



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

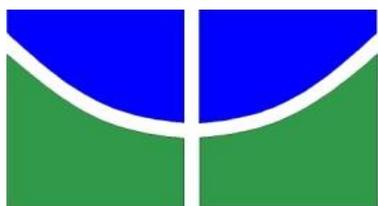
Departamento de Fitopatologia

Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia

Caracterização molecular de begomovírus de malváceas

Mariana Martins Severo de Almeida

Brasília, 2012



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fitopatologia
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia

Caracterização molecular de begomovírus de malváceas

Mariana Martins Severo de Almeida

Brasília, 2012

MARIANA MARTINS SEVERO DE ALMEIDA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BEGOMOVÍRUS DE MALVÁCEAS

Dissertação apresentada à
Universidade de Brasília como
requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Fitopatologia pelo
Programa de Pós-Graduação em
Fitopatologia

Orientadora: Dra. Alice Kazuko Inoue-Nagata

Brasília, 2012

*Aos meus pais Francisco Alberto e Santusa, aos meus irmãos Ana Carolina e Felipe, **dedico** esta dissertação pelo amor, pelo carinho, por sempre acreditarem nas minhas escolhas e incentivarem meu trabalho.*

Agradecimentos

Especialmente, à minha orientadora a Dra. Alice Kazuko Inoue-Nagata, pelos ensinamentos, pela paciência, pela convivência, orientação, pelo incentivo, confiança, profissionalismo, respeito e por, juntamente com minha mãe Santusa e minha irmã Ana Carolina, ser o exemplo de mulher que busco me tornar.

À minha família, meu pai Francisco Alberto, minha mãe Santusa, minha irmã Ana Carolina e meu irmão Felipe por terem me guiado até aqui, por terem me oferecido todas as ferramentas para aos poucos ir alcançando meu espaço, por serem minha segurança e confiança, por me darem constantes demonstrações de amor e respeito, por todas as lições de vida, me ensinando a ser uma mulher forte, determinada e batalhadora.

Ao meu namorado Victor pelo amor, carinho, compreensão, companheirismo e pela amizade.

Aos meus cunhados Sofia e André pelo apoio, incentivo e pelos excelentes momentos em família.

Às minhas queridas amigas de infância Priscila, Carolina, Larissa e Ticiane pelos 15 anos de amizade, união, companheirismo e de boas risadas e em especial à Maíra Teixeira não só pelos anos de amizade, mas também por estes dois anos de curso juntas, quando sempre estive pronta para ajudar, apoiar e confortar nos momentos difíceis.

Aos meus amigos do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Hortaliças Bruna, Mariana Fontenelle, Sarah, Fernanda, Oneilson, Lúcio Flávio, Maciel, Raquel e Sr. Amilton por toda ajuda, companheirismo no dia-a-dia e por tornar o ambiente de trabalho mais alegre e prazeroso e em especial aos meus amigos Mariana Hallwass pela leitura atenciosa do meu trabalho, resultando em importantes correções e ao Leonardo Albuquerque

por ter me ensinado muitas ferramentas importantes para realização do meu trabalho e pela