B1, B2 e B3) foram clonados de plantas de *S. micrantha*. De acordo com a alta identidade em suas regiões comuns os DNAs A1 e B3 e os DNAs A2 e B2 são componentes cognatos de dois begomovírus. Contudo, a região intergênica do DNA B2

parece ser produto da recombinação entre B1 e A2. O isolado A2B2 possui região comum maior que os outros isolados como consequência do DNA B2 possuir uma seqüência da região codificante do DNA A2 que inclui 56 aminoácidos N terminais da AC1/Rep, proteína de replicação constitutiva de todos os geminivírus. Este foi o primeiro exemplo do surgimento natural de um geminivírus bipartido (*statu nascendi*; Jovel et al., 2004; 2007).

Compreender a organização genômica dos begomovírus é fundamental para explicar suas interações com o vetor e a planta hospedeira, por isso o assunto é discutido a seguir.

7. O genoma dos Begomovírus

O genoma dos begomovírus bipartidos é composto de duas moléculas de DNA (DNA-A e DNA-B) de mesmo tamanho que não possuem similaridade de seqüência, exceto por uma região comum (RC) altamente conservada (com mais de 90% de identidade) de aproximadamente 200 nucleotídeos, presente na região intergênica (Harrison, 1985). O DNA-A dos begomovírus bipartidos pode replicar autonomamente e produzir vírions, porém o DNA-B é necessário para a infecção sistêmica (Fauquet et al., 2005).

A RC contém seqüências essenciais para replicação e transcrição de ambos os componentes, o que mantém a fidelidade do genoma bipartido (Hanley-Bowdoin et al., 1999). O DNA-A possui quatro ORFs (AC1, AC2, AC3, e AV1), codificando proteínas necessárias para replicação, transcrição e encapsidação. Membros bipartidos do velho mundo possuem ainda uma ORF adicional, AV2, relacionada ao movimento viral. O DNA-B possui duas ORFs (BC1, BV1) que codificam proteínas envolvidas no movimento viral e no desenvolvimento de sintomas. Dessa forma, os dois componentes de DNA são essenciais para o estabelecimento de uma infecção sistêmica eficiente. Como cada componente é individualmente encapsidado, vírions distintos carregando a molécula de DNA-A ou DNA-B devem ser entregues em uma célula-alvo para que seja iniciada a infecção sistêmica (Fauquet et al., 2005; Rojas et al., 2005).

Os genes são nomeados de acordo com o componente de DNA, sua orientação no DNA, senso viral (V) ou complementar (C), e a proximidade da RC. Alternativamente, os genes são nomeados de acordo com sua função: CP (AV1), Rep (AC1), TrAP (AC2), REn (AC3), MP (BC1) e NSP (BV1) (Rojas et al., 2005). Os genes codificados pelo DNA-A são essenciais para replicação (Rep e REn), regulação da transcrição (TrAP), encapsidação e transmissão pelo vetor (CP). Os genes codificados pelo DNA-B codificam a “nuclear shuttle protein” (NSP) e “movement protein” (MP), que juntas são responsáveis pelos movimentos célula-a-célula e a longa distância nas plantas infectadas. (Hanley-Bowdoin et al., 1999; Gutierrez, 2000a).

A ORF AC1 codifica a proteína Rep “replication-associated protein”. Esta proteína é conservada em seqüência, posição e função sendo essencial para replicação viral (Hanley-Bowdoin et al., 1999; Faria & Zerbini, 2000; Rojas et al., 2005; Fauquet et al., 2008).

Os begomovírus possuem uma proteína capsidial (CP) conservada que envolve o ssDNA, mas que diverge em termos de especificidade na transmissão pelo inseto-vetor (Fauquet et al., 2005). A CP, codificada pela ORF AV1, é necessária a algumas espécies para a infecção sistêmica de seus hospedeiros, e dispensável para a maioria das outras (Qin et al., 1998). Contudo, o movimento independente da CP é hospedeiro-específico, ocorrendo principalmente em espécies em que o vírus é bem adaptado. A CP é essencial para a transmissão e determina a especificidade do inseto-vetor. No caso dos begomovírus monopartidos, a CP funcional é essencial para a infecção sistêmica do hospedeiro e para a transmissão pelo vetor (Azzam et al., 1994; Sudarshana et al., 1998).

A ORF AC2 codifica a “transcriptional activator protein” (TrAP), proteína ativadora da transcrição que atua em *trans* no promotor de genes de sentido viral (CP e NS). Na presença da TrAP, a expressão do promotor da CP é aumentada de 60 a 90 vezes. A TrAP também parece atuar como supressora do silenciamento gênico (Sunter et al., 1994; Hanley-Bowdoin et al., 1999).

A ORF AC3 codifica a proteína “replication enhancer” (REn) que é um fator de amplificação da replicação viral encontrado nos begomovírus e curtovírus. Embora não seja essencial para que a replicação ocorra, o acúmulo de DNA viral é muito maior

quando essa proteína está presente. A REn é direcionada para o núcleo e está envolvida na regulação da replicação interagindo com a Rep e provavelmente desempenha um papel no reconhecimento da origem de replicação. Autores sugerem que a REn estabiliza o complexo de replicação formado por Rep e fatores do hospedeiro (Nagar et al., 1995; Settagle et al., 1996).

A proteína produzida pela ORF AC4 está envolvida na determinação da gama de hospedeiras, na severidade de sintomas e no movimento viral (Jupin et al., 1994). Além disso, AC4 está relacionada à resposta da hospedeira a Rep viral (Fauquet et al., 2005).

As ORFs do DNA-B codificam proteínas responsáveis pelo movimento dos begomovírus no interior da célula e célula-a-célula. A proteína NSP é necessária para o tráfego intracelular de DNA viral do núcleo para o citoplasma, enquanto que a MP está envolvida no movimento do DNA viral célula-a-célula, via plasmodesmas. A proteína MP move-se extensivamente célula-a-célula, provavelmente aumentando o limite de exclusão dos plasmodesmas e assim potencializando o movimento de ds ou ssDNA célula-a-célula (Noueiry et al., 1994).

Entre os genes de senso viral e senso complementar existe uma região intergênica (RI) onde um sinal regulador da replicação e da transcrição viral atua (Hanley-Bowdoin et al., 1999). A RI contém seqüências motivos necessárias para o controle da expressão dos genes e replicação, incluindo pequenos motivos específicos reiterados (íterons) no qual a Rep se liga (Eagle et al., 1994). Essa região também possui uma seqüência altamente conservada de nove nucleotídeos TAATATT↓AC contendo o sítio de iniciação (↓) da replicação, denominado origem de replicação *ori*. O A sublinhado do nonanucleotídeo é referido como o primeiro nucleotídeo e a seqüência numérica continua na orientação do senso viral (Stanley et al., 1995; Hanley-Bowdoin et al., 1999).

Alguns begomovírus do velho mundo possuem apenas um componente genômico homólogo ao DNA-A dos begomovírus bipartidos. Os genes do senso complementar C1, C2 e C3 são homólogos aos AC1, AC2 e AC3, respectivamente. Uma ORF adicional no senso viral, a pré-capa ou V1, que atua como determinante na patogenicidade (Rojas et al., 2005). A ORF V2 codifica a CP multifuncional. Como nos monopartidos *Mastrevirus* e *Curtovirus*, a CP atua na infecção sistêmica e na transmissão por inseto (Bridson et al

1990; Rojas et al., 2005). A ORF C4 codifica uma proteína com papel importante no desenvolvimento de sintomas. Esta proteína pode ainda estar envolvida no movimento sistêmico do TYLCV (Jupin et al., 1994; Fauquet et al., 2005). Vários begomovírus monopartidos do velho mundo estão associados com um DNA satélite de aproximadamente 1,4 kb, denominado DNA- β . Este DNA possui uma ORF β C1 que desempenha papel importante na indução de sintomas. O DNA satélite depende do DNA-A para sua replicação e encapsidação e são essenciais para manutenção da doença no campo (Fauquet et al., 2005; Rojas et al., 2005).

As etapas de infecção dos geminivírus são: transmissão (item 8), replicação (item 9) e movimento viral (item 10), abordados em detalhes a seguir.

8. Transmissão de begomovírus por mosca-branca

Os begomovírus são transmitidos pela mosca-branca, *Bemisia tabaci* biótipo B, de modo circulativo, persistente (Cohen & Nitzani, 1966; Duffus, 1987; Rubinstein & Czosnek, 1997). Para que o vírus seja adquirido e transmitido pelo inseto vetor, a proteína capsidial (CP) produzida pelos geminivírus é um fator determinante na realização desses eventos (Ghanim et al., 2001). A CP é o único produto gênico begomoviral que interage com os fatores da mosca-branca durante a transmissão circulativa do vírus (Czosnek et al., 2002). Os begomovírus não são transmitidos por semente ou por contato entre plantas infectadas e sadias (Costa, 1976).

É durante o processo de alimentação dos insetos que os vírus são adquiridos. Ninfas e adultos de mosca-branca se alimentam inserindo a probóscide na folha, penetrando o floema e sugando a seiva. Moscas adultas podem se dispersar e transmitir o vírus para novas plantas enquanto se alimentam (Jones, 2003).

Estudos anatômicos e de imunolocalização revelam que as partículas virais ingeridas através do estilete do inseto, penetram o esôfago e a câmara de filtro. Posteriormente, os vírions são transportados através da parede do intestino para a hemocele e a partir daí alcançam as glândulas salivares. Os vírus são translocados pelo ducto da glândula salivar e, finalmente, excretados com a saliva durante a alimentação. O

tempo que o vírus leva para completar este ciclo é o período de latência (PL), isto é, o período mínimo de tempo entre o início do período de alimentação do inseto nas plantas infectadas e a transmissão do vírus pelo vetor (Ghanim et al., 2001).

O TYLCV de Israel foi o primeiro begomovírus caracterizado em relação à associação com o seu vetor, *Bemisia tabaci* biótipo B, e suas hospedeiras (Cohen & Harpaz, 1964; Cohen & Nitzani, 1966). Hoje, o TYLCV é o vírus mais estudado em associação com a mosca-branca. Este vírus necessita de um PL entre 12 a 24 horas no corpo do vetor (Cohen & Nitzani, 1966). O DNA genômico do TYLCV pode ser detectado em indivíduos de moscas-brancas trinta minutos após o início do período de aquisição e se acumula no inseto como produto da alimentação (Zeidan & Czosnek, 1991). Segundo Rubinstein & Czosnek (1997), o DNA viral permanece associado às moscas durante toda sua vida adulta, contudo, a quantidade de proteína capsidial rapidamente diminui, não sendo detectável em insetos com 12 dias de idade. Apesar deste fato, a habilidade das moscas infectadas em transmitir o TYLCV decresce com a idade do inseto, mas não desaparece completamente, chegando a taxas de 20 a 10% de transmissão (Rubinstein & Czosnek, 1997). Tais resultados sugerem que uma considerável proporção de vírus ingerido durante as primeiras 48 horas após a emergência do adulto, se acumula nas células do inseto, provavelmente, na forma de nucleoproteínas (Abouzid et al., 1988).

A presença do vírus no corpo do inseto também afeta a longevidade e a fecundidade do inseto. Esta associação reduziu de 17 a 23% a expectativa de vida dos insetos, quando comparados com insetos que não adquiriram o vírus, e diminuiu de 40 a 50% o número médio de ovos produzidos (Rubinstein & Czosnek, 1997).

A transmissão trans-ovariana tem sido associada com a replicação do vírus no vetor (Fukushi, 1935; Black, 1950; Duffus, 1963). Normalmente, o vírus é transmitido para alguns indivíduos, mas não para toda a progênie (Ghanim et al., 1998). Em experimentos de transmissão, Ghanim et al. (1998) detectou DNA de TYLCV na progênie (ovos, primeiro e segundo instares larvais e adultos) de moscas-brancas virulíferas individuais que se desenvolveram em plantas não hospedeiras do vírus, por pelo menos duas gerações. Além disso, o DNA de TYLCV também estava presente na progênie de insetos que adquiriram o vírus através do ovo. A progênie adulta dos insetos

virulíferos e sua própria progênie foram capazes de infectar plantas-teste de tomate, produzindo sintomas típicos da doença. Ovários e ovos maduros dos insetos virulíferos continham DNA viral, assim como os ovos postos por insetos virulíferos mantidos com dieta artificial. Dessa forma, podemos dizer que o TYLCV pode ser transmitido através dos ovos por pelo menos duas gerações, o que implica que a mosca-branca pode servir como reservatório de vírus entre as estações de cultivo, na ausência de plantas hospedeiras viáveis (Ghanim et al., 1998).

Parâmetros de aquisição e transmissão do TYLCV por mosca-branca têm sido estudados com profundidade (Ghanim et al., 2001). Um único inseto é capaz de adquirir o vírus e transmiti-lo para plantas de tomate. Quando um único inseto foi inoculado por planta, fêmeas mostraram-se mais eficientes na transmissão do vírus que os machos (Cohen & Nitzani, 1966).

Segundo Ghanim et al. (2001), moscas-brancas foram capazes de transmitir TYLCV oito horas após contato com plantas de tomate infectadas. Após crescentes períodos de acesso de aquisição (PAA), os órgãos dos insetos foram dissecados e submetidos a PCR. A presença do TYLCV foi detectada na cabeça da mosca-branca após 10 minutos do PAA. O vírus estava presente no intestino médio depois de 40 minutos e foi detectado na hemolinfa após 90 minutos. O vírus foi encontrado na glândula salivar cinco horas e meia após a detecção na hemolinfa. PCR de imunocaptura mostrou que a CP do vírus estava presente nos órgãos do inseto ao mesmo tempo em que o genoma viral, sugerindo que pelo menos alguns TYLCV translocam como vírions.

No Brasil, estudos da interação de um begomovírus isolado de tomateiro no estado de Goiás com *B. tabaci* biótipo B, revelaram um PAA mínimo de 15 minutos onde 6% das plantas foram infectadas. Este percentual aumentou para 65% quando o PAA foi de 24 horas. O período de acesso de inoculação (PAI) mínimo foi de 30 minutos com 18% de infecção, o qual foi elevado para 67% quando chegou a 24 horas. O término do PL foi observado 16 horas após a aquisição do vírus pelo vetor. A passagem trans-estadial foi observada em 100% dos adultos testados, os quais transmitiram o vírus em 33% dos casos (Santos et al., 2003).

Moscas-brancas do biótipo B têm grande capacidade de transmitir begomovírus. O aparecimento de novos begomovírus se dá devido ao rápido desenvolvimento e a ampla gama de hospedeiros deste biótipo. Contudo, alguns begomovírus são transmitidos com mais eficiência que outros. A disseminação mundial do polífago biótipo B da mosca-branca em plantas cultivadas é o principal fator que contribui para o aumento global das doenças transmitidas por mosca-branca (Jones, 2003).

9. Replicação dos geminivírus na planta hospedeira

O ciclo replicativo dos geminivírus depende inteiramente de intermediários de DNA e ocorre dentro do núcleo das células infectadas (Gutierrez, 1999). O ciclo pode ser subdividido em diversos estádios funcionalmente distintos caracterizados por eventos específicos. Durante o processo de infecção, as partículas virais são injetadas pelo inseto-vetor, provavelmente sem a CP, e o genoma viral é transportado para o núcleo da célula hospedeira (Lazarowitz, 1992). Uma vez dentro do núcleo, a amplificação do genoma viral, que envolve um processo eficiente de replicação do DNA, ocorre em três estádios distintos (Saunders et al., 1991; Stenger et al., 1991).

O primeiro estádio envolve a conversão do ssDNA genômico circular em um intermediário de dsDNA “supercoiled” circular covalentemente fechado, denominado forma replicativa I (RFI) (Gutierrez, 1999). Durante este estádio, o ssDNA é convertido em um produto de dsDNA que se associa a histonas celulares formando mini cromossomos virais. Esta parte do ciclo replicativo é completada com participação exclusiva das proteínas das células infectadas desde que o dsDNA é o molde transcricionalmente ativo (Gutierrez, 2000b).

O segundo estádio consiste na utilização do dsDNA como molde para amplificação do dsDNA pelo mecanismo do círculo rolante, no qual a proteína viral Rep é absolutamente necessária (Gutierrez, 1999; 2000b). Tal mecanismo é análogo àquele dos bacteriófagos ϕ X174 e M13 (Timmermans et al., 1994). A Rep é a proteína responsável pela reação de iniciação que envolve a introdução de um corte (↓) dentro do nonanucleotídeo conservado (TAATATT↓AC) em todos os geminivírus, localizado no “loop” da estrutura em forma de grampo presente na região intergênica. Após o estádio

inicial, os fatores necessários para completar a fase de círculo rolante são de origem celular (Gutierrez, 2000b). O último estágio é a produção e a encapsidação do ssDNA genômico circular maduro em partículas virais (Gutierrez, 1999).

É importante ressaltar que a replicação dos geminivírus depende totalmente do sistema enzimático de seus hospedeiros, responsável pela síntese da RF e de novas fitas de ssDNA de sentido viral. Portanto, é fundamental que as células infectadas estejam sintetizando DNA, caso contrário, as enzimas responsáveis pela síntese não estarão presentes em concentração suficiente para permitir a replicação do vírus. Como os geminivírus infectam células vegetais plenamente diferenciadas, a síntese de novos DNAs praticamente não ocorre, dessa forma, o vírus deve ser capaz de modificar o ciclo celular do hospedeiro de forma a reiniciar a síntese de DNA, ou pelo menos ativar a transcrição das enzimas envolvidas nesse processo (Faria & Zerbini, 2000).

A transmissão natural de begomovírus, discutida a seguir, se dá por insetos, enquanto a transmissão artificial pode se dar por biobalística.

10. Movimento dos geminivírus na planta hospedeira

A disseminação dos vírus no interior de seus hospedeiros se dá através do movimento célula-a-célula, via plasmodesmas, e pelo movimento a longa distância como parte do fluxo de fotoassimilados, via sistema vascular (Lucas, 2006). Durante o curso da evolução dos vírus de plantas, vários mecanismos se desenvolveram permitindo que o genoma viral vencesse a barreira da parede celular da hospedeira. Nesse contexto, duas estratégias básicas são bem elucidadas: uma na qual o genoma viral se move como partícula e outra onde os ácidos nucléicos virais são transportados através dos plasmodesmas em forma de complexos ribonucleoprotéicos (RNP) (Lucas, 2006).

Como os geminivírus se multiplicam no núcleo da célula e não no citoplasma, esses vírus necessitam uma de uma etapa adicional de transporte, para efetivar a sua entrada e saída do núcleo celular (movimento intracelular; Palmer & Rybicki, 1998). A exportação da progênie de DNA (ss- e ds-DNA) do núcleo para o citoplasma é mediada pela NSP (Noueiry et al., 1994; Sanderfoot & Lazarowitz, 1995). A MP se liga

cooperativamente ao DNA de forma e tamanho específicos refletindo o estado replicativo do vírus e o tamanho do genoma. Uma interação entre MP e NSP é necessária para a transferência do DNA em complexo associado a MP que pode ser transportado através dos plasmodesmas (Sanderfoot & Lazarowitz, 1996). Essa combinação entre MP e NSP parece ser essencial para que os begomovírus explorem o sistema endógeno de suas hospedeiras (Gilbertson et al., 2003). A entrada do vírus na via de transporte a longa distância é crítica para a infecção sistêmica. A falta de capacidade do vírus para entrar no floema pode resultar em sintomas leves ou atenuados e resistência do hospedeiro à infecção sistêmica (Lucas & Gilbertson, 1994).

11. Mecanismos de diversidade genética de begomovírus

A diversidade dos vírus é gerada através de mutações, recombinações ou pseudo-recombinações (Padidam et al., 1998; Monci et al., 2002). A geração de diversidade genética em populações virais proporciona oportunidades para adaptação a novas hospedeiras e mudanças de condições ambientais (Monci et al., 2002).

As mutações são geralmente relatadas para vírus de RNA e ocorrem em menor frequência em vírus de DNA devido à atividade “proof-reading” da DNA polimerase, que corrige os erros de leitura durante a replicação (Rossinck, 1997). Foi demonstrado em MSV que mutações intra-isolados estão distribuídas pelo genoma com frequências variando de $3,8 \times 10^4$ a $10,5 \times 10^5$ enquanto que mutações inter-isolados estão em grande parte na região intergênica maior (LIR), sugerindo diferentes pressões de seleção (Isnard et al., 1998). Muitas variantes fenotipicamente indistinguíveis ocorrem naturalmente provenientes de mutações silenciosas (Harrison & Robinson, 1999).

A recombinação tem um papel crucial na evolução viral contribuindo para diversidade genética de populações de geminivírus (Umaharam et al., 1998; Padidam et al., 1999; Monci et al., 2002). A recombinação é o processo no qual segmentos de uma fita nucleotídica se incorporam a fita de outro componente durante a replicação (Seal et al., 2006). Três fatores podem contribuir significativamente para a recombinação: as infecções mistas, comuns em geminivirose, os altos níveis de replicação atingidos com a forma replicativa de DNA dupla fita e o aumento da gama de hospedeiros com a

emergência do biótipo B da mosca-branca (Padidam et al., 1999). Por recombinação, os vírus podem adquirir novas informações genéticas de outros vírus ou até mesmo das plantas hospedeiras, facilitando sua rápida evolução (Padidam et al., 1999). Os vírus também usam a recombinação como um mecanismo de resgate de mutações deletérias através da troca genética com genomas silvestres (Monci et al., 2002). A recombinação pode proporcionar vantagens seletivas na evolução dos vírus dentro dos níveis de espécie, gênero ou família. (Keese & Gibbs, 1993; Holland, 1998).

A alta fidelidade associada à replicação do DNA viral, proporcionada pela maquinaria de replicação de DNA da hospedeira, impõe certa restrição à evolução dos geminivírus. Para ultrapassar esta barreira, estes vírus dependem da recombinação e da pseudo-recombinação para desenvolver variantes para seleção (Harrison & Robinson, 1999). Para este fim, os geminivírus desenvolveram um modo de recombinação dependente da replicação de DNA (Preiss & Jeske, 2003). Nos begomovírus bipartidos, pseudo-recombinações são geralmente restritas a componentes de DNA de espécies intimamente relacionadas, isto é, do mesmo grupo filogenético, provavelmente devido a limitações impostas pela especificidade de ligação da Rep (Stanley, 1991; Harrison & Robinson, 1999). Contudo, os begomovírus parecem ter desenvolvido inúmeras maneiras para vencer essas limitações (Rojas et al., 2005).

Pseudo-recombinações ocorrem através da troca dos componentes genômicos DNA-A e DNA-B e têm sido relatada para begomovírus do novo e velho mundo (Garrido-Ramirez et al., 2000; Pita et al., 2001; Ramos et al., 2003). Ramos et al. (2003) demonstraram que *Tomato mottle Taino virus* (ToMoTV) pseudo-recombina com *Potato yellow mosaic virus* (PYMV), mas não com *Tomato mottle virus* (ToMoV), apesar deste possuir alta similaridade com a Rep e a Ren. A identidade dos íterons foi um fator crítico para a pseudo-recombinação, com os dez primeiros aminoácidos da Rep controlando alguns fatores chaves da especificidade da replicação viral (Ramos et al., 2003).

Tomato yellow spot virus (ToYSV) é um novo begomovírus descrito, originalmente isolado de tomate, mas que filogeneticamente é próximo aos vírus de *Sida* sp. (SiMoV, SimMV e SiYMV). Estudos para determinar a viabilidade de pseudo-recombinantes formados entre componentes de DNA de ToYSV e outros begomovírus

que infectam tomate e plantas daninhas no Brasil revelaram que o ToYSV foi capaz de formar pseudo-recombinantes viáveis com vírus de tomate mas não com os vírus de *Sida* sp. apesar de ser filogeneticamente mais próximo a estes (Andrade et al., 2006). Um pseudo-recombinante infeccioso formado entre DNA-A de ToYSV e DNA-B de Tomato crinkle leaf yellows virus (TCrLYV) induziu sintomas severos em *Nicotiana benthamiana*. Isso foi atribuído, pelo menos em parte, ao fato de que as origens de replicação dos dois componentes possuíam seqüências idênticas (íterons) de ligação com a Rep. No entanto, esse não foi o caso para a formação de outro pseudo-recombinante infeccioso formado pelo DNA-A de TGMV e o DNA-B de ToYSV, que possuem seqüências de ligação com a Rep diferentes. Esses resultados reforçam a noção de que a formação de pseudo-recombinantes não pode ser explicada somente com base nas relações filogenéticas e nas seqüências conservadas de íterons, e sugere que a proteína Rep de TGMV pode ser mais versátil no reconhecimento de componentes de DNA heterólogo do que o ToYSV (Andrade et al., 2006). Resultados similares foram obtidos com pseudo-recombinantes entre *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) e *Chino del tomate virus* (CdTV), que possuem regiões comuns e íterons divergentes (Garrido-Ramirez et al., 2000). Um pseudo-recombinante entre o DNA-A de CdTV e o DNA-B de BGYMV foi viável em *N. benthamiana* e induziu sintomas suavemente atenuados quando comparados aos tipos parentais. A assimetria observada entre os pseudo-recombinantes recíprocos levou os autores a concluir que a proteína Rep de CdTV é mais versátil e pode reconhecer e replicar um componente de DNA com região comum divergente (Garrido-Ramirez et al., 2000).

Recentemente foram identificados recombinantes infectando mandioca na África (Zhou et al., 1997), algodão no Paquistão (Zhou et al., 1998), pimentão do México (Torres-Pacheco et al., 1993) e tomate na América Central (Umaharan et al., 1998), Espanha (Monci et al., 2002) e Brasil (Inoue-Nagata et al., 2006). Tais relatos evidenciam que recombinações interespecíficas têm originado uma significativa diversidade entre os begomovírus (Padidam et al., 1999).

12. Escopo da Dissertação

O mosaico do quiabeiro era encontrado com frequência no Brasil na década de 1960 (Kitajima et al., 1979). Acreditava-se que esta doença era causada por um begomovírus, contudo sua etiologia não foi confirmada (Nagai, 1993). Nesse contexto, esta dissertação teve como objetivo detectar e caracterizar biológica e molecularmente o agente etiológico do mosaico do quiabeiro. O objetivo do capítulo 2 foi verificar a ocorrência de begomovírus em quiabeiro no Distrito Federal e no estado de Goiás, trazendo o primeiro relato confirmado de um begomovírus infectando quiabeiro no Brasil. O Capítulo 3 objetivou caracterizar biológica e molecularmente clones de begomovírus de isolados de quiabeiro provenientes do estado de Goiás. O capítulo 4 elucidou a seqüência genômica completa de clones de uma nova espécie de begomovírus infectando quiabeiro no Brasil.

Capítulo 2

Primeiro relato confirmado de um begomovírus infectando quiabeiro no Brasil

O mosaico do quiabeiro foi uma virose importante na produção brasileira de quiabo (*Abelmoschus esculentus*) durante a década de sessenta, porém sua importância diminuiu após a introdução da cultivar resistente ‘Santa Cruz 47’ (Nagai, 1993). Acreditava-se que o mosaico do quiabeiro era causado por um begomovírus, contudo sua etiologia ainda não foi confirmada.

O objetivo desse trabalho foi verificar a ocorrência de begomovírus em quiabeiro no Distrito Federal e no estado de Goiás. Entre abril de 2007 e fevereiro de 2008 foram visitados campos de produtores de quiabo em Brazlândia (DF), Alexandre Gusmão (DF), Goianápolis (GO) e Nova Veneza (GO). Além da coleta de amostras foliares de plantas com manchas cloróticas ou mosaico (Figura 1a) foram coletadas ao acaso amostras de plantas assintomáticas, resultando em um total de 108 amostras.

O DNA total foi extraído das 108 amostras foliares utilizando o método CTAB (Doyle & Doyle, 1987). Em seguida, o DNA total foi submetido a PCR utilizando primers universais para begomovírus (pAR1c496 e pAL1v1978; Rojas *et al.*, 1993). Três amostras (# 5157, # 6319 e # 6328) mostraram-se positivas, produzindo um fragmento de DNA de aproximadamente 1,4 kb. O DNA viral da amostra # 5157 foi amplificado via ciclo rolante (Inoue-Nagata *et al.*, 2004), utilizando o TempliPhi Amplification Kit de acordo com as instruções do fabricante (Amersham Biosciences). O produto da amplificação foi submetido ao seqüenciamento em seqüenciador automático (ABI 3100) com o primer pAR1c496 (Rojas *et al.*, 1993).

O DNA viral dos isolados 5157, 6319 e 6328 foi amplificado via ciclo rolante (Inoue-Nagata *et al.*, 2004), utilizando o TempliPhi Amplification Kit de acordo com as instruções do fabricante (Amersham Biosciences). O DNA amplificado de cada um dos três isolados foi inoculado através do bombardeamento de partículas de tungstênio em 24 plantas de quiabeiro cultivar Santa Cruz 47, segundo o método proposto por Rech &

Aragão (1998). A avaliação da infecção das plantas inoculadas foi realizada com PCR usando primers universais para begomovírus três semanas após a inoculação.

Plantas de quiabeiro tornaram-se infectadas quando inoculadas por bombardeamento com os três isolados. Das 24 plantas bombardeadas, 4 tornaram-se infectadas (Tabela 1). Tal resultado foi confirmado por PCR, demonstrando que os três isolados são infectivos em quiabeiros da cultivar Santa Cruz 47. As plantas infectadas eram assintomáticas ou apresentavam manchas cloróticas, mosqueado e leve bolhosidade (Figura 1b).

O produto de PCR da amostra # 5157 seqüenciada apresentava 646 nucleotídeos, com 85,54% de identidade com a seqüência nucleotídica do DNA-A de *Sida micrantha mosaic virus* A2B2 (NC_005330). Este é o primeiro relato confirmado de um begomovírus infectando quiabeiro no Brasil.

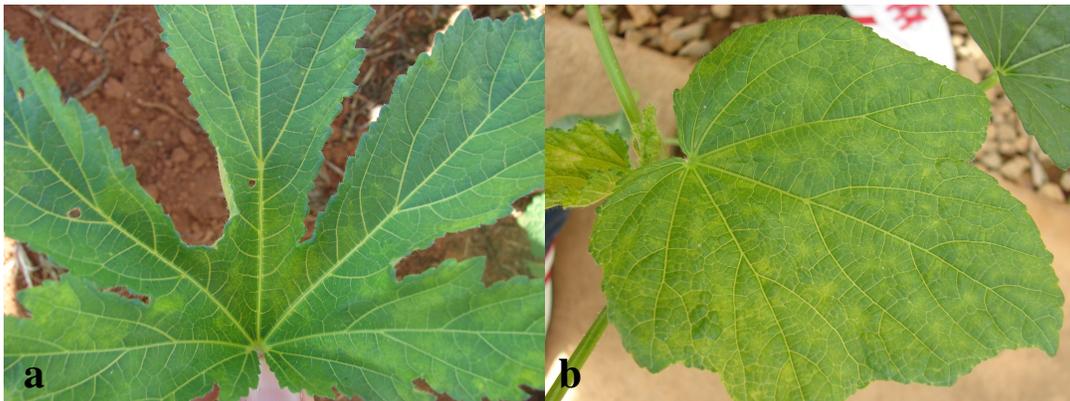


Figura 1. a) folha de quiabeiro com manchas cloróticas em uma plantação comercial de quiabo; **b)** quiabeiro bombardeado com DNA viral amplificado do isolado 6328 mostrando manchas cloróticas, mosqueado e leve bolhosidade.

Tabela 1. Infecção das plantas de quiabeiro cv. Santa Cruz 47 bombardeados com DNA viral amplificado.

DNA bombardeado	Positivos*	Sintomas**
Isolado 5157	1/8	MC
Isolado 6319	1/8	SS
Isolado 6328	3/8	MC, Mo, LB ou SS

*Número de plantas infectadas (PCR positivas) / número de plantas inoculadas.

**MC = manchas cloróticas; Mo = mosqueado; LB = leve bolhosidade; SS = sem sintomas.

Capítulo 3

Caracterização molecular e biológica de um begomovírus infectando quiabeiro no Brasil

1. Introdução

Os begomovírus são considerados um grupo emergente de vírus de plantas, devido a sua alta incidência e a severidade das doenças causadas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo durante as três últimas décadas (Polston & Andreson, 1997; Morales & Anderson, 2001; Briddon, 2003). Os begomovírus pertencem à família *Geminiviridae*, possuem genoma de DNA circular fita simples encapsidado em partícula geminada e são transmitidos pela mosca-branca *Bemisia tabaci* (Fauquet & Stanley, 2005). A maioria dos begomovírus possui genoma bipartido consistindo de dois componentes (DNA-A e DNA-B) que possuem de 2,5 a 3 kb cada (Rojas et al., 2005).

Nos últimos anos, doenças provocadas por begomovírus estão surgindo em culturas economicamente importantes como tomate, pimentão, mandioca, feijão e algodão, causando perdas significativas de produção. Devido à sua importância econômica e à facilidade na clonagem do seu genoma, muitos geminivírus têm sido isolados e caracterizados (Faria et al., 2000; Morales & Anderson, 2001; Fauquet et al., 2003; Assunção et al., 2006).

Até a década de 1970 o mosaico do quiabeiro era uma virose importante na produção brasileira de quiabo (*Abelmoschus esculentus*), entretanto após a introdução da cultivar resistente ‘Santa Cruz 47’ sua importância diminuiu (Nagai, 1993). Acreditava-se que o mosaico do quiabeiro era causado por um begomovírus (Sudo, 1974; Nagai, 1993), no entanto, não foram realizados estudos que identificassem o vírus causador desta doença e até hoje sua etiologia permanece obscura. Estudos adicionais que permitam o isolamento deste vírus de plantas de quiabeiro e possibilitem a confirmação do agente etiológico deste mosaico são necessários. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi caracterizar biológica e molecularmente o vírus causador do mosaico do quiabeiro.

2. Material e Métodos

2.1. Fonte de vírus

O DNA viral do isolado 5157 (Capítulo 2) foi proveniente de amostra de quiabeiro com manchas cloróticas, coletada em abril de 2007, em campo produtor de quiabo na cidade de Goianópolis (GO). O DNA total foi extraído da amostra foliar e submetido a PCR com primers universais para begomovírus (pAR1c496 e pAL1v1978; Rojas *et al.*, 1993).

2.2. Amplificação do genoma viral por RCA e digestão com enzimas de restrição

O DNA total do isolado 5157 foi amplificado via ciclo rolante (RCA, Inoue-Nagata *et al.*, 2004) utilizando o TempliPhi Amplification Kit de acordo com as instruções do fabricante (Amersham Biosciences). O DNA viral amplificado foi digerido separadamente com dez enzimas de restrição (ApaI, BamHI, ClaI, EcoRV, HindIII, KpnI, PstI, SacI, SacII e SalI) para selecionar quais as enzimas capazes de clivar o DNA em um único ponto. As reações de digestão foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante das enzimas (Promega, Gibco, Invitrogen ou Pharmacia) e incubadas em banho-maria a 37°C “overnight”. Os produtos da digestão foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 0,5X e corado com brometo de etídeo.

O gel de agarose contendo o DNA do isolado 5157 digerido pelas enzimas de restrição foi transferido e fixado a uma membrana de náilon carregada positivamente (Hybond N+, Amersham Biosciences) conforme Sambrook *et al.* (1989). Em seguida, a membrana foi hibridizada com sonda não radioativa (digoxigenina), gerada a partir de PCR, específica para detectar DNA-A conforme descrito por Santana *et al.* (2007).

2.3. Clonagem e purificação plasmidial

Após a escolha da enzima de restrição ClaI para a clonagem do DNA-A e SacI para o DNA-B, procedeu-se a digestão do DNA amplificado por RCA do isolado 5157, seguida de precipitação e ligação com vetor pBluescript SK+ (Stratagene). Este vetor havia sido anteriormente digerido com a enzima de restrição ClaI para o clonar o DNA-A

e com a enzima SacI para clonar o DNA-B. Os vetores digeridos foram então desfosforilados com a enzima fosfatase alcalina (CIAP, Invitrogen) conforme descrito por Sambrook et al. (1989). A ligação inserto-vetor ocorreu a 16° C “overnight” com uso da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen). A transformação por eletroporação (eletroporador BIO-RAD) foi realizada com células competentes *Escherichia coli* XL-1 blue conforme recomendação do fabricante. As células transformadas foram plaqueadas em meio de cultura LB com ampicilina e incubadas a 37° C por aproximadamente 16 horas. As colônias recombinantes, de coloração branca, foram transferidas individualmente para tubos de ensaio contendo meio de cultura LB líquido com ampicilina e mantidas a 37° C com agitação por aproximadamente 16 horas. A purificação plasmidial foi realizada conforme descrito por Sambrook et al. (1989) e a presença do inserto do DNA-A ou DNA-B foi confirmada através da digestão dos clones com a enzima de restrição utilizada na clonagem, verificando o tamanho do fragmento esperado para o inserto.

2.4. Determinação da seqüência genômica e análise de seqüência

Os clones selecionados para determinação da seqüência nucleotídica foram purificados em coluna QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Para o sequenciamento utilizou-se o seqüenciador automático (ABI 3100) com os primers listados na tabela 1. As seqüências obtidas foram analisadas pelo algoritmo Blast disponível online (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). As seqüências foram montadas e analisadas utilizando o programa Staden 4 (Staden et al., 2003) e depositadas no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/index.html>). A análise filogenética foi realizada utilizando a seqüência nucleotídica completa do DNA-A do isolado 5157, dezessete seqüências de begomovírus brasileiros e duas seqüências de begomovírus que infectam quiabeiro no México. A análise referente ao DNA-B foi realizada com a seqüência completa do isolado 5157 e com quinze seqüências de begomovírus brasileiros disponíveis (Tabela 2). As análises filogenéticas foram realizadas através do programa Mega 4 (Tamura et al., 2007) após alinhamento com Clustal W

(www.ebi.ac.uk/clustalw/), utilizando o método de Neighbour Joining em análise “bootstrap” com 1000 repetições.

Tabela 1. Primers utilizados no seqüenciamento completo dos clones do isolado 5157.

Primer	Seqüência (5' – 3')¹
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG
T7	CGGGATATCACTCAGCATAATG
PAL1v1978	GCATCTGCAGGCCACATYGTCTTYCCNGT
PAL1c715	GATTTCTGCAGTTDATRRTTYTCRTCCATCCA
496R	GGCTTYCTRRTACATRGG
733F	GCATCTGCAGGGATGGANGANAANATNAA
M13F	GTAAAACGACGGCCA
301R	CTTCCTGTACATGGGCCTGT
390F	CCCATGTATAGGAAGCCC
990F	ATGGCATGTACTCATG
1630R	CGAGGGGGCCAGCTATAAA
1996	GCATCTGCAGACNNGRAAGACRATGTGGGC
CRC2R	CTAGCTGCAGCATATTTACRARWATGCC
B580F	GTGTACTAGTCAGTT TG
B650R	GTTAGGATTACTGGGTTCGTC
B900F	TCTCTCTCGTTGTTGTTGTG
B1100F	CGAACATAAGCAAGAACGCC
B1150F	CATGTAATGGNGTWTATG
B1200F	CCCCTGCAGTAYTAYTGYTGGATGTC
B1590F	TTTAATTTCTATTGGG
B1600F	TGACCTCGATTATGTTGG
B1850R	AAAGACCCDATWCCNTGG
B1950F	CGATAATTTTCAGCTTTCCC
B2500F	GTTTCTGTGGATGGTGAAAG

¹Nucleotídeos nas posições degeneradas são representadas por uma única letra do código de ambigüidade da IUPAC como segue: **Y**= C ou T; **N**= A,C,T ou G; **R**= A ou G; **D**= A,T ou G; **K**= G ou T; **M**= A ou C; **W**= A ou T.

2.5. Círculo de hospedeiras

Para determinar o círculo de hospedeiras dos clones, 17 espécies de plantas pertencentes a cinco famílias botânicas foram inoculadas através do bombardeamento de partículas de tungstênio segundo o método proposto por Rech & Aragão (1998). A obtenção do DNA para o bombardeamento foi feita através da digestão do clone 15 (DNA-A) com a enzima de restrição ClaI e do clone 1 (DNA-B) com SacI. Os produtos da digestão foram visualizados em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X. Os fragmentos de DNA de tamanho de 2,6 Kb foram eluídos do gel e posteriormente recircularizados com a enzima T4 DNA ligase a 16° C “overnight”. A ligação foi amplificada via círculo rolante (phi29 DNA polymerase, NEB) obtendo-se uma maior quantidade de DNA para inoculação nas plantas hospedeiras. Os produtos amplificados foram digeridos com as enzimas específicas para confirmação do tamanho do inserto. O material para bombardeamento por biobalística (Rech e Aragão, 1998) foi preparado contendo aproximadamente 1 µg do RCA do DNA-A (clone 15) e 1 µg do DNA-B (clone 1). Três semanas após a inoculação foi feita a extração do DNA (Doyle & Doyle, 1987) das plantas bombardeadas seguida de PCR com primers universais para begomovírus. Para confirmação da boa qualidade do DNA extraído, foi realizada PCR utilizando primers de amplificação do genoma de cloroplasto *ndhB* (9F e 13R; Graham & Olmstead, 2000).

3. Resultados

3.1. Clonagem do DNA viral do begomovírus da amostra 5157

O DNA viral da amostra #5157 foi amplificado por RCA e digerido com dez enzimas de restrição para se determinar as enzimas que cortam o DNA viral em apenas um ponto (Figura 1). Apenas as enzimas ClaI, HindIII e SacI (Figura 1, colunas 4, 6 e 9, respectivamente) clivaram o DNA em provavelmente um único ponto gerando o fragmento de tamanho esperado de aproximadamente 2,6 kb. As enzimas ApaI, BamHI e EcoRV digeriram o DNA viral em mais de um ponto, originando fragmentos menores que o esperado (Figura 1, colunas 2, 3 e 5, respectivamente). As enzimas KpnI, PstI,

SacII e Sall aparentemente não digeriram o DNA da amostra 5157 (Figura 1, colunas 7, 8, 10 e 11, respectivamente).

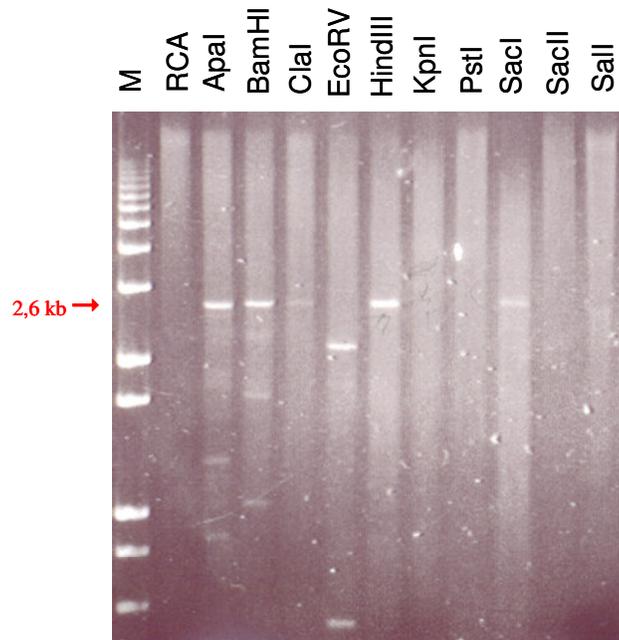


Figura 1. Padrão eletroforético do DNA corado com brometo de etídeo. Coluna 1) DNA da amostra 5157 amplificado por RCA. Digestão do DNA amplificado com as seguintes enzimas de restrição: 2) ApaI, 3) BamHI, 4) ClaI, 5) EcoRV, 6) HindIII, 7) KpnI, 8) PstI, 9) SacI, 10) SacII e 11) Sall. M: marcador 1kb plus (Invitrogen).

A hibridização com sonda específica para DNA-A permitiu analisar qual componente foi digerido pelas enzimas utilizadas. Dessa forma, verificou-se que as enzimas ClaI e SacI digeriram o DNA-A e o DNA-B, respectivamente, em um único ponto (dados não mostrados).

Cada componente genômico foi ligado ao seu vetor e procederam-se as transformações. Vinte e quatro colônias recombinantes do DNA-A e seis do DNA-B foram selecionadas para a extração plasmidial seguida de digestão com a enzima de restrição específica para cada componente genômico. Oito clones de DNA-A e dois de DNA-B apresentaram o padrão de bandas esperado após a digestão. Duas colônias recombinantes de cada componente genômico (clones 15 e 24 do DNA-A e clones 1 e 5

do DNA-B) contendo os fragmentos de DNA esperados de 3kb, correspondentes ao vetor, e de 2,6kb, correspondente ao inserto, foram selecionadas para purificação e posterior seqüenciamento (Figura 2). Como houve alta porcentagem de identidade de seqüência entre os clones do mesmo DNA, foi escolhido apenas um clone de cada componente genômico para análise (clone 15 para o DNA-A e clone para o DNA-B).

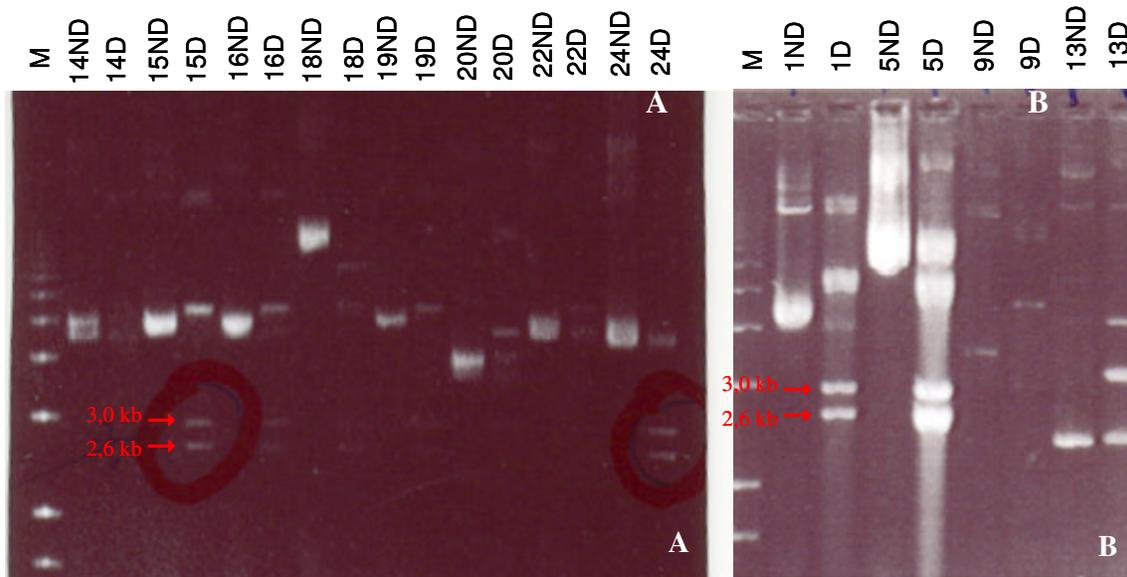


Figura 2. Eletroforese do DNA plasmidial para seleção dos clones recombinantes. **A)** Digestão dos clones de DNA-A com a enzima ClaI. Os clones 15, 16, 18, 19 e 24 apresentaram tamanhos de fragmentos de DNA esperados, 3kb (vetor) e 2,6kb (inserto) **B)** Digestão dos clones de DNA-B com a enzima SacI. Os clones 1 e 5 apresentaram tamanhos de fragmentos de DNA esperados, 3kb (vetor) e 2,6kb (inserto). ND: DNA não digerido; D: DNA digerido com enzima de restrição.

3.2. Análise da seqüência genômica

As sequencias genômicas obtidas foram depositadas no GenBank e receberam os seguintes números de acesso: EU908733 (clone 15, DNA-A) e EU908734 (clone 1, DNA-B). O seqüenciamento completo dos clones 15 (DNA-A) e 1 (DNA-B) do isolado 5157 mostrou que este vírus possui características típicas dos begomovírus bipartidos do novo mundo. O DNA-A e o DNA-B possuem 2684 e 2653 nucleotídeos, respectivamente. O DNA-A possui uma ORF no sentido viral (AV1) e quatro no sentido

complementar (AC1, AC2, AC3 e AC4). O DNA-B possui duas ORFs, uma no sentido viral (BV1) e outra no sentido complementar (BC1) (Figura 3). Ambos os componentes possuem a região intergênica (RI). Nesta região, o DNA-A e DNA-B apresentam uma região comum (RC, Figura 3) com 180 nucleotídeos apresentando 97% de identidade. A RC de ambos os componentes, contém a seqüência TAATATT↓AC característica de todos os geminivírus, considerada a origem da replicação viral.

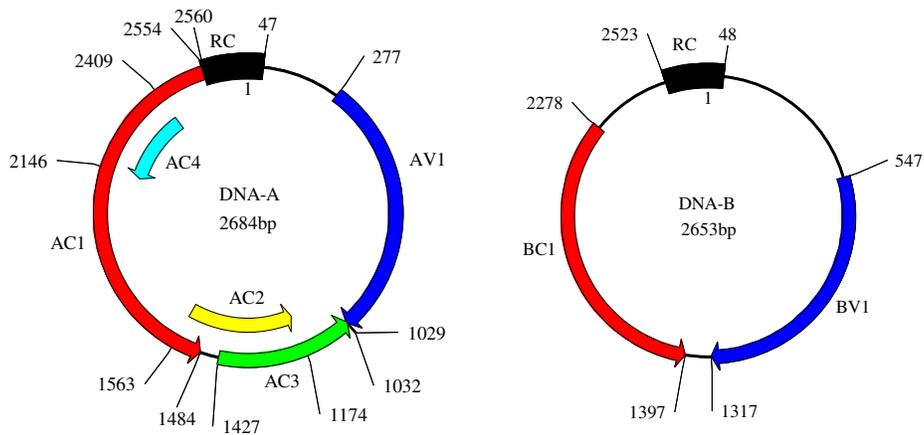


Figura 3. Organização genômica dos clones 15 (DNA-A) e 1 (DNA-B) do isolado 5157. As setas indicam a direção das ORFs no sentido viral (V) e complementar (C). As posições numeradas indicam o códon iniciador e o códon de parada de cada ORF. O nucleotídeo número 1 localizado dentro da região intergênica representa o sítio de clivagem (↓) na seqüência TAATATT↓AC.

A seqüência nucleotídica do DNA-A do isolado 5157 foi comparada com dezessete seqüências de begomovírus brasileiros disponíveis online e duas seqüências de begomovírus de quiabo não relatados no Brasil (OYMMV e OYMoIV), enquanto que a do DNA-B, foi comparada com quinze seqüências de begomovírus brasileiros (Tabela 2). O vírus que apresentou maior identidade de seqüência completa com o DNA-A do isolado 5157 foi o SimMV com 94,12% de identidade, e com o DNA-B foi o SimMV-B1, com 90,26% (Tabela 2).

Quando ORFs individuais foram comparadas, o isolado 5157 apresentou maior identidade de sequência nucleotídica com SimMV-A2B2 (95,11%) para AV1, sendo esta ORF a mais conservada entre os begomovírus listados. As ORFs AC1, AC2, AC3, AC4 e BC1 também apresentaram maior identidade de sequência com as respectivas ORFs do SimMV-A2B2 (94,43%; 88,33%; 96,24%; 93,56 e 94,78%, respectivamente). A ORF BV1 apresentou maior identidade com a sequência do isolado B1 de SimMV. Aparentemente, o DNA-B do isolado 5157 é mais relacionado ao B1 do que ao B2 de SimMV. Porém, a sequência correspondente ao gene BC1 é mais semelhante ao B2, o que sugere uma possível recombinação entre essas moléculas.

Tabela 2. Porcentagem de identidade de nucleotídeos do DNA-A e DNA-B do isolado 5157 (completo e ORFs individuais) com outros begomovírus.

Vírus [isolado] ¹	DNA-A (%)	DNA-B (%)	ORF individual						
			AV1	AC1	AC2	AC3	AC4	BV1	BC1
SimMV [A2B2]	94,12	88,87	95,11	94,43	88,33	96,24	93,56	89,11	94,78
ToLDV	81,17	ND	94,05	79,10	86,15	86,47	87,88	ND	ND
SiMoV	80,97	ND	90,08	76,77	87,44	87,72	41,67	ND	ND
SimMV [A1B3]	80,86	68,37	89,68	77,22	80,77	87,22	78,79	78,21	77,10
ToYSV	80,64	67,17	87,83	78,53	83,33	84,96	ND	76,52	76,44
TMMV	79,24	67,20	85,05	80,66	83,08	84,46	87,50	76,01	78,34
SiYMV	78,68	ND	89,17	74,40	86,51	87,31	71,21	ND	ND
SiYLCV	76,04	ND	90,05	68,14	85,13	85,96	34,60	ND	ND
ToRMV	75,93	65,27	83,47	75,02	80,00	80,70	16,05	78,21	81,29
OYMMV	75,74	ND	86,11	75,69	81,03	83,96	80,68	ND	ND
SiCoMV	75,26	ND	88,23	67,93	78,97	81,95	75,38	ND	ND
OYMoIV	75,08	ND	85,71	74,95	80,26	83,46	82,58	ND	ND
ToSRV	75,07	65,11	81,48	78,33	79,74	81,20	50,76	78,73	81,18
TGMV	74,75	59,43	81,75	76,69	78,21	79,45	84,85	72,63	49,66
BGMV	73,77	59,61	81,48	72,38	80,77	81,45	ND	68,48	74,38
ToCMoV	72,45	60,94	84,13	70,84	80,26	81,95	65,46	72,24	72,00
ToYVSV	71,27	59,63	80,69	72,93	79,23	80,20	66,67	72,76	73,81
TCoMV	69,69	58,99	84,52	66,42	81,28	82,96	30,03	70,95	72,45
BYSV	69,27	58,42	82,14	67,32	78,79	81,45	67,02	67,79	73,13
SimMV [B1]	ND	90,26	ND	ND	ND	ND	ND	89,62	87,73
TCrLYV	ND	62,24	ND	ND	ND	ND	ND	72,63	72,20
ToMLCV [Uber]	ND	61,73	ND	ND	ND	ND	ND	74,58	72,90

¹Numero de acesso no banco de dados: SimMV [*Sida micrantha mosaic virus* – NC_005330 (DNA-A) e NC_005331 (DNA-B)], ToLDV [Tomato leaf distortion virus – EU710749 (DNA-A)], SiMoV [*Sida mottle virus* – NC_004637 (DNA-A)], SimMV-A1B3 [*Sida micrantha mosaic virus* isolado A1B3 – AJ_557450 (DNA-A) e AJ_557454 (DNA-B)], ToYSV [*Tomato yellow spot virus* - NC_007726 (DNA-A) e NC_007727 (DNA-B)], TMMV [Tomato mild mosaic virus – NC_010833 (DNA-A) e NC_010834 (DNA-B)], SiYMV [*Sida yellow mosaic virus* – NC_004639 (DNA-A)], SiYLCV [*Sida yellow leaf curl virus* – EU_710750 (DNA-A)], ToRMV [*Tomato rugose mosaic virus* – NC_002555 (DNA-A) e NC_002556 (DNA-B)], OYMMV [*Okra yellow mosaic México virus* – DQ_022611 (DNA-A)], SiCoMV [*Sida commom mosaic virus* – EU_710751 (DNA-A)], OYMoIV [*Okra yellow mottle Iguala virus* – AY_751753], ToSRV [*Tomato severe rugose virus* – NC_009607 (DNA-A) e NC_009612 (DNA-B)], TGMV [*Tomato golden mosaic virus* – NC_001507 (DNA-A) e NC_001508 (DNA-B)], BGMV [*Bean golden mosaic virus* – NC_004042 (DNA-A) e NC_004043 (DNA-B)], ToCMoV [*Tomato chlorotic mottle virus* – NC_003664 (DNA-A) e NC_003665 (DNA-B)], ToYVSV [Tomato yellow vein streak virus – NC_010949 (DNA-A) e NC_010950 (DNA-B)], TCoMV [Tomato commom mosaic virus – NC_010835 (DNA-A) e NC_010836 (DNA-B)], BYSV [*Blainvillea yellow spot virus* – NC_010837 (DNA-A) e NC_010838 (DNA-B)], SimMV-B1 [*Sida micrantha mosaic virus* isolado B1 – AJ_557452 (DNA-B)], TCrYLV [Tomato crinkle leaf yellows virus – AY_090556 (DNA-B)], ToMLCV-Uber [Tomato mild leaf curl virus isolado Uberlândia – DQ_336352 (DNA-B)]. ND = seqüência não disponível.

A análise de múltiplos alinhamentos da RC do DNA de begomovírus brasileiros demonstram que o isolado 5157 compartilha com SimMV-A2B2, SiYMV, SiCoMV e ToLDV a mesma seqüência provável de íteron GGGG (Figura 4 destacado em rosa). Este isolado apresenta a seqüência de nove nucleotídeos (TAATATT!AC; destacada em verde) típica dos geminivírus, contudo não apresenta a região rica em G, denominada G Box (destacada em azul), encontrada em muitos vírus de tomate e feijão. Esta região rica em G também não é encontrada nos vírus de SimMV isolados A1B3, A2B2 e B1.

BYSV	TATA-GTATTGGAG--ATTGGGG-ACAA	TATATA	TGC	2605
BGMV	TCTATGAATCGGTG-TAATGGTG-CCAA	TATATA	-GT	2565
ToCMoV	TAAAGCAATTGGGG--ACTGGGGTCCTA	TATATA	-CT	2561
ToSRV	CATATCAATTGGTAGTTATGGTAGCTCT	TATATA	AGTA	2541
ToRMV	CATATGAATTGGTAGTTATGGTAGCTCT	TATATA	ACTA	2570
TGMV	TATATGAATTGGTAGTAA-GGTAGCTCT	TATATA	ATTA	2547
ToYVSV	CAAATGAATTGGGG-AAA-GGGTCTCAA	TATATA	AGTA	2510
5157A	-ATATGATTGGGGTAAA-GGGG-ACAA	TATATA	AGTA	2642
5157B	-ATATGATTGGGGTAAA-GGGG-ACAA	TATATA	AGTA	2611
SimMV-A2B2	-ATATGAATTGGGGTAAAT-GGGG-ACAA	TATATA	AGTA	2633
TMMV	-ATATGAATCGGTGTAT--GGGTACAA	TATATA	AGTA	2661
TCoMV	-CTATTTGCTGGTGCCT-GGTGTCCT	TATA	ACTA	2510
SiYLCV	-ATATTTTCTGGTGCCT-GGTGTCCT	TATA	ACTA	2614
SiMoV	CTATGAAATTGGAG-TAT-GGAGTACAA	TATATA	AGTA	2627
SimMV-A1B3	TCTATGAATTGGAG-TAT-GGAGTACAA	TATATA	ATGA	2617
ToYSV	CTTATGAATTGGTGACATTGGTGACAA	TATATA	ACTA	2633
SiYMV	GAA-----CTGGGGACT--GGGGTCT	TATTATAGCA		2611
SiCoMV	T-CATGAATTGGGGGAACTGGGGGAACT	TATATA	-TG	2636
ToLDV	TATATGAATTGGGGTAA-TGGGGTACAA	TATATA	AGTA	2595
SimMV-B1	TATGAAT--CGGTAGTTATGGTAGCTCT	TATATA	ACTA	2610
BYSV	GTCCCTACACCC-TTGC-GGCCCTCAGTATA	TAATATT		2666
BGMV	TAG-----ACACGTGGC-GGCCATCCGC	TATAATATT		2617
ToCMoV	TCGTTACACACACGTGGC-GGCCATCCGT	TATAATATT		2622
ToSRV	-----TACACGTGGC-GGCCATCCGT	TATAATATT		2593
ToRMV	-----TACACGTGGCCGGCCATCCGA	TATAATATT		2622
TGMV	-----CACGTGGC-GGCCATCCGT-T	TAATATT		2588
ToYVSV	-----CCACGTGGC-GGCCATCCGT	TATAATATT		2561
5157	-----A-----GC-GGCCATCCGC	AC	TAATATT	2684
SimMV-A2B2	-----A-----GC-GGCCATCCGC	AC	TAATATT	2675
TMMV	-----ACACGTGGC-GGCCATCCGT---	TAATATT		2708
TCoMV	-----GGCAAAGC-GGCCATCCAT--	ATAATATT		2560
SiYLCV	-----GGCAAAGC-GGCCATCCAT--	ATAATATT		2664
SiMoV	-----GCACGTGGC-GGCCATCCGT--	C	TAATATT	2668
SimMV-A1B3	-----GCATAAAGC-GGCCATCCGT-TC	TAATATT		2659
ToYSV	-----TCCTATAGC-GGCCATCCGT--	A	TAATATT	2674
SiYMV	-----ACACGTGGC-GGCCATCCGC	TA	TAATATT	2661
SiCoMV	-----CCACGTGGC-GGCCATCCGC	TA	TAATATT	2687
ToLDV	-----GCACGTGGC-GGCCATCCG--	TATA	TAATATT	2645
SimMV-B1	---AAGGGCTTA-AAGC-GGCCATCCGC	AC	TAATATT	2652

Figura 4. Alinhamento da seqüência de parte da região comum do DNA do isolado 5157 com outros begomovírus brasileiros. As seqüências coloridas em rosa correspondem a íterons. O TATA box está destacado em amarelo, as seqüências TAATATT↓, em verde, e o G Box, em azul.

A análise filogenética utilizando seqüências nucleotídicas completas de DNA-A do isolado 5157 e dos begomovírus listados na tabela 2 mostrou que o isolado 5157 agrupa com o SimMV-A2B2 (Figura 5). As seqüências foram divididas em três agrupamentos principais. O primeiro inclui todos os vírus descritos de *Sida* e quatro vírus de tomate (ToLDV, TCoMV, ToYSV e TMMV), o segundo inclui os begomovírus que infectam quiabo no México e o terceiro, abriga os demais vírus de tomate, além de BGMV e BYSV.

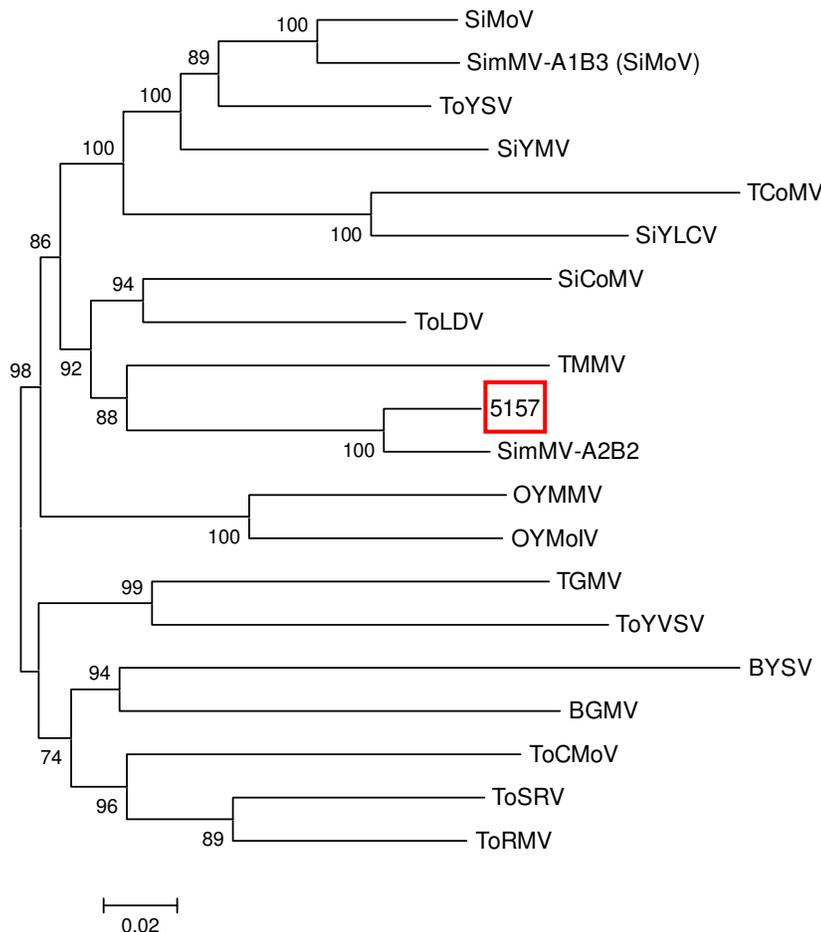


Figura 5. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento das seqüências completas de nucleotídeos do DNA-A dos vírus relacionados na Tabela 2. A árvore foi obtida pelo programa Mega 4 (Tamura et al., 2007), alinhamento Clustal W, utilizando o método de Neighbour Joining em análise “bootstrap” com 1000 repetições. A barra horizontal indica o valor de substituições por sítio.

A análise filogenética utilizando seqüências nucleotídicas completas de DNA-B do isolado 5157 e dos 15 begomovírus brasileiros mostrou que os isolados B1 e B2 de SimMV se agruparam, estando o 5157 mais próximo deste agrupamento (Figura 6).

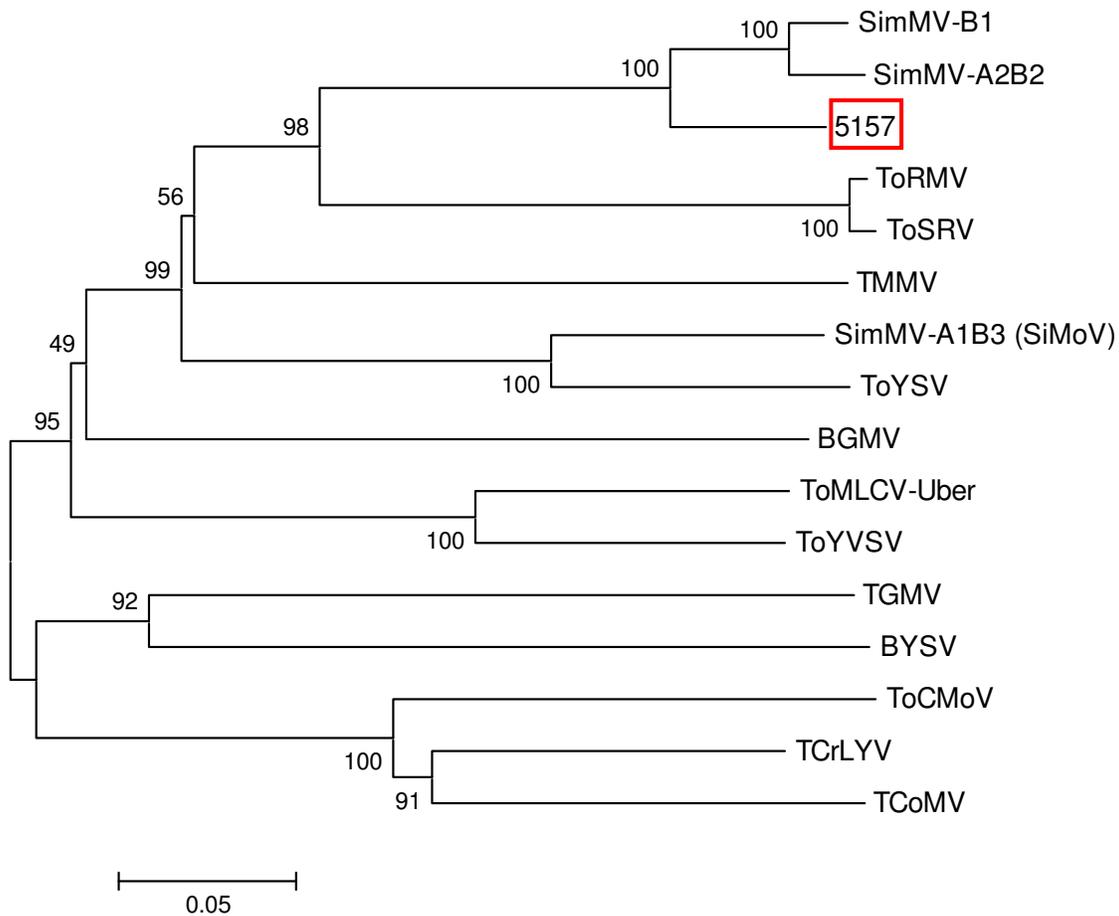


Figura 6. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento das seqüências completas de nucleotídeos do DNA-B dos vírus relacionados na Tabela 2. A árvore foi obtida pelo programa Mega 4 (Tamura et al., 2007), alinhamento Clustal W, utilizando o método de Neighbour Joining em análise “bootstrap” com 1000 repetições. A barra horizontal indica o valor de substituições por sítio.

3.3. Círculo de hospedeiras

Para a obtenção de DNA viral infeccioso necessário para a determinação do círculo de hospedeiras, o clone 15 do DNA-A (Figura 7A) e o clone 1 do DNA-B (Figura 7B)

foram digeridos com suas respectivas enzimas de restrição e seu produto visualizado em gel de agarose, resultando em um fragmento de 3 kb, correspondente ao vetor, e outro de 2,6 kb, correspondente ao inserto. O fragmento de 2,6 kb foi eluído (DNA-A figura 7C e DNA-B figura 7D), recircularizado e amplificado via RCA. O produto desta amplificação foi digerido para confirmação de seu tamanho e utilizado para biobalística das plantas hospedeiras.

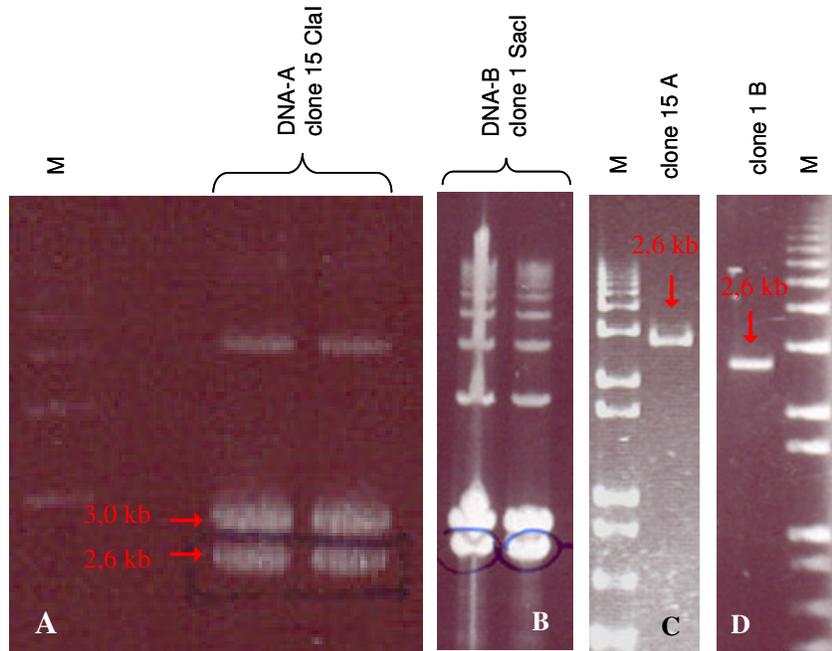


Figura 7. Perfil eletroforético de DNA dos clones. **A)** clone 15 (colunas 1 e 2) de DNA-A digeridos com a enzima de restrição ClaI, mostrando os fragmentos de 2,6 kb (inserto) e 3 kb (vetor); **B)** clone 1 de DNA-B (colunas 1 e 2) digerido com a enzima de restrição SacI, mostrando os fragmentos de 2,6 kb (inserto) e 3 kb (vetor); **C)** Fragmentos de 2,6 kb eluídos do clone 15 de DNA-A; **D)** fragmento de 2,6 kb eluído do clone 1 de DNA-B. M: marcador 1kb plus (Invitrogen).

Os clones 15 (DNA-A) e 1 (DNA-B) recircularizados e introduzidos por bombardeamento nas plantas foram capazes de infectar dez espécies de plantas (Tabela 3). As plantas de quiabo da cultivar Santa Cruz 47 bombardeadas com os clones infectivos apresentaram-se assintomáticas. Dentre as 98 plantas bombardeadas desta

cultivar apenas uma foi positiva para PCR com primers universais de begomovírus. As plantas de quiabeiro da cultivar Clemson 80 apresentaram manchas cloróticas (Figura 8A) porém, apenas uma foi PCR positiva. Sete das doze plantas de *Sida santaremnensis* inoculadas apresentaram forte mosaico e deformação foliar leve (Figura 8B), resultado que foi confirmado por PCR. Todas as quatro plantas bombardeadas de *Nicotiana tabacum* TNN apresentaram deformação foliar, escurecimento de nervuras, bolhosidade e manchas cloróticas (Figura 8C), sendo as quatro infecções confirmadas por PCR. Catorze das vinte plantas de *Nicotiana benthamiana*, apresentaram sintomas de deformação foliar, manchas cloróticas (Figura 8D) ou mosqueado. Três das oito plantas de *Nicandra physaloides* apresentaram lesões necróticas na superfície foliar, além dos sintomas de mosqueado e deformação foliar (Figura 8E). Duas plantas de *Capsicum annuum* Ikeda, dentre as oito bombardeadas, apresentaram enrolamento foliar, clareamento de nervuras (Figura 8F) e mosqueado. Das oito plantas bombardeadas para cada espécie seguinte, duas plantas de *Capsicum chinense* PI159236, três de *Datura stramonium*, duas de *Nicotiana rustica* e duas de *Physalis pubescens* desenvolveram sintomas de deformação foliar e mosaico. Plantas de *Datura metel*, *Solanum americanum*, *Solanum lycopersicon*, *Chenopodium murale*, *Chenopodium amaranticolor*, *Bidens pilosa* e *Euphorbia heterophylla* não apresentaram sintomas quando inoculadas por bombardeamento com DNA viral do isolado 5157. Todas as plantas bombardeadas foram submetidas à extração de DNA e PCR com primers específicos para begomovírus, para confirmação da presença ou ausência do vírus. Para confirmação da boa qualidade do DNA extraído, foi realizada PCR utilizando primers de amplificação do genoma de cloroplasto *ndhB* (9F e 13R; Graham & Olmstead, 2000; dados não mostrados).

Tabela 3. Círculo de hospedeiras dos clones de 5157 inoculados por biobalística.

Espécie hospedeira	Infectividade*	Sintomas**
Malvaceae		
<i>A. esculentus</i> Sta. Cruz 47	1/98	SS
<i>A. esculentus</i> Clemson 80	1/8	MC
<i>S. santaremnensis</i>	7/12	DF, M
Solanaceae		
<i>C. annuum</i> Ikeda	2/8	CN, EF, Mo
<i>C. chinense</i> PI159236	2/8	DF, M
<i>D. metel</i>	0/8	-
<i>D. stramonium</i>	3/8	DF, M
<i>N. physaloides</i>	3/8	DF, LN, Mo
<i>N. rustica</i>	2/8	DF, M
<i>N. benthamiana</i>	14/20	DF, MC, Mo
<i>N. tabacum</i> TNN	4/4	B, DF, EN, MC
<i>P. pubescens</i>	2/8	DF, M
<i>S. americanum</i>	0/8	-
<i>S. lycopersicon</i>	0/8	-
Chenopodiaceae		
<i>C. murale</i>	0/8	-
<i>C. amaranticolor</i>	0/8	-
Asteraceae		
<i>B. pilosa</i>	0/6	-
Euphorbiaceae		
<i>E. heterophylla</i>	0/8	-

* Número de plantas infectadas pelo vírus (PCR positivas) / número de plantas bombardeadas.

** B = bolhosidade, CN = clareamento de nervura, DF = deformação foliar, EF = enrolamento foliar, EN = escurecimento de nervuras, M = mosaico, Mo = mosqueado, MC = manchas cloróticas, LN = lesões necróticas, SS = sem sintoma.

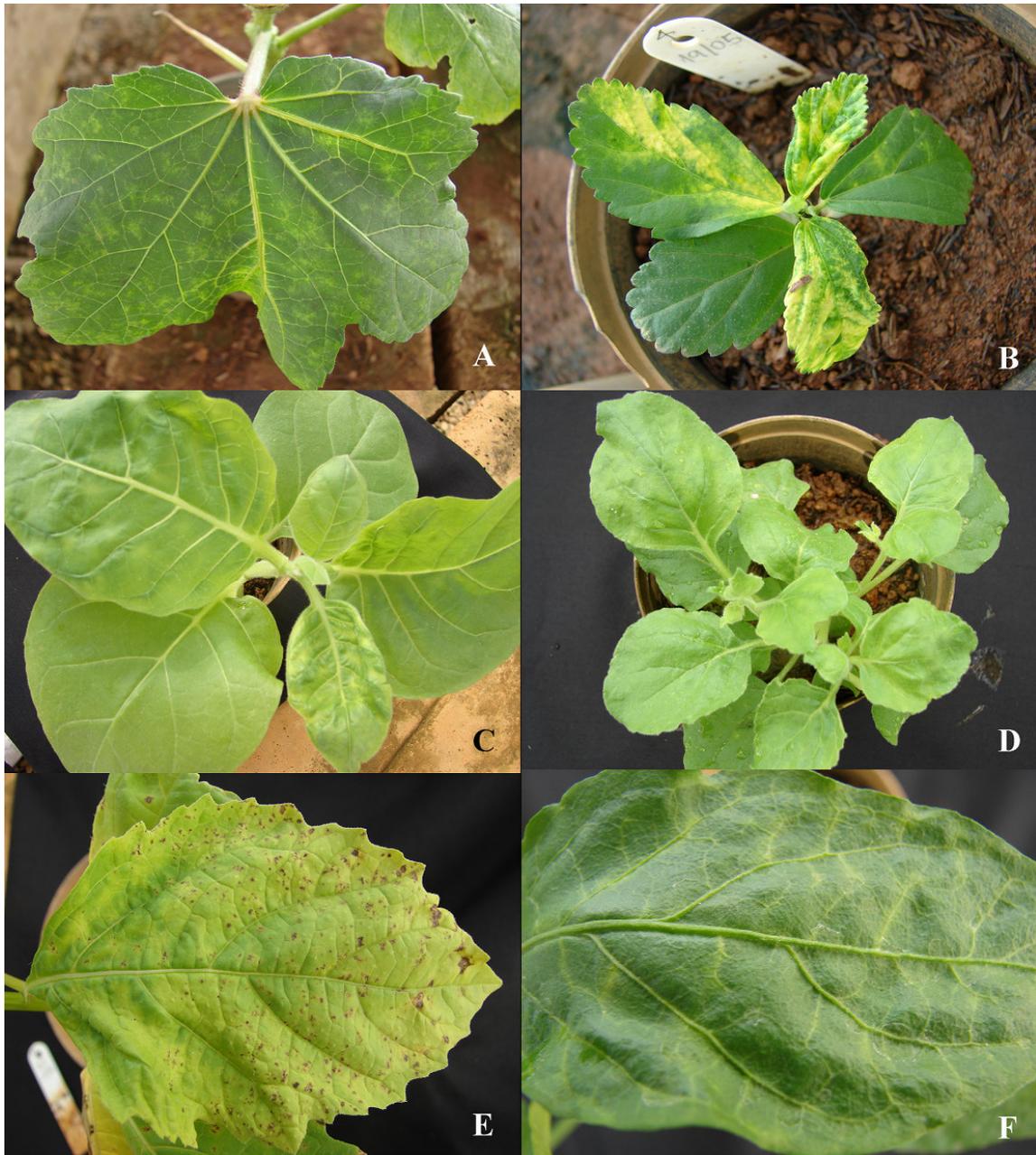


Figura 8. Plantas bombardeadas com clones infectivos do isolado 5157. A) Quiabeiro cultivar Clemson 80 apresentando manchas cloróticas; B) *S. santaremnensis* com forte mosaico e deformação foliar; C) *N. tabacum* TNN com bolhosidade, deformação foliar, escurecimento de nervuras e manchas cloróticas; D) *N. benthamiana* com deformação foliar e manchas cloróticas; E) *N. physaloides* com mosqueado, deformação foliar e lesões necróticas; F) *C. annuum* com clareamento de nervuras e enrolamento foliar.

4. Discussão

A análise das seqüências dos componentes genômicos do isolado 5157 mostrou que sua organização genômica é típica dos geminivírus do hemisfério ocidental, pertencendo ao gênero *Begomovirus* com genoma bipatido.

Os begomovírus são classificados com base em seqüências genômicas, sendo a seqüência completa do DNA-A o critério mais relevante. O DNA-A da amostra 5157 apresentou 94,12% de identidade nucleotídica com o vírus SimMV-A2B2 e o DNA-B apresentou 90,26% de identidade nucleotídica com o SimMV-B1, mostrando a alta identidade de seqüência com SimMV. De acordo com os critérios taxonômicos para a família *Geminiviridae* (Fauquet & Stanley, 2005; Fauquet *et al.*, 2008), seqüências com mais de 89% de identidade são consideradas da mesma espécie. Identidade de seqüência abaixo de 93% caracteriza nova estirpe dentro da espécie, enquanto que identidade acima de 94% caracteriza uma variante daquela estirpe. Critérios como sintomas, círculo de hospedeiros e distribuição geográfica também devem ser considerados para classificação do isolado. Dessa forma, de acordo com as características moleculares e biológicas apresentadas para este vírus, sugere-se que o isolado 5157 seja considerado uma variante da espécie SimMV.

A análise dos múltiplos alinhamentos de seqüência da RC do DNA-A dos begomovírus brasileiros demonstrou que o isolado 5157 é, provavelmente, capaz de formar pseudo-recombinantes viáveis com SimMV-A2B2, SiYMV, SiCoMV e ToLDV por possuírem a mesma seqüência de íteron (GGGG) e provavelmente, não formaria pseudo-recombinantes viáveis com SimMV-B1 por não apresentar a mesma seqüência de íteron. No entanto, pseudo-recombinações viáveis entre vírus com seqüências de íterons diferentes foram relatadas por Andrade *et al.* (2006), que atribuiu a possibilidade desta recombinação a uma maior versatilidade da Rep, capaz de se ligar a diferentes regiões.

As análises filogenéticas sugerem que o isolado 5157 provavelmente compartilha de um ancestral em comum com o SimMV tanto para o DNA-A quanto para o DNA-B. Este isolado está presente em um grupo que inclui os vírus de *Sida* e alguns vírus de tomate que possuem relações filogenéticas próximas aos vírus de plantas invasoras, como o ToYSV. Este vírus foi relatado por Andrade *et al.* (2006) como sendo mais próximo

dos vírus de *Sida* que dos de tomate, possuindo um fragmento de DNA derivado de SiMoV.

Estudos de caracterização biológica mostraram que o isolado 5157 é capaz de infectar espécies de plantas das famílias Malvaceae e Solanaceae. Os clones infectivos não foram capazes de infestar as espécies inoculadas pertencentes às famílias Chenopodiaceae, Asteraceae e Euphorbiaceae. As infecções foram assintomáticas ou apresentaram sintomas que variaram de manchas cloróticas, mosqueado e mosaico a manchas necróticas e deformação foliar. Apenas uma planta de quiabo da cultivar Santa Cruz 47, apesar de assintomática, mostrou-se infectada pelo clone infectivo do isolado 5157 (detectado por PCR). A baixa porcentagem de infecção (1/98) das plantas de quiabo da cultivar Santa Cruz 47 pode estar relacionada à resistência desta cultivar ao mosaico do quiabeiro como relatado por Sudo (1974). Uma planta de quiabo da cultivar Clemson 80 apresentou manchas cloróticas sendo esta a única infectada dentre as oito inoculadas. Os resultados demonstram que a cultivar Santa Cruz 47 é realmente resistente a begomovírus, e o isolado 5157 não foi capaz de quebrar essa resistência, o que foi demonstrado com a baixa porcentagem de infecção. Os resultados obtidos com a cultivar Clemson 80 não são suficientes para afirmar se esta cultivar é resistente ou não ao vírus do mosaico porque o número de plantas bombardeadas foi muito pequeno. Estudos adicionais de inoculação dos clones infectivos em um maior número de plantas da cultivar Clemson 80 e em outras cultivares de quiabeiro são necessários para verificação de resistência ou susceptibilidade destas cultivares, revelando a importância deste vírus para esta cultura.

As plantas inoculadas de *S. santaremnensis* apresentaram deformação foliar, além de forte mosaico. Resultados similares foram relatados por Jovel et al. (2007) quando SimMV foi inoculado em plantas de *S. micrantha*. Segundo Jovel et al. (2007) os sintomas induzidos por SimMV em diversas espécies de plantas são dependentes da hospedeira. Em *S. micrantha*, este vírus induz um forte mosaico e um moderado enrugamento foliar. Em *N. benthamiana*, as folhas maduras mostram aparência coriácea, mosaico moderado e folhas apicais enrugadas. Em *Malva parviflora*, SimMV causa clorose, forte enrugamento foliar e até folhas albinas são observadas em infecções severas. Forte nanismo e folhas pequenas foi observado nas três espécies.

Este estudo é o primeiro a apresentar a seqüência completa de clones de um begomovírus infectando quiabeiro no Brasil capaz de induzir infecção sistêmica em plantas das famílias Malvaceae e Solanaceae via bombardeamento de partículas. Estes clones foram capazes de induzir sintomas semelhantes aos relatados em plantas que apresentavam a clorose infecciosa das malváceas, e sugere-se que este é, muito provavelmente, o agente causal do mosaico do quiabeiro.

Capítulo 4

Seqüência nucleotídica completa de uma nova espécie de *Begomovirus* infectando quiabeiro

Os geminivírus estão entre os vírus de plantas mais bem caracterizados e mais importantes economicamente (Rojas et al., 2005). A família *Geminiviridae* é dividida em quatro gêneros, tendo o gênero *Begomovirus* a maioria das espécies desta família (Fauquet et al., 2005). Os begomovírus são transmitidos pela mosca-branca *Bemisia tabaci* Genn., infectando dicotiledôneas por todo o mundo (Fauquet & Stanley, 2005). A maioria dos membros deste gênero possui genoma circular de fita simples com dois componentes, denominados DNA-A e DNA-B, que possuem de 2,5 a 3 kb cada (Rojas et al., 2005). Milho, tomate, pimentão, mandioca, feijão e algodão são as principais culturas afetadas por geminivírus, causando grandes perdas de produção. O primeiro relato de um begomovírus em quiabeiro no Brasil foi confirmado em amostras coletadas no estado de GO (Capítulo 2). A seqüência nucleotídica de uma das amostras coletada em Nova Veneza é apresentada neste capítulo como uma nova espécie de begomovírus, sendo este o objetivo deste trabalho.

O DNA total das amostras foi extraído das amostras utilizando o método CTAB (Doyle & Doyle, 1987), seguido de PCR com primers universais para begomovírus (pAR1c496 e pAL1v1978; Rojas *et al.*, 1993). Duas amostras positivas (# 6319 e # 6328) foram selecionadas para caracterização. O DNA circular presente no extrato de DNA total de cada amostra foi amplificado via ciclo rolante (Inoue-Nagata et al., 2004) e clonado em vetor pBluescript SK+ (Stratagene) previamente digerido com a enzima de restrição SacI. Clones contendo DNA de 2,6kb foram selecionados e seqüenciados em seqüenciador automático (ABI 3100) com primers do vetor e internos (Tabela 1). Foi realizada hibridização Southern-blot com sonda não radioativa (digoxigenina) como descrito por Santana et al. (2007) para detectar DNA-A e verificou-se que a enzima SacI digeriu o DNA-A em um único ponto. Uma digestão com a enzima de restrição MspI foi realizada para selecionar os clones a serem submetidos ao seqüenciamento. Foram selecionados dois clones com padrões eletroforéticos diferentes da amostra #6319 (6319-13 e 6319-12) e para a amostra #6328 (6328-19) um clone com padrão idêntico a um dos

clones da outra amostra. As seqüências obtidas foram compiladas utilizando Staden 4 (Staden et al., 2003) e analisadas pelo algoritmo Blast disponível online (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

Tabela 1. Primers utilizados no seqüenciamento completo dos componentes genômicos dos clones 6319 e 6328.

Primer	Seqüência (5' – 3')
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG
T7	CGGGATATCACTCAGCATAATG
SimA910F	GAGAATCACACGGAGAATG
SimA1990R	GAGAATCACACGGAGAATG
SiMoB390F	AGCTGGACCAGTGAAGTTG
SiMoB2000R	GCCACAGGTTCGTCATC

O seqüenciamento completo dos clones demonstrou que o clone 6319-13 representava o DNA-A e o clone 6319-12 o DNA-B, enquanto que o clone 6328-19 representava o DNA-A. As seqüências completas dos clones foram depositadas no Genbank e receberam os seguintes números de acesso: EU914817 (clone 6319-13), EU914818 (clone 6319-12) e EU914819 (clone 6328-19). Os clones 6319-13 e 6328-19 apresentaram 99% de identidade entre si, e por este motivo apenas um dos clones foi selecionado para ser caracterizado. Como a amostra #6319 apresentou clones dos dois componentes de DNA, procederam-se as análises com os clones 13 (DNA-A) e 12 (DNA-B) deste isolado.

O seqüenciamento completo dos clones 6319-13 e 6319-12 mostrou que o isolado 6319 possui características típicas dos begomovírus bipartidos do novo mundo. O DNA-A e o DNA-B possuem 2660 e 2653 nucleotídeos, respectivamente. O DNA-A possui uma ORF no sentido viral (AV1) e três no sentido complementar (AC1, AC2 e AC3). O DNA-B possui duas ORFs, uma no sentido viral (BV1) e outra no sentido complementar

(BC1) (Figura 1). Ambos os componentes possuem a região intergênica (RI). Dentro dessa região, o DNA-A e DNA-B apresentam uma região comum (RC, figura 1) com aproximadamente 180 nucleotídeos apresentando 77% de identidade. A RC de ambos os componentes contém a sequência TAATATT↓AC característica de todos os geminivírus, considerada a origem da replicação viral.

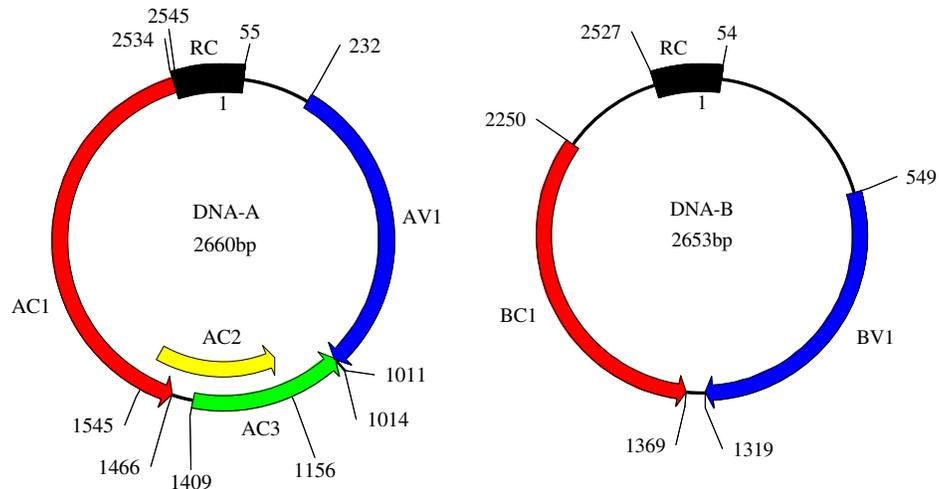


Figura 1. Organização genômica dos clones da amostra #6319. As setas indicam a direção das ORFs no sentido viral (V) e complementar (C). As posições numeradas indicam o códon iniciador e o códon de parada de cada ORF. O nucleotídeo número 1 localizado dentro da região intergênica representa o sítio de clivagem (↓) na sequência TAATATT↓AC.

A sequência nucleotídica do DNA-A do clone 6319-13 foi comparada com as sequências dos clones da amostra # 5157 (Capítulo 3), # 6328, com dezessete sequências de begomovírus brasileiros disponíveis e com duas sequências de begomovírus que infectam quiabeiro no México (OYMMV e OYMoIV), enquanto que a do DNA-B, foi comparada com catorze sequências de begomovírus brasileiros, além da sequência da amostra # 5157 (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem de identidade de nucleotídeos do DNA-A e DNA-B do isolado 6319 (completo e ORFs individuais) com outros begomovírus.

Vírus-[isolado] ¹	DNA-A	DNA-B	ORF individual					
	(%)	(%)	AV1	AC1	AC2	AC3	BV1	BC1
6328	99,70	ND	99,74	86,77	99,74	100,00	ND	ND
SiMoV	87,26	ND	86,08	89,12	85,13	85,21	ND	ND
SimMV [A1B3]	87,20	81,76	85,82	89,81	78,46	85,21	85,86	95,92
5157	84,77	76,44	93,36	79,72	92,05	86,97	82,75	77,21
SimMV	84,08	75,98	89,91	80,37	85,24	87,22	81,84	76,42
ToYSV	83,50	75,19	84,55	85,05	81,79	83,46	86,77	90,93
ToLDV	82,03	ND	89,27	78,51	84,36	85,71	ND	ND
SiYMV	80,27	ND	85,46	76,78	84,22	85,32	ND	ND
SiYLCV	78,37	ND	87,36	71,47	83,08	86,22	ND	ND
TMMV	77,39	66,91	81,35	78,79	84,36	84,96	75,75	77,21
SiCoMV	76,27	ND	84,80	69,77	78,72	82,96	ND	ND
OYMoIV	75,94	ND	75,94	ND	83,14	77,04	83,21	56,06
ToRMV	74,92	62,22	80,08	70,83	80,26	83,21	77,56	76,76
OYMMV	74,83	ND	82,12	75,11	81,03	84,46	ND	ND
TGMV	74,78	56,85	78,03	74,81	78,97	81,95	72,89	50,79
ToSRV	73,83	62,05	78,29	75,37	80,77	83,21	77,56	76,64
BGMV	73,76	62,09	78,42	72,54	80,51	80,70	70,04	72,00
ToCMoV	73,34	58,43	80,33	72,04	80,26	83,71	71,21	71,32
ToYVSV	71,30	59,15	77,78	72,82	79,49	83,21	74,19	75,51
BYSV	70,74	59,29	78,93	67,59	77,27	80,95	67,79	72,00
TCoMV	70,68	56,48	80,59	68,88	81,28	82,46	70,04	70,86
SimMV [B1]	ND	74,33	ND	ND	ND	ND	82,36	70,27
TCrLYV	ND	60,56	ND	ND	ND	ND	73,02	74,24
ToMLCV [Uber]	ND	60,55	ND	ND	ND	ND	75,62	74,04

¹Numero de acesso no banco de dados: SimMV [*Sida micrantha mosaic virus* – NC_005330 (DNA-A) e NC_005331 (DNA-B)], ToLDV [Tomato leaf distortion virus – EU710749 (DNA-A)], SiMoV [*Sida mottle virus* – NC_004637 (DNA-A)], SimMV-A1B3 [*Sida micrantha mosaic virus* isolado A1B3 – AJ_557454 (DNA-A)], ToYSV [*Tomato yellow spot virus* - NC_007726 (DNA-A) e NC_007727 (DNA-B)], TMMV [Tomato mild mosaic virus – NC_010833 (DNA-A) e NC_010834 (DNA-B)], SiYMV [*Sida yellow mosaic virus* – NC_004639 (DNA-A)], SiYLCV [*Sida yellow leaf curl virus* – EU_710750 (DNA-A)], ToRMV [*Tomato rugose mosaic virus* – NC_002555 (DNA-A) e NC_002556 (DNA-B)], OYMMV [*Okra yellow mosaic México virus* – DQ_022611 (DNA-A)], SiCoMV [*Sida commom mosaic virus* – EU_710751 (DNA-A)], OYMoIV [*Okra yellow mottle Iguala virus* – AY_751753], ToSRV [*Tomato severe rugose virus* – NC_009607 (DNA-A) e NC_009612 (DNA-B)], TGMV [*Tomato golden mosaic virus* – NC_001507 (DNA-A) e NC_001508 (DNA-B)], BGMV [*Bean golden mosaic virus* – NC_004042 (DNA-A) e NC_004043 (DNA-B)], ToCMoV [*Tomato chlorotic mottle virus* – NC_003664 (DNA-A) e NC_003665 (DNA-B)], ToYVSV [Tomato yellow vein streak virus – NC_010949 (DNA-A) e NC_010950 (DNA-B)], TCoMV [Tomato commom mosaic virus – NC_010835 (DNA-A) e NC_010836 (DNA-B)], BYSV [*Blainvillea yellow spot virus* – NC_010837 (DNA-A) e NC_010838 (DNA-B)], SimMV-B1 [*Sida micrantha mosaic virus* isolado B1 – AJ_557452 (DNA-B)], TCrLYV [Tomato crinkle leaf yellows virus –

AY_090556 (DNA-B)], ToMLCV-Uber [Tomato mild leaf curl virus isolado Uberlândia – DQ_336352 (DNA-B)]. ND = seqüência não disponível.

O clone A da amostra #6319 apresentou 99,70% de identidade com a amostra #6328 e 84,77% de identidade com a amostra #5157 (Tabela 2) o que demonstra que estes isolados podem ser considerados vírus diferentes, encontrando-se, portanto, pelo menos dois vírus diferentes em quiabeiro. Dentre as seqüências de begomovírus listadas na tabela 2, o vírus que apresentou maior identidade de seqüência completa com o DNA-A do isolado 6319 foi o SiMoV com 87,26%, seguido do SimMV-A1B3 com 87,20% de identidade, contudo, deve-se ressaltar que o isolado A1B3, na verdade, não pode ser considerado um isolado de SimMV e sim de *Sida mottle virus* (SiMoV), pois apresenta 92,03% de identidade com SiMoV, enquanto que apresenta menor porcentagem de identidade (81,62%) com SimMV-A2B2. Assim, pode-se dizer que o isolado A1B3 é, provavelmente, um clone de SiMoV, apesar dos autores atribuírem o nome *Sida micrantha mosaic virus* a este isolado (Jovel et al., 2004). As comparações de DNA-B da amostra # 6319 com os demais vírus mostrou que esta amostra apresentou maior porcentagem de identidade com SimMV-A1B3 (81,76%), seguido da amostra # 5157 (76,44%) (Tabela 2). Dessa forma, conclui-se que a seqüência nucleotídica da amostra #6319 apresenta maior identidade com o vírus SiMoV.

De acordo com os critérios taxonômicos para a família *Geminiviridae* (Fauquet & Stanley, 2005; Fauquet *et al.*, 2008), seqüências com menos de 89% de identidade são consideradas de espécies diferentes, portanto, pode-se considerar que as amostras 6319 e 6328 são isolados de uma nova espécie viral, e devido ao sintoma de mosqueado observados na planta originalmente coletada, o nome Okra mottle virus é proposto.

Quando ORFs individuais foram comparadas (Tabela 2), o isolado 6319 apresentou maior identidade de seqüência nucleotídica com os isolados 6328 (99,74%) e 5157 (93,36%), seguidos por SimMV-A2B2 (89,91%) para AV1. Para a ORF AC1, a maior identidade nucleotídica foi com SimMV-A1B3 (89,81%), seguido de SiMoV (89,12%). Como consideramos A1B3 como isolado de SiMoV, concluímos que esta ORF apresenta maior identidade de seqüência com este vírus. A ORF AC2 apresentou o

mesmo padrão de identidade da ORF AV1, onde o isolado 6328 apresentou maior identidade de sequência com as amostras # 6328, # 5157 e SimMV-A2B2 (99,74; 92,05 e 85,24, respectivamente). As ORFs AC3 e AC4 apresentaram 100% de identidade com a amostra # 6328, sendo que AC3 apresentou alta identidade nucleotídica com SimMV-A2B2 (87,22%), enquanto que AC4, apresentou maior identidade com SiMoV (SimMV-A1B3; 63,42%). Dessa forma, percebe-se que o DNA da amostra # 6319 está aparentemente relacionado tanto com SimMV quanto com SiMoV, sugerindo que haja possibilidade de recombinações entre estes vírus. Em relação ao DNA-B, a ORF BV1 apresentou maior identidade de sequência com ToYSV (86,77%), seguido por SiMoV (SimMV-A1B3; 85,86%), enquanto que BC1 apresentou 95,92% de identidade com SiMoV (SimMV-A1B3), seguido de ToYSV (90,93%). Aparentemente, o DNA-B do isolado 6319 está relacionado com SiMoV e ToYSV, o que sugere uma possível recombinação entre essas moléculas.

A análise de múltiplos alinhamentos da RC do DNA de begomovírus brasileiros demonstram que os isolados 6319 e 6328 apresentam sequência de íteron idêntica a SiMoV e SimMV-A1B3 (GGAG, Figura 2, destacado em vermelho) diferente da sequência compartilhada entre os vírus #5157, SimMV, SiYMV, SiCoMV e ToLDV (GGGG) (destacado em rosa). Segundo Argüello-Astorga & Ruiz-Medrano (2001), a identidade da sequência de íterons é uma característica fundamental para que ocorra a pseudo-recombinação entre vírus diferentes, contudo, resultados diferentes foram relatados por Andrade et al. (2006). Estes autores relatam a formação de um pseudo-recombinante viável formado entre o DNA-A de TGMV e o DNA-B de ToYSV, que possuem seqüências de íterons diferentes. Tais resultados demonstram que a formação de pseudo-recombinantes viáveis não pode ser baseada apenas nas seqüências conservadas dos íterons e nas relações filogenéticas.

Este isolado apresenta a seqüência de nove nucleotídeos (TAATATT!AC; destacada em verde) típica dos geminivírus, contudo não apresenta a região rica em G, denominada G Box (destacada em azul), encontrada em muitos vírus de tomate e feijão. Esta região rica em G também não é encontrada nos vírus de SimMV isolados B1, A1B3, A2B2 e 5157.

BYSV	TATAGTATT-GGAG--ATTGGGG-ACAA	TATATA	TGC	2605
BGMV	TCTATGAATCGGT-GTAATGGTG-CCAA	TATATA	-GT	2565
ToCMoV	TAAAGCAATTGGG-G-ACTGGGGTCCTA	TATATA	-CT	2561
ToSRV	CATATCAATTGGTAGTTATGGTAGCTCT	TATATA	AGTA	2541
ToRMV	CATATGAATTGGTAGTTATGGTAGCTCT	TATATA	ACTA	2570
TGMV	TATATGAATTGGTAGTAA-GGTAGCTCT	TATATA	TTA	2547
ToYVSV	CAAATGAATTGGG-GAAA-GGGTCTCAAT	TATATA	AGTA	2510
5157	-ATATGTATTGGGGTAAA-GGGG-ACAA	TATATA	AGTA	2642
SimMV-A2B2	-ATATGAATTGGGGTAAAT-GGGG-ACAA	TATATA	AGTA	2633
TMMV	-ATATGAATCGGTGTAT--GGGTACAA	TATATA	AGTA	2661
TCoMV	-CTATTTGCTGGTGTCTT-GGTGTCCCATT	TATA	ACTA	2510
SiYLCV	-ATATTTTCTGGTGTCTT-GGTGTCCAATT	TATA	ACTA	2614
SiMoV	CTATGAAATTGGAGTAT--GGAGTACAA	TATATA	AGTA	2627
SimMV-A1B3	TCTATGAATTGGAGTAT--GGAGTACAA	TATATA	TGA	2617
ToYSV	CTTATGAATTGGTGACATTGGTGTACAA	TATATA	ACTA	2633
SiYMV	GAA-----CTGGGGACT--GGGGTCTTATT	TATAGCA		2611
SiCoMV	T-CATGAATTGGGGGAAGTGGGGGAAGT	TATATA	-TG	2636
ToLDV	TATATGAATTGGGGTAA-TGGGGTACAA	TATATA	AGTA	2595
SimMV-B1	TATGAAT--CGGTAGTTATGGTAGCTCT	TATATA	ACTA	2610
6328	--TATGAATTGGAGTAT--GGAGTACAA	TATATA	AGTA	2622
6319A	-TATGAA-TTGGAGTAT--GGAGTACAA	TATATA	AGTA	2622
6319B	ATATGAA-TTGGAGTAA--GGAGTACAA	TATATA	AGTA	2622
BYSV	GTCCCTACACCC-TTGC-GGCCCTCAGTATA	TAATATT		2666
BGMV	TAG-----ACACGTGGC-GGCCATCCGC-TA	TAATATT		2617
ToCMoV	TCGTTACACACACGTGGC-GGCCATCCGT-TA	TAATATT		2622
ToSRV	-----TACACGTGGC-GGCCATCCGT-TA	TAATATT		2593
ToRMV	-----TACACGTGGCCGGCCATCCGA-TA	TAATATT		2622
TGMV	-----CACGTGGC-GGCCATCCGT-T	TAATATT		2588
ToYVSV	-----CCACGTGGC-GGCCATCCGT-TA	TAATATT		2561
5157	-----A-----GC-GGCCATCCGC-AC	TAATATT		2684
SimMV-A2B2	-----A-----GC-GGCCATCCGC-AC	TAATATT		2675
TMMV	-----ACACGTGGC-GGCCATCCGT---	TAATATT		2708
TCoMV	-----GGCAAAAGC-GGCCATCCAT--A	TAATATT		2560
SiYLCV	-----GGCAAAAGC-GGCCATCCAT--A	TAATATT		2664
SiMoV	-----GCACGTGGC-GGCCATCCGT--C	TAATATT		2668
SimMV-A1B3	-----GCATAAAGC-GGCCATCCGT-TC	TAATATT		2659
ToYSV	-----TCCTATAGC-GGCCATCCGT--A	TAATATT		2674
SiYMV	-----ACACGTGGC-GGCCATCCGC-TA	TAATATT		2661
SiCoMV	-----CCACGTGGC-GGCCATCCGC-TA	TAATATT		2687
ToLDV	-----GCACGTGGC-GGCCATCCG--TA	TAATATT		2645
SimMV-B1	---AAGGGCTTA-AAGC-GGCCATCCGC-AC	TAATATT		2652
6328	----AGTTCCTA-A----GGCCATCCGT--A	TAATATT		2660
6319	----AGTTCCTA-A----GGCCATCCGT--A	TAATATT		2660
6319B	---TAGGAGTTCCTAA--GGCCATCCGT-A-	TAATATT		2653

Figura 2. Alinhamento da seqüência de parte da RC do DNA do isolado 6319 com outros begomovírus brasileiros. As seqüências coloridas de rosa, vermelho e cinza correspondem a íterons. O TATA box está destacado em amarelo, as seqüências TAATATT↓, em verde, e o G Box, em azul.

A análise filogenética do DNA-A foi realizada utilizando seqüências nucleotídicas completas de DNA-A dos isolados 6319, 6328, 5157, de 17 begomovírus brasileiros e de dois vírus de quiabo não relatados no Brasil (OYMMV e OYMoIV; Figura 3) através do programa Mega 4 utilizando o alinhamento Clustal W, método de Neighbour Joining em análise “bootstrap” com 1000 repetições (Tamura et al., 2007).

A árvore filogenética utilizando seqüências nucleotídicas completas de DNA-A mostrou que os isolados 6319 e 6328 agrupam entre si e com a seqüência do SimMV-A2B2 com alta confiabilidade, sugerindo que eles, provavelmente, compartilham de um ancestral em comum.

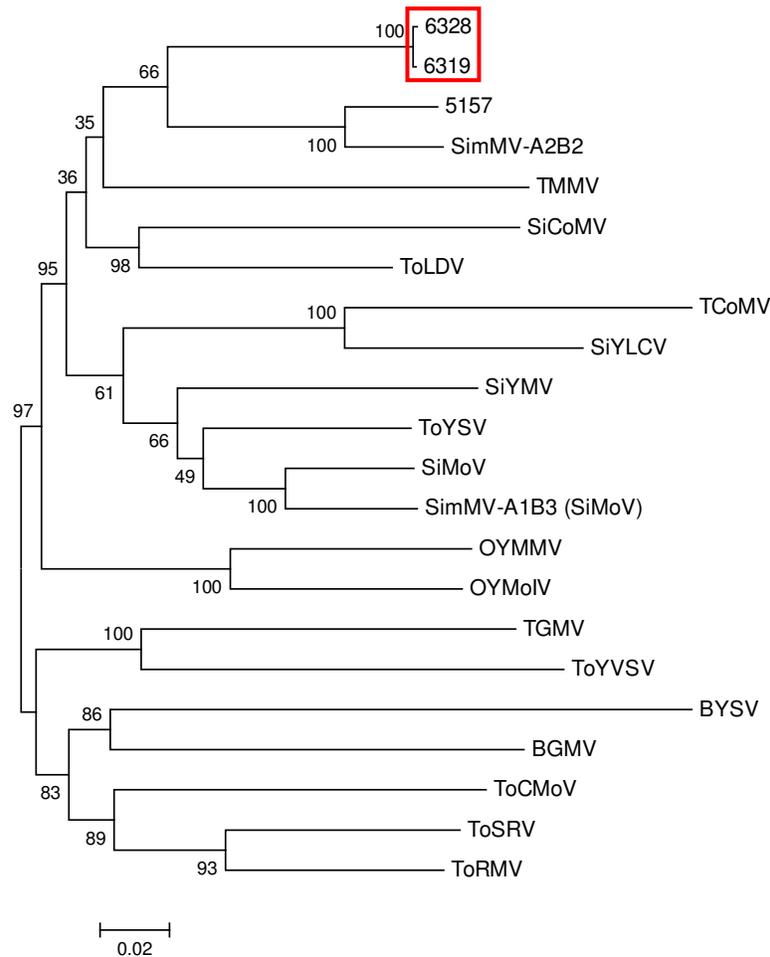


Figura 3. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento das seqüências completas de nucleotídeos do DNA-A dos vírus relacionados na Tabela 2. A árvore foi obtida pelo

programa Mega 4, utilizando o alinhamento Clustal W, método de Neighbour Joining em análise “bootstrap” com 1000 repetições. A barra horizontal indica o valor de substituições por sítio.

A análise do DNA-B (Figura 4) realizada com as seqüências nucleotídicas completas dos isolados 6319, 5157 e de 15 begomovírus brasileiros demonstrou que a amostra #6319 está muito próxima filogeneticamente ao agrupamento formado entre SimMV-A1B3 e ToYSV. Considerando-se que o SimMV-A1B3 é um isolado de SiMoV, conclui-se que o DNA-B da amostra #6319 está filogeneticamente mais próxima de SimMV-A1B3 (SiMoV), contudo, a seqüência de DNA-B do SiMoV não está disponível.

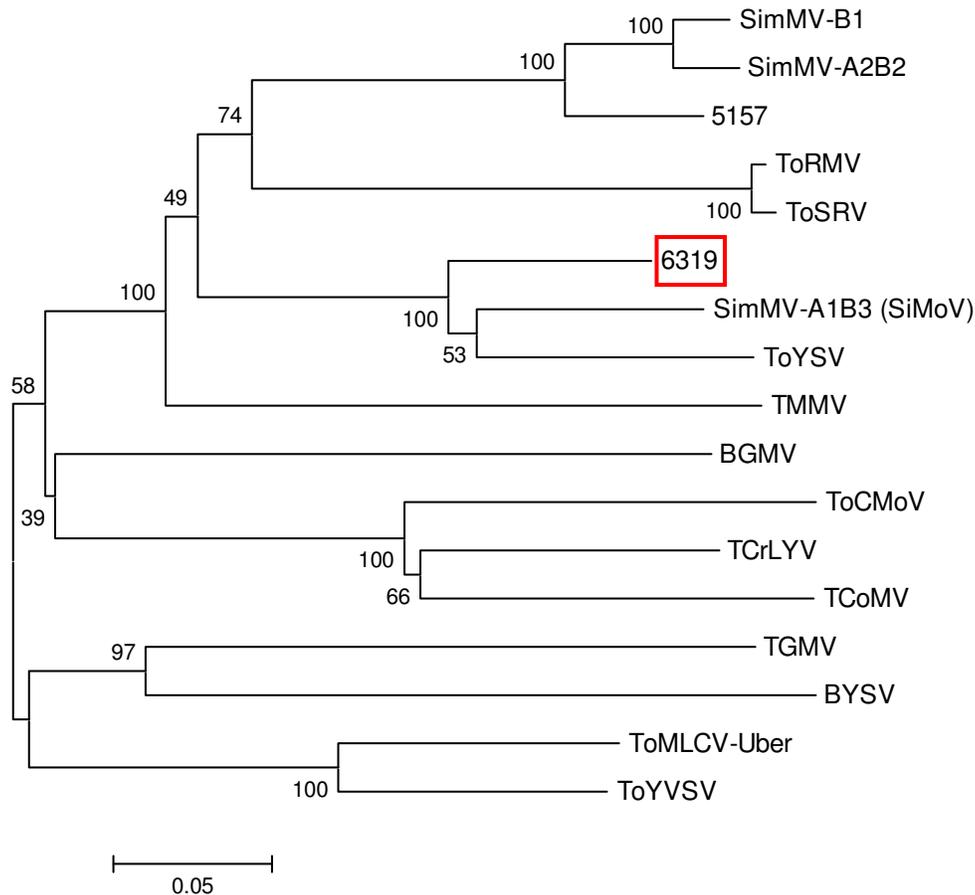


Figura 4. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento das seqüências completas de nucleotídeos do DNA-B dos vírus relacionados na Tabela 2. A árvore foi obtida pelo programa Mega 4 utilizando o alinhamento Clustal W, método de Neighbour Joining em

análise “bootstrap” com 1000 repetições. A barra horizontal indica o valor de substituições por sítio.

Até hoje acreditava-se que o mosaico do quiabeiro era causado por um isolado de *Abutilon mosaic virus* (Sudo, 1974; Nagai, 1993). Neste trabalho, demonstrou-se que uma nova espécie de begomovírus está presente em lavouras de quiabeiro no Brasil. Uma pequena amostragem realizada em Goiás (em áreas distantes aproximadamente 80Km) demonstrou a presença de duas espécies (*Sida micrantha mosaic virus* e *Okra mottle virus*, capítulos 3 e 4, respectivamente) e pode representar a existência de uma grande diversidade de begomovírus em quiabeiro no Brasil. A real diversidade ainda está para ser desvendada.

Considerações finais

Os begomovírus causam perdas significativas em culturas importantes para a indústria e para o consumo “in natura” em agrossistemas tropicais e subtropicais por todo o mundo. No Brasil, os begomovírus têm causado prejuízos na produção de tomate e feijão, e sua presença também tem sido relatada em pimenteiras, batateiras e plantas daninhas, sendo que estas últimas constituem um importante reservatório de vírus capazes de serem transmitidos para espécies cultivadas.

O mosaico do quiabeiro foi uma doença de grande importância nos anos 60, e seu agente causal foi atribuído ao begomovírus causador da clorose infecciosa das malváceas, contudo, a etiologia da doença era baseada apenas em observações de sintomas, sem nenhuma evidência experimental. Com a introdução da cultivar resistente Santa Cruz 47, a importância dessa virose diminuiu. No entanto, uma busca em campos produtores de quiabo na região do DF e GO possibilitou a detecção de três isolados (#5157, 6319 e 6328) de begomovírus no estado de GO.

Este estudo permitiu a caracterização molecular e biológica dessas amostras e elucidou suas seqüências genômicas. A cultivar Santa Cruz 47 mostrou-se resistente aos clones do isolado 5157 inoculados via bombardeamento de partículas, apresentado baixa porcentagem de infecção (1/98) e ausência de sintomas. A cultivar Clemson 80 também apresentou uma aparente baixa infectividade (1/8), contudo o número de plantas inoculadas foi muito pequeno, não sendo suficiente para confirmação de sua resistência ou susceptibilidade. Estudos adicionais são necessários para o estabelecimento da resistência ou susceptibilidade de diferentes cultivares de quiabeiro a este mosaico.

Os resultados obtidos sugerem que os clones do isolado #5157 pertencem a espécie *Sida micrantha mosaic virus* e que os clones dos outros dois isolados, #6319 e 6328, pertencem a uma nova espécie, tentativamente denominada Okra mottle virus. A detecção de duas espécies em uma pequena amostragem pode representar a existência de uma grande diversidade de begomovírus em quiabeiro no Brasil. Este estudo é o primeiro a confirmar a presença de um begomovírus em quiabeiro no Brasil e a apresentar a seqüência completa de clones capazes de induzir infecção sistêmica em plantas das famílias Malvaceae e Solanaceae via bombardeamento de partículas. Tais clones foram

capazes de induzir sintomas semelhantes aos relatados em plantas que apresentavam a clorose infecciosa das malváceas, e sugere-se que este é, muito provavelmente, o agente causal do mosaico do quiabeiro.

Os dados obtidos são de grande relevância visto que este foi o primeiro begomovírus brasileiro de quiabeiro a ser caracterizado biológica e molecularmente, revelando a proximidade filogenética entre vírus de quiabeiro e vírus que infectam *Sida*, sendo estas importantes reservatórios de begomovírus em todo o mundo.

Para que a diversidade dos begomovírus brasileiros de quiabeiro seja revelada, novas coletadas deverão ser realizadas em diversos pontos do Brasil e seria de grande interesse elucidar se as mesmas espécies presentes em quiabeiro infectam as malváceas silvestres e se podem infectar aquelas cultivadas, como o algodoeiro e a planta de hibiscus, de grande importância para o Brasil.

Referências

- Abouzid AM, Frischmuth T, Jeske H (1988) A putative replicative form of the Abutilon mosaic virus in chromatin-like structure. *Molecular and General Genetics* 212: 252-258.
- Ali M, Hossain MZ, Sarker NC (2000) Inheritance of Yellow vein mosaic virus (YVMV) tolerance in a cultivar of okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench). *Euphytica* 111: 205-209.
- Assunção IP, Listik AF, Barros MCS, Amorim EPR, Silva SJC, Izael O, Silva O, Ramalho-Neto CE, Lima GSA (2006) Diversidade genética de begomovírus que infectam plantas invasoras na região nordeste. *Planta Daninha* 24(2): 239-244.
- Azzam O, Frazer J, de la Rosa D, Beaver JS, Ahlquist P, Maxwell DP (1994) Whitefly transmission and efficient ss-DNA accumulation of bean golden mosaic geminivirus require functional coat protein. *Virology* 204: 289-296.
- Bedford ID, Briddon RW, Brown JK, Rossel RC, Markham PG (1994) Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. *Ann Appl Biol* 125: 311-325.
- Bezerra IC, Ribeiro SG, Ávila AC, Giordano LB (1996) Survey of geminivirus in tomato producing areas in Federal District. *Resumo 8º Encontro Nacional de Virologia, São Lourenço, MG, p. 289.*
- Bird J, Sanchez J, Rodriguez RL, Julia FJ (1975) Rugaceous (whitefly-transmitted) viruses in Puerto Rico. In: Bird J, Maramorosch K (eds) *Tropical diseases of legumes*, Academic Press, New York, 3-26.
- Black LM (1950) A plant virus that multiplies in its insect vector. *Nature* 166: 852-853.
- Blair MW, Basset MJ, Abouzid AM, Hiebert E, Polston JE, McMillan RT, Jr. Graves W, Lamberts M (1995) Occurrence of bean golden mosaic virus in Florida. *Plant Dis* 79: 529-533.
- Briddon RW (2003) Cotton leaf curl disease, a multicomponent begomovirus complex. *Molecular Plant pathology* 4(6): 427-434.

- Briddon RW, Bedford ID, Tsai JH, Markham PG (1996) Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, tomato pseudo-curly top virus, suggests a recombinant origin. *Virology* 219: 387-394.
- Briddon RW, Liu S, Pinner MS, Markham PG (1998) Infectivity of *African cassava mosaic virus* clones to cassava by biolistic inoculation. *Arch Virol* 143: 2487-2492.
- Briddon RW, Mansoor S, Bedford ID, Pinner MS, Markham PG (2000) Clones of cotton leaf curl geminivirus induce symptoms atypical of cotton leaf curl disease. *Virus Genes* 20: 17-24.
- Briddon RW, Mansoor S, Bedford ID, Pinner MS, Saunders K, Stanley J, Zafar Y, Malik A, Markham PG (2001) Identification of DNA components required for induction of Cotton leaf curl disease. *Virology* 285: 234-243.
- Briddon RW, Markham PG (2000) Cotton leaf curl virus disease. *Virus Research* 71: 151-159.
- Briddon RW, Pinner MS, Stanley J, Markham PG (1990) Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology* 177: 85-94.
- Brown JK (1994) The status of *Bemisia tabaci* (Genn.) as a pest and vector in world agroecosystems. *Food Agric Plant Prot Bull* 42: 3-32.
- Brown JK, Frohlich DR, Rossel RC (1995) The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? *Ann Rev Entomology* 40: 511-534.
- Brown LG, Simone GR (1994) Tomato yellow leaf curl geminivirus. *Plant Pathology Circular* 366.
- Bull SE, Briddon RW, Sserubombwe WS, Ngugi K, Markham PG, Stanley J (2006) Genetic diversity and phylogeography of cassava mosaic viruses in Kenya. *J Gen Virol* 87: 3053-3065.
- Calegario RF, Ferreira SS, Andrade C, Zerbini FM (2004) Caracterização de um isolado do *Begomovirus Sida micrantha virus* (SimMV) obtido de tomateiro. *Fitopatol bras* 29: 150.

- Cohen S, Harpaz I (1964) Periodic, rather than continual acquisition of a new tomato virus by its vector, the tobacco whitefly (*Bemisia tabaci* Gennadius). *Entomologia experimentalis et Applicata* 7: 155-166.
- Cohen S, Nitzany FE (1966) Transmission and host range of the tomato yellow leaf curl virus. *Phytopathology* 56: 1127-1131.
- Costa AS (1965) Three whitefly-transmitted diseases of beans in the State of São Paulo, Brazil. *FAO Plant Prot Bull* 13: 121-130.
- Costa AS (1976) Whitefly-transmitted plant diseases. *Ann Rev Phytopathol* 14: 429-449.
- Costa AS, Carvalho AM (1960) Comparative studies between *Abutilon* and *Euphorbia* mosaic viruses. Section of Virology, Instituto Agronômico, Campinas, pp 129-152.
- Costa AS, Carvalho AM (1960) Mechanical transmission and properties of the *Abutilon* mosaic virus. Section of Virology, Instituto Agronômico, Campinas, 259-272.
- Costa AS, Oliveira AR, Silva DM (1975) Transmissão mecânica do mosaico dourado do tomateiro. *Fitop bras* 6: 174.
- Cotrim MAA, Krause-Sakate R, Narita N, Zerbini FM, Pavan MA (2007) Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. *Summa Phytopathol* 33(3): 300-303.
- Czosnek H, Laterrot H (1997) A worldwide survey of tomato yellow leaf curl viruses. *Arch Virol* 142: 1391-1406.
- Czosnek H, Ghanim M, Ghanim M (2002) The circulative pathway of begomoviruses in the whitefly vector *Bemisia tabaci* – insights from studies with *Tomato yellow leaf curl virus*. *Ann appl Biol* 140: 215-231.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11-15.
- Duffus JE (1963) Possible multiplication in the aphid vector of sowthistle yellow vein virus, a virus with an extremely long insect latent period. *Virology* 21: 194-202.
- Duffus JE (1987) Whitefly transmission of plant viruses. *Vector Research* 4: 73-91.

- Eagle PA, Orozco BM, Hanley-Bowdoin L (1994) A DNA sequence required for geminivirus replication also mediates transcriptional regulation. *Plant Cell* 6: 1157-1170.
- Faria JC, Bezerra IC, Zerbibi M, Ribeiro SG, Lima MF (2000) Situação atual das geminiviruses no Brasil. *Fitopatol Bras* 25(2): 125-137.
- Faria JC, Gilbertson RL, Hanson SF, Morales FJ, Ahlquist P, Loniello AO, Maxwell DP (1994) Bean golden mosaic geminivirus type II isolates from the Dominican Republic and Guatemala: Nucleotide sequences, infectious pseudorecombinants, and phylogenetic relationships. *Phytopathology* 84: 321-329.
- Faria, JC, Maxwell DP (1999) Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. *Phytopathology* 89:262-268.
- Faria JC, Zerbini FM (2000) Família *Geminiviridae* – taxonomia, replicação e movimento. *RAPP* 8: 27-57.
- Fauquet CM, Bisaro DM, Briddon RW, Brown JK, Harrison BD, Rybicki EP, Stenger DC, Stanley J (2003) Revision of taxonomic criteria of species demarcation in the family Geminiviridae, and an updated list of begomovirus species. *Arch Virol* 148: 405-421.
- Fauquet CM, Briddon RW, Brown JK, Moriones E, Stanley J, Zerbini M, Zhou X (2008) Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Arch Virol* 153: 783-821.
- Fauquet CM, Fargette D (1990) African cassava mosaic virus: etiology, epidemiology and control. *Plant Dis* 74(6): 404-411.
- Fauquet CM, Maxwell DP, Gronenborn B, Stanley J (2000) Revised proposal for naming geminiviruses. *Arch Virol* 145(8): 1743-1761.
- Fauquet CM, Stanley J (2005) Revising the way we conceive and name viruses below the species level: A review of geminivirus taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. *Arch Virol* 150: 2151-2179.
- França FH, Villas-Bôas GL, Castelo Branco M (1996) Ocorrência de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera: Aleyrodidae) no Distrito Federal. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 25: 369-372.

- Fernandes FR, Albuquerque LC, Giordano LB, Boiteux LS, Ávila AC, Inoue-Nagata AK (2008) Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes* 36: 251-258.
- Fukushi T (1933) Transmission of the virus through the eggs of an insect vector. *Proc Imp Acad* 9: 457-460.
- Fukushi T (1935) Multiplication of virus in its vector. *Proc Imp Acad* 11: 801-803.
- Gafni Y (2003) Tomato yellow leaf curl virus, the intracellular dynamics of a plant DNA virus. *Molecular Plant Pathology* 4(1): 9-15.
- Garrido-Ramirez ER, Sudarshana MR, Gilbertson RL (2000) *Bean golden yellow mosaic virus* from Chiapas, Mexico: characterization, pseudorecombination with other bean-infecting geminiviruses and germ plasm screening. *Phytopathology* 90(11): 1224-1232.
- Ghanim M, Morin S, Czosnek H (2001) Rate of Tomato yellow leaf curl virus translocation in the circulative transmission pathway of its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Phytopathology* 91(2): 188-196.
- Ghanim M, Morin S, Zeidan M, Czosnek H (1998) Evidence for transovarial transmission of tomato yellow leaf curl virus by its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Virology* 240: 295-303.
- Goodman RM (1981) Geminiviruses. *J Gen Virol* 54: 9-21.
- Gilbertson RL, Faria JC, Ahlquist P, Maxwell DP (1993) Genetic diversity in geminiviruses causing bean golden mosaic disease: the nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of a Brazilian isolate of bean golden mosaic geminivirus. *Phytopathology* 83: 709-715.
- Gilbertson RL, Faria JC, Hanson SF, Morales FJ, Ahlquist P, Maxwell DP (1991). Cloning of the complete DNA sequence of four bean-infecting geminiviruses and determining their infectivity by electric discharge particle acceleration. *Phytopathology* 81: 980-985.
- Givord L, Den Boer L (1980) Insect transmission of okra mosaic virus in the Ivory Coast. *Annals of Applied Biology* 94 (2): 235-241.

Givord L, Hirth L (1973) Identification, purification and some properties of a mosaic virus of okra (*Hibiscus esculentus*). *Annals of Applied Biology* 74: 359-370.

Graham SW, Olmstead RG (2000) Evolutionary significance of an unusual chloroplast DNA inversion found in two basal angiosperm lineages. *Curr Genet* 37: 183-188.

Gutierrez C (1999) Geminivirus DNA replication. *Cell Mol Life Sci* 56: 313-329.

Gutierrez C (2000) DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminiviruses. *EMBO Journal* 19: 792-799.

Gutierrez C, Ramirez-Parra E, Mar Castellano M, Sanz-Burgos AP, Luque A, Missich R (2004) Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. *Vet Microbiol* 98: 111-119.

Hamilton WD, Stein VE, Coutts RHA, Buck KW (1984) Complete nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of tomato golden mosaic virus: potential coding regions and regulatory sequences. *EMBO Journal* 3: 2197-2205.

Hanley-Bowdoin L, Settlage SB, Orozco BM, Nagar S, Robertson D (1999) Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Review in Plant Sciences* 18: 71-106.

Harrison BD (1985) Advances in geminivirus research. *Annu Rev Phytopathol* 23: 83-96.

Harrison BD, Robinson DJ (1999) Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted geminiviruses (Begomoviruses). *Ann Rev Phytopathol* 37: 369-398.

Holland JDE (1998) Origin and evolution of viruses. *Virus Genes* 16: 13-21.

Howarth AJ, Caton J, Bossert M, Goodman RM (1985) Nucleotide sequence of bean golden mosaic virus and a model for gene regulation in geminiviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 3572-3576.

Inoue-Nagata AK, Albuquerque LC, Rocha WB, Nagata T (2004) A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase. *Journal of Virological Methods* 116: 209-211.

Inoue-Nagata AK, Martin DP, Boiteux LS, Giordano LB, Bezerra IC, de Ávila AC (2006) New species emergence via recombination among isolates of the Brazilian tomato infecting Begomovirus complex. *Pesq. agropec. Bras* 41(8): 1329-1332.

Isnard M, Granier M, Frutos R, Reynaud B, Peterschmitt M (1998) Quasispecies nature of three maize streak virus isolates obtained through different modes of selection from a population used to assess response to infection of maize cultivars. *J Gen Virol* 79: 3091-3099.

Jones DR (2003) Plant viruses transmitted by whiteflies. *European Journal of Plant Pathology* 109: 195-219.

Jovel J, Preiß W, Jeske H (2007) Characterization of DNA intermediates of an arising geminivirus. *Virus Research* 130: 63-70.

Jovel J, Reski G, Rothenstein D, Ringel M, Frischmuth T, Jeske H (2004) *Sida micrantha* mosaic is associated with a complex infection of begomoviruses different from *Abutilon mosaic virus*. *Arch Virol* 149: 829-841.

Jupin I, De Kouchkovsky F, Jouanneau F, Gronenborb B (1994) Movement of tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV): Involvement of the protein encoded by ORF C4. *Virology* 204: 82-90.

Keese P, Gibbs A (1993) Plant viruses: master explorers of evolutionary space. *Curr Opin Genet Dev* 3: 873-877.

Kitajima EW, Noda H, Lin MT, Van der Pahlen A (1979) Levantamento preliminar de vírus de plantas cultivadas nos arredores de Manaus, AM. *Acta Amazônica* 9(4): 633-640.

Lana AO, Bozarth RF (1975) Studies on a virus induced mosaic disease of *Abelmoschus esculentus* in Nigeria. *Phytopath Z* 83: 77-86.

Legg JP, Fauquet CM (2004) Cassava mosaic geminiviruses in Africa. *Plant Mol Biol* 56: 585-599.

Mansoor S, Bedford I, Pinner MS, Stanley J, Markham PG (1993) A whitefly-transmitted geminivirus associated with cotton leaf curl disease in Pakistan. *Pak J Bot* 25: 105-107.

- Mansoor S, Khan SH, Bashir A, Saeed M, Zafar Y, Malik KA, Briddon RW, Stanley J, Markham PG (1999) Identification of a novel circular single-stranded DNA associated with cotton leaf curl disease in Pakistan. *Virology* 259: 190-199.
- Matyis JC, Silva DM, Oliveira AR, Costa AS (1975) Purification and morphology of tomato golden mosaic virus. *Summa Phytopathologica* 1: 267-275
- Méndez-Lozano J, Torres-Pacheco I, Fauquet CM, Rivera-Bustamante (2003) Interactions between geminiviruses in a naturally occurring mixture: *Pepper huasteco virus* and *Pepper golden mosaic virus*. *Phytopathology* 93(3): 270-277.
- Minami K, Modolo VA, Tessariolo Netto J (1997) Cultura do quiabeiro: técnicas simples para hortaliça resistente ao calor. Série Produtor Rural n° 3, Piracicaba.
- Mitidieri J (1973) O quiabeiro: cultura e aplicações. Boletim técnico científico 35. Piracicaba, USP, ESALQ.
- Monci F, Sánchez-Campos S, Navas-Castillo J, Moriones E (2002) A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Virology* 303: 317-326.
- Monteiro AJA, Costa H, Zambolim L (2000) Doenças do quiabeiro In: Zambolim L, Vale FXR, Costa H (eds) Controle de doenças de plantas: Hortaliças, volume 2, Viçosa, pp 677-693.
- Moraes Junior EB, Seno S, Seleguini A (205) Espaçamento para quiabeiro cultivar Santa Cruz 47. *Fitopatologia Brasileira*, 11(2): 368.
- Morales KJ, Anderson PK (2001) The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminivirus in Latin America. *Arch Virol* 146: 415-441.
- Morales FJ, Jones PG (2004) The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. *Virus Research* 100: 57-65.
- Nagai H (1993) Quiabo In: Furlani AMC, Viégas GP (eds) O melhoramento de plantas no Instituto Agrônômico. Campinas, Instituto Agrônômico, pp 295-300.
- Nagar S, Pedersen TJ, Carrick KM, Hanley-Bowdoin L, Robertson D (1995) A

geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. *Plant Cell* 7: 705-719.

Navas-Castillo J, Sánchez-Campos S, Díaz JA (1999) Tomato yellow leaf curl virus causes a novel disease of common bean and severe epidemics in tomato in Spain. *Plant Dis* 83(1): 29-32.

Navas-Castillo J, Sánchez-Campos S, Noris E, Louro D, Accotto GP, Moriones E (2000) Natural recombination between Tomato yellow leaf curl virus-IS and Tomato leaf curl virus. *Journal of General Virology* 81: 2797-2801.

Ndunguru J, Rabaju AC (2004) Effect of okra mosaic virus disease on the above-ground morphological yield components of okra in Tanzania. *Scientia Horticulturae* 99: 225-235.

N'Guessant KP, Fargette D, Fauquet C, Tshovenel J-C (1992) Aspects of the epidemiology of okra leaf curl virus in Côte d'Ivoire. *Tropical pest management* 38(2): 122-126.

Pita JS, Fondong VN, Sangaré A, Otim-Nape GW, Ogwal S, Fauquet CM (2001) Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. *J Gen Virol* 82: 655-665.

Polston JE, Anderson PK (1997) The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Dis* 81(12): 1358-1369.

Polston JE, McGovern RJ, Brown LG (1999) Introduction of Tomato yellow leaf curl virus in Florida and implications for the spread of this and other geminiviruses of tomato. *Plant Dis* 83(11): 984-988.

Preiss W, Jeske H (2003) Multitasking in replication is common among geminiviruses. *J Virol* 77: 2972-2980.

Ramos PL, Guevara-González RG, Peral R, Ascencio-Ibañez, JT, Polston JE, Argüello-Astorga GR, Veja-Arreguín JC, Rivera-Bustamante RF (2003) Tomato mottle Taino virus pseudorecombines with PYMV but not with ToMoV: implications for the delimitation of cis- and trans- acting replication specificity determinants. *Arch Virol* 148: 1697-1712.

- Rech EL, Aragão FJLA (1998) Biobalística. In: Brasileiro ACM, Carneiro VTC (eds) Manual de transformação genética de plantas. Embrapa, Brasília, pp 51-64.
- Ribeiro SG, Ambrozevícius LP, Ávila AC, Bezerra IC, Calegário RF, Fernandes JJ, Lima MF, Mello RN, Rocha H, Zerbini FM (2003) Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. Arch Virol 148: 281-295.
- Rojas MR, Gilbertson RL, Russel DR, Maxwell DP (1993) Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. Plant Dis 77: 340-347.
- Rojas MR, Hagen C, Lucas WJ, Gilbertson RL (2005) Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. Annu Rev Phytopathol 43: 361-394.
- Romano E (1998) Análise da integração do DNA pela técnica *Southern Blot*. In: Brasileiro ACM, Carneiro VTC (eds). Manual de transformação genética de plantas. Brasília, Embrapa, pp 51-64.
- Roossink MJ (1997) Mechanisms of plant virus evolution. Annu rev Phytopathol 35; 191-209.
- Rubinsteins G, Czosnek H (1997) Long-term association of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) with its whitefly vector *Bemisia tabaci*: Effect on the insect transmission capacity, longevity, and fecundity. J Gen Virol 78: 2683-2689.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring, Harbor Laboratory Press.
- Santana FM, Inoue-Nagata AK, Nagata T, Ribeiro SG, Ávila AC, Giordano LB (2007) Detecção de um begomovírus em amostras foliares de tomateiro com sondas não-radioativas. Ciência Rural: 37-269-272.
- Santos CDG, Ávila AC, Resende RO (2003) Estudo da interação de um begomovírus isolado de tomateiro com a mosca-branca. Fitopatol Bras 28(6): 664-673.
- Seal SE, vandenBosch F, Jeger MJ (2006) Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: implications for sustainable control. Critical Reviews in Plant Sciences 25: 23-46.

Settagle SB, Miller AB, Hanley-Bowdoin L (1996) Interactions between geminivirus replication proteins. *J Virol* 70: 6790-6795.

Sonnenberg PE, Silva NF (2002) Desenvolvimento e produção do quiabeiro em função das datas de plantio. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 32(1): 33-37.

Staden R, Judge DP, Bonfield JK (2003) Managing sequencing projects in the GAP4 environment. In: Krawetz SA, Womble DD (ed) *Introduction to Bioinformatics. A Theoretical and practical approach*. Human Press Inc, Totawa.

Stanley J (1991) The molecular determinants of geminivirus pathogenicity. *Semin Virol* 2; 139-149.

Stanley J (1995) Analysis of *African cassava mosaic virus* recombinants suggests strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation circle DNA replication. *Virology* 206: 707-712.

Stanley J, Bisaro DM, Briddon RW, Brown JK, Fauquet CM, Harrison BD, Rybicki EP, Stenger DC (2005) Geminiviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (eds) *Virus Taxonomy, viiiith report of the ICTV*. Elsevier/Academic Press, London, pp 301–326.

Stenger DC, Duffus JE, Villalon B (1990) Biological and genomic properties of a geminivirus isolated from pepper. *Phytopathology* 80: 704-709.

Stephan D, Siddiqua M, Hoang AT, Engelmann J, Winter S, Maiss E (2008) Complete nucleotide sequence and experimental host range of *Okra mosaic virus*. *Virus Genes* 36: 231-240.

Sudarshana MR, Wang HL, Lucas WJ, Gilbertson RL (1998) Dynamics of bean dwarf mosaic geminivirus cell-to-cell and long distance movement in *Phaseolus vulgaris* revealed, using the green fluorescent protein. *Mol Plant-Microbe Interact* 11: 277-291.

Sudo S, Ribeiro RLD, Kimura O, Akiba F, Robbs CF (1974) Santa Cruz-47, nova variedade de quiabeiro (*Hibiscus esculenta* L.) com resistência a doenças prevalente na baixada fluminense. *Fitopatologia* 9(2): 72-73.

Sunter G, Bisaro MD (1997) Regulation of a geminivirus AR1 e BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. *Plant Cell* 4: 1321-1331.

Sunter G, Stenger DC, Bisaro MD (1994) Heterologus complementation by geminivirus AL2 e AL3 genes. *Virology* 203: 203-210.

Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.

Teixeira OP, Fornari MC, Toledo LRC (1986) É fácil cultivar quiabo. *Manuais práticos*. São Paulo, Três letras.

Torres-Pacheco I, Garzón-Tiznado JA, Brown JK, Becerra-Flora A, Rivera-Bustamante RF (1996) Detection and distribution of geminiviruses in México and Southern United States. *Phytopathology* 86: 1186-1192.

Torres-Pacheco I, Garzón-Tiznado JA, Herrera-Estrella L, Rivera-Bustamante RF (1993) Complete nucleotide sequence of pepper huasteco virus: analysis and comparison with bipartite geminiviruses. *J Gen Virol* 74: 2225-2231.

Umaharam P, Padidam M, Phelps RH, Beachy RN, Fauquet CM (1998) Distribution and diversity of geminivirus in Trinidad and Tobago. *Phytopathology* 88: 1262-1268.

Van Regenmortel MHV, Bishop DHL, Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Calisher CH (1997) Guidelines to the demarcation of virus species. *Arch Virol* 142: 1505-1518.

Were HK, Winter S, Maiss E (2004) Viruses infecting cassava in Kenya. *Plant Dis* 88(1): 17-22.

Zeidan M, Czosnek H (1991) Acquisition of tomato yellow leaf curl virus by the whitefly *Bemisia tabaci*. *J Gen Virol* 72: 2607-2614.

Zerbini FM, Andrade EC, Barros DR, Ferreira SS, Lima ATM, Alfenas PF, Mello RN (2005) Traditional and novel strategies for geminivirus management in Brazil. *Australasian Plant Pathology* 34: 475-480.

Zhou X, Liu Y, Calvert L, Munoz C, Otim-Nape GW, Robinson DJ, Harrison BD (1997) Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *J Gen Virol* 78: 2101-2111.

Zhou X, Liu Y, Robinson DJ, Harrison BD (1998) Four DNA-A variants among Pakistani isolates of cotton leaf curl virus and their affinities to DNA-A of geminivirus isolates from okra. *J Gen Virol* 79: 915-923.

Sequência genômica DNA-A isolado #5157

aCcggatggccgcgcgatttttccccccccacgtggcgcgctggggtcgtgcgatctctccccctct
ctcgcgcgacgtggagctctgggtgtccgcgcgctccccccgcgcgctccgcctttaaccctttaatttaa
attaaaggaataactttcatcaggaccaatgaaattgcgctctttaaagcctagatatttgcgaaagactt
gggcccctaagttggttgacgagtatataattaagtcaactcatgacgctcaggaattatttcgaaatgccaa
gcgggatccctcatggcgccagatggcgggaacctcaaaggtagccgctctactaacttttccccctcgtg
gaggaggaggcccaaagtaacaaggcctcggaatgggttcacaggcccatgtataggaagcccaggata
tacaggatgataaggactcctgatgttccaagaggetgtgaagggccctgtaaggtecagtcctacgagca
gcgtcacgacatctcacatgtcggcaaggctcatgtgcatactgatgtcacacgtggcaacggtataacc
accgtgtcggtaagcgtttctgcgttaagtctgtgtacattttagggaagataggatggacgagaacatc
aagctcaagaaccacacgaacagtgctcatgttctgggtgggtcagagaccgtagaccgtatggtaactcctat
ggactttggccagggtgttcaacatgtttgacaacgagcccagcactgctacgggaagaacgatcttcgtg
atcgttatcaagttatgcacaagttctacgccaaggctcactgggtgggcaatgccagcaatgaacaggct
ctgggtcaagaggttctggaaggccaacaatcatgtgggtgtacaaccaccaggaagctggcaagatgagaa
tcacacgggagaatgctttgttactgtatattggcatgtactcatgcctctaaccctgtgtatgcaacgctta
agattcggatctacttctacgattcgataaccaattaataaaaatttgaattttatcatgatcttcaagt
acatagtttacataggctttgtcagtggaagcgaacagctctaattacattgtaagggaattacacc
taattgatctaaatacatcattacaaggcgtctaagcctaatacaataagtcgttccagaagctgtcagag
aagtcgtccagacttggaaagttcaggtaggccttgtggagacccaatgctctcctgaggttgtgggtgaac
cttatctgtatgtgatacactcttgtcctcgtgtacagcggatcctctacgttgtacgtcttgaataacag
gggatttgttatctccagatataagacgccattctctgcctgaggtgcagttatgaattccccgggtgcgtg
aatccatggccgggtgcagttgagatgttgggtatagggtgcagccgcactctaggtecactcgtctacgcct
gattgctctctcttggcaatcctgtgtctcgggttgatagagggggggcgtcgaggaagatgaatttagca
ttgtgtagtggtccaccctctcaatgctgcattttcctcttctgtctaggaagcttttatagctggccccctc
cccaggattgcacaacacgattgaagggaacccaccttcaatcaaacgaggctttccgtatttgcagtttg
tctgccatttctgttgggccccctattagctctttccagtggttccaactttaggtaatgcccagcgcagctca
tcgatGacgttatactccacttgatctgaatatacctttgagttgaaatccagatggccactgaagtaatt
atgtgggctaatgctctagcccacatcgttttaccggttctgctacctccttcaacaattaaacttatgg
gccttaatggccgcgcagcggaaacctctccaaaataatcatcggccactcttgcactcgtctggcacg
ttagtgaaatgaggagagtcgaaacggagggggcccatggctccggagccttggcaagagcttatctaaatt
actattagattgtggaactggaataagaacttttccggtaacttctcccggattatctgcaaggctgcct
cttttgaagggggcgttcaaggcttctgccacagcgtcgttagctgttggcaaccgcctctagcacttctt
ccgtgcacctggaattctccccaatcgagagtatctccgtccttgtcgatgtaggacttgacgtcggacga
tgatttagctccctgtatgttaggatggaaatgtgctgacctgggtggggataccaggctcgaagagctcgt
tattcgtgcattggaatttccccggaactggataaggacgtggagatgaggtccccattttcatggagc
tctctgcagattttgatgaacttcttgtttactgggtgttgctaagctctgtaattgggaaagtgtctcctc
tttggtaaggagcactggggatagtcagaataaattcttggcacttattttaaaacgctttggcgggtg
gcatttttgaataaaggggtgtaccccgattgagagctcgtctataagtcataatgtattggggtaaggg
ggacaatatatagtagaagatcctaagggcctttaagcggccatccgcacTaatatt

Seqüência genômica DNA-B isolado #5157

acgggatggccgcgcgattttgccccccccctacgtggcgcgctgggtgcccgttggataccgctctcctg
gtgggtcccccttccctgggtgctactccccctccccgggctcaattcaattgagcgctatTTTGGAGTCCG
cgaaatgagttAACCGCATTTTTTGACGTCGCGCTTCCGTcagcgcctTTAATTcgaattaaaggcatttc
atTTATTGtGtccaatcattttgcttgggttGtctcctcgcgcgacgatcgctTTTGCCCAACTGGATGAG
atGCGATCTTgatcgTTGGATAAATAATATATTTATGcagcctctTTAATTGAAATTTGAATTATTGGCG
agcgtcgtgctacatgtcccatcgTACGAACCTTgatgagctggaccagTTAAGTTGcacctacagagTTA
atTTgatcaaggaatTTatgTTTAAATCCCTgTTGACAGATGGTgatatcaggTTAATTgtccacgtcta
ttgTTTgagtagctacagTTAACGTTTgtgTactagtcagTTTgataacatgTTTcccagtaggtatagac
gtgTTTggTcgtccaatcaacgacgtggttattcacgtaatcctgtgTTTaaGCGTtctTACGGACTAAA
cgaagtgatgtcaagcGACGACCCAGTAATCCTAACAAGCCCAAGAGGACGGCAAGATGTCTACTCAACG
TATACACGAGAACCAGTTTGGGCCTGAATTTGTGATGGGTcATAATCAGCCATTTGACCTTCATAACAT
ACCCTACTCTTGGGAAGGCTCTCCCTAACCGGTCCAGGTcatatATCAAGTTAAGACGACTGCGTTTTAAG
GGTACTGTCAAGATTGAGCGTGCACATGCTGACGTCAACATGGATGGGTcGAACCCAAAGGTGGAAGGAGT
CTTCTCTCTCGTTGTTGTTGTTGGATCGTAAACCTCATTGGGGTcATCTGGAGCCCTGCTGACCTTTGATG
AGTTATTCGGAGCTAGGATCCACAGCCATGGTAATCTGGCGATATCGCCGTCTCTCAAGGATCGGTTCTAC
ATAAGACACGTGTTCAAACGTGTGTTGTCGTTGAGAAGGATACGACGATGGTGGACCTGGAAGGGACGAC
GACTCTTTCGAACAGACGTTTTAGTTGTTGGTcATCGTTAAGGACGTTGACCCTGAATCGTGAATGGCG
TCTATGCGAACATAAGCAAGAAGCCCTTTTAGTTTATTACTGTTGGATGTcGGATAATATGTCCAAGGCA
TCGACATTTGTATCGTTTGACCTCGATTATGTTGGGTAATTTGAAATTTAATAACAAGCTTAATGCAAAGA
ACCTTATTTATATTTAATAAGTAGACAGTtctTCAATAATCTCAGTGCAATGATTTGGGCTGAGA
AGGGGTACAGTTGCTGTTGATACATtctGGGCGTAGCCCGAACTAGTTcGTTTAGTTGGGCCATTGACA
TGGTATGTTGGATTGGGCCCTCTGAGCACCCACTATTGAGGCGAGTCTCCAGGGTCTAGGCTACTGGTT
CCAGCCTGTGcagctgcctgtatgggtgCGTtGCGTtctctatATCGGAGTCTGCGTCTGAGTGATGAT
TCTACAGTgcttctgacagccaggactctccaggcctgatttcaattgggctgtgcagcccaacaccg
ATATGGACGCAGATCTGATCATCTTCTCTCCACTTTCCGTAGCCACGTTGGCTGAAGTCGATGTCTTTC
TCTGTAATTTGCTTGGAGAGGATCTTCACTGTTGGGGCACGGAAGGTATGTCTACAGAGTGTTCGCCGT
CGACAACCTCAGCTTTCCCTTGAATTTGCGGAAGTGGGTcctctgatggacgTTAGTGTcGCACACTCTGT
AGTACAATTTCCATGGAATTTGGGTcctTgagggagaagaatgacgaggaaaagtaatggaggtcgatgttg
CATCGTATCGGAAACGTCCAGGACGCTTGCAGCGACTCGTTGTcAGTcATTCTCTTGTcATGGATCTCCAC
GACGACGGAACCCACGGCGTTAATGGGTACTTgctgtctgtattctatgacgcagTGGTctatTTTcATAC
AACTGCGACTGAGCCGGGCGCTTAATTTGGGACGCGTGGAGGGAAATGGAAGAAGTCTCTGTcAGGTCA
TGAGAAAGCTGATATTCATCACGCTGAGACTCAATGTAATTTGAATGCGTtTGGAGGATTCACTAGCTGAGA
TTCCATTACTTTTAATTATCAGAAATAGGCCGCGCAGCGGAAACGACAGCGAGATTTGAGCAGGTGAAACT
AACAGGTCTGAAAGACTCTAGGGTTTATGTTGATTATGAAAGAGTAAAGTGGAGAAGATGATAATGAAGAC
GAGTTGGGTTGGGCTGTTACTGGACGGATTGAGAGGAGATATTGTCCAATTGAGGTGTTTcATTTAAACAAC
TCGTCTGATTCCTCCTTAAATAGAAGATGAGTACGGAGTGGCATATTTGTAATAAGGGGGGAACCCCGAT
TGAAGCTCgctctataagTcATATGtattggggTAAAGGGGACAATATATAGTAGAAGATCCTAAGGGCC
TTTAAAGCGGCCATCCGCACcAATATT

Seqüência genômica DNA-A isolado #6319

acgggatggccgcgcgatttttccccctttcttgacgtggcgctctggtggccgcccgatcctcctctcc
ctctccgctctcgtggagtagacacctgcccgcgcgctggtctcctttaattcaaattaaaggatttaactt
ttgtccgaccaattatagtgccctgaggagcctagatatttgcgaaagacttgggcccctaaggtgttgga
cgactatataaattaagtcagtgatgacgtagtaattttcaaaatgcccaagcgggatccctcatggcg
ccagatggcgggaacctcaaaggtagccgcactaccaacttttcccctcgtggagggtggaggcccaaagt
acaacaaggcctcggagtggttccacaggcctatgtataggaagcccaggatatacaggatgataaggact
cctgatgttccaagaggctgtgaaggccctgcaagggtcaatcctacgagcagcgtcacgacatctcaca
tgtcgggaaggctcatgtgcatactgatgtcacacgtggcaatggtataaccaccgctgtcggtaagcgtt
tctgcggttaagtcgtgtacattttagggaagataggtaggacgagaacatcaagctcaagaaccacag
aacagtgctcatattctgggtgggtcagagaccgtagaccgtatggtaccctatggagtttggccagggtgtt
taacatgtttgacaacgagcccagcactgctacggtgaagaacgatctcgtgatcgttatcaagtcagtc
acaagttctatgccaaggctcactggtggtcaatagccagcaacgaacaggctctggtcaagagggtctgg
aaggccaacaatcatgtggtgtacaatcaccaggaggctgggaagtatgagaatcacacggagaatgctct
gttactgtatagggcatgactcatgcctctaaccctgtgtatgcaacgcttaagattcggatctatcttct
acgattcgtacacgaattaataaagtttgaatatttattgaatgattttcagtagacataactgacatatggc
ctgtctgttgcgaaacgaacagctctaattacattattaatggcaattacacctaattgggtctaagtagat
catgactagcatcttaaacctagctaaatagtcgtcccagaagctgtcagagaagtcgtccagacttggga
agttgaggtaggccttgtggagacccaatgctctcctgagggtgtggttgaaccttatctgtatgtggtat
attctggttctcgtgtacggtagatcctctagggtgtatctctgaaatagaggggatttggaaacctcca
gatatagacgccattctctgtctgagggtgcagttatgaattccccgggtgcgtgaatccatggccggtgcag
ttgaagtgagcgtatcgagcagccgcactctagggtccactcgtctacgctgatggctctctctctggc
aatcctgtgtctcgggttgatagagggggggcgtcgaggaagatgaattagcatgtggagtgctccacgat
ttcagagctgcattttcctccttgtctaggaagctttatagctagccccctctccaggattgcacagcac
gattgatgggatgccaccttaatttgaactggctttccgtatgtgcaatgtgactgccagctctttttgag
caccaatcaattccttccagtgctttaacttttagatattgcggtgtgacatcgtcaatgacgttgtattcc
acttctgttgcagtaaaccttagaattgaagtcagatgaccactcaagtaattatgtgggctaacgcacg
agccCACATCGTcttccctgtccttgaatcaccttgcactatcaaacctcataggctctgaatggccgcgcag
cggaacctctcccaaaatattcatcggccactcttgcactcgtcgggaacgtagtgaaggaggagagg
ttaaacggaggaacccacggctcgggagcctttgagaaaattctatctaaattagaatttaaatatgaaa
ctgaaaaagatatttctctggcaattttcccgaattaactgaagagccgtctgtttatcaggagcgttta
acgcctcagctgcagcgtcattagctgtctgttggcctcccctagaactccttccgtcgacctggaagtca
ccccattctactgtatctccatctttgtcgatgtaagacttgacgctcggagctggatttagctccctgaat
gttcggatggaaatgtgctgacctgttggggaaaccagggtcgaacaatctgttattttgtgatttggacct
ttccttccaattgcaacaggacgtggagggtgaggttccccattttcgtgaagctctctgcaaatcttgatg
aatttcttattagagggttaattgaatagcttgcattgggaaagtgcctcctcttttgaagagagcactg
tggataagtaaggaaaatgttttagcttggagctaaaacgacgctgggttggatggcatttttgaataa
agggagtgtagctccgcttgagagctcgtcataagctctatgaattggagtaggagtagcaatataatag
aataggagttcctaaggccatccgtaaatatt

Seqüência genômica DNA-B isolado #6319

acgggatggcgcgcgcgattttttccccccccctacgtggcgcgctgggtgcccggttggataccgctctccc
tggtgggcctcccccttgggtgctactccccccccctctcccggctcaattcaattgagcgccttttttggagt
ccgcgaaatgagttaaacgcaatttttggatgtccgccttcattcagcgcctttaatttgaattaaaggcat
atcattatgttgtccactcatttcgggtctgcttgtctcctcgcgcgacgctcgcttttgccaaccggatg
agatgtgatccttgggtcggttggataataatataatatttattcagccactttaatttgaacttgaattatttg
cgagcgtcgtgggtaccatgtcccacgtacgaacttggatgagctggaccagtgaagttgcacctacagagt
taaattgatcaaggaatttatgtttaaattccccgggtgatagatgggtgatatcagggttaattgagcagctc
tattgtttgagtagctacagttaacagttgtgtgttagtcaattttaaaacatgtttccattaggtatag
acgtgggttgggtcgtctaatacagcgcgagggttacacacgtaatcccgtgtttaagcgttattatgtagcta
aacgaagtgatttcaagcgcgacccagtaataactaacaaggcccaagaagatggcaagatgtctactcaa
cgtatacacgagaaccagtttgggcctgaatttgaatgggcccacaactcagccatttcaacgtttattac
atctcctagcctcggtaagaccgagcctaaccgaaccaggtcctatgtcaagctaaaacgactccgtttta
agggactgtgaagattgaacgtgtttacaatgacgtcatcatggatgggttcaaccctaaagattgaagga
gtcttttccctcgtgggtcgtggtagatcgtaaacccccacttgggatcatctgggtgtctgcacacgtttga
cgagttattcgggtgccaggatccacagtcattggcaatctggctataaacaccctccctgaaagaccgctttt
acattcgcacacgtgttcaaacgtgtgttatctgtggagaaagacactttgatgggtgatcctgaagggact
acatacctctctaacaggcgttttaattgttgggtcaacgtttaaggatattgaccggtgaatcatgtaacgg
tgtttatgcaaacataagcaagaacgcctgttagttactactgttggatgtcggactcgtcgtccaagg
catcgacatttgtatcatatgatctcgattacatcgggttaaacatataagacataatcttcaataaacatt
gttattgattaatcacatattaacttaattgatttgggctgtgggggaatacaatttgttttaataacactcc
tggacgcactcctcactaggtcgtttaattgtgctcggacatgggttatatgcatctcggccctctcgcg
agcaactatggaagccgagtcacctgggtccaacatgctgggtgccagtttatggagccctctatagggt
gtgttgcttctctacctctgactcgggtgctcgattgaccgatccctatggtagctgctgaagccatgtc
tcacctggatcaatggttatttgggcttgggagcccataacttgaactgtggatgaggatcggatcaatttct
ttcccatttcccatagcccacgtgggtgaaatctacgtctctatctgtgaactgtttagataagatcttca
ccgtcgggtgctcggaaaggaatgtcgacggaatgtttcgcgcttgacagctttagcttccccttgaatttc
gcgaagtgcgttctctgggtgaacattcgtgtcgctcactctgtaatacaatttccagggaaattgggtcttt
cagggagaagaacgagcatgaaaagtgtggagatctatgttgcacctgatcgggaatgtccaggacgcct
gtaacgattcattgtccgtcattctcttgtcgtggatctccacgatgacggaacctgtggcgtttatgggt
acctgttgctgtattctatgacgcagtggtctatcttcatacagctgcgactgagcctggcgccttatctg
agccgccgcagaaggaaactgcagaacgatctcagttaggtcatgagaaagctgatactcatcacgctgag
attctatataaattaaaggcatttgggtggattaactaactgagaaccatttttaactattaatctaagaaga
ataggccgcgcagcgtaatctgtaggtgaagtgaataaggcgaaagcggaaaagaatatggcgtcagtcaa
actgagaagacaattgtgttagggtttcagttgttgagaggacggattaagatgagatagaggtgaagga
atctgtgtctaacaccaatctataggatttatattatagatagatgggctgggttctgtcgggttatttttc
ctatcgactaaaacgacgaggttttggatgtcatgactatgctttggatggcatttttgaataaagactgt
gtactccgcttgagagctctttcataagctctatgaattggagtaaggagtaacaatataatagtaaatgga
gttcctaaggccatccgtaaatatt

Sequência genômica DNA-A isolado #6328

acgggatggcgcgcgatttttccccctttcttgacgtggcgcctctggtggcgcgccgatcctcctctccc
tctccgctctcgtggagtagacaccttgcccgcgcgctgttctcctttaattcaaattaaaggatttaacttt
tgtccgaccaattatagtgccctgaggagcctagatatttgcgaaagacttgggccctaagttggtggac
gactatataaattaagtcagtgatgacgtcagtaattttcaaaatgcccaagcgggatccctcatggcgc
cagatggcgggaacctcaaaggttagccgcaactaccaacttttccccctcgtggaggtggaggcccaaagta
caacaaggcctcggagtggttccacaggcctatgtataggaagcccaggatatacaggatgataaggactc
ctgatgttccaagaggctgtgaagggccctgcaaggttcaatcctacgagcagcgtcacgacatctcacat
gtcgggaaggtcatgtgcatatctgatgtcacacgtggcaatggtataaaccaccgtgtcggtaagcgttt
ctgcggttaagtcgtgtacattttagggaagataggatggacgagaacatcaagctcaagaaccacacga
acagtgatcatattctgggtgggtcagagaccgttagaccgtatggtaccctatggagtttggccagggtgtt
aacatgtttgacaacgagcccagcactgctacgggtgaagaacgatctccgtgatcgttatcaagtcagca
caagttctatgccaaaggtcactgggtgggtcaatatgccagcaacgaacaggctctgggtgaagaggttctgga
aggtcaacaatcatgtgggtgtacaatcaccaggagggtggcaagatgagaatcacacggagaatgctctg
ttactgtatattggcatgactcatgcctctaaccctgtgtatgcaacgcttaagattcgggatctatctta
cgattcgatcacgaattaataaagtttgaattttattgaatgattttcgagtacataactgacatattggc
tgtctgttgcgaaacgaacagctctaattacattattaatggcaattacacctaattgggtctaagtacatc
atgactagcatcttaaacctagctaaatatgtcgtcccagaagctgtcagagaagtcgtccagacttggaa
gttgaggtaggccttgtggagacccaatgctctcctgaggttgtggttgaaccttatctgtatgtggtata
ttctgggtctcgtgtacggtagatcctctagggtgtatatacttgaaatagaggggatttggaaacctccag
atagacgccatctctgtctgaggtgcagttatgaattccccgggtgcgtgaatccatggcgggtgcag
tgaagtgagcgtatcgagcagccgcaactcaggccactcgtctacgcctgatgtctctctctggca
atcctgtgtctcgggttgatagagggggggcgtcgaggaagatgaatttagcattgtggaggtccacgatt
tcagagctgcattttcctccttgtctaggaagctctttatagctagccccctctccaggattgcacagcac
gattgatgggatgccaccttaatttgaactggctttccgtatttgcaatttgactgccagctctttttgag
caccaatcaattccttccagtgctttaacttttagatattgcggtgtgacatcgtcaatgacggttgattcc
acttctgttcgagtaaaccttgaattgaagtcagatgaccactcaagtaattatgtgggcctaacgcacg
agcccacatcgtcttccctgtccttgaatcaccttcgactatcaaactcataggctctcaatggctgcgcag
ctgaacctctcccaaaatattcatcggcccaactcttgcatctcgtcgggaacgcttagtgaaggaggagagg
ttaaacgggaggaacccacggctccggagcctttgagaaaattctatctaaattagaattttaaattatgaaa
ctgaaaaagatatttctctggcaatttttcccgaattaactgaagagccgtctgtttatcaggagcgttta
acgcctcagctgcagcgtcattagctgtctgttggcctcccctagaactccttccgtcgacctggaagtca
ccccattctactgtatctccatctttgtcgatgtaagacttgacgtcggagctggatttagctccctgaat
gttcggatggaaatgtgctgaccttgttggggaaaccagggtcgaacaatctgttattttgtgatttggacct
ttccttccaattgcaacaggagcgtggaggtgaggttccccattttcgtgaagctctctgcaaatcttgatg
aatttcttattagagggtaattgaatagcttgcaattgggaaagtgccctcctcttttgaagagagcactg
tgataagtaaggaaaatgtttttagcttggagctaaaacgacgtgggttggatggcatttttgtaaata
agggagtgactccgcttgagagctcgctcataagctatataatggagatggagtagcaatataatag
aataggagttcctaaggccatccgtaaatatt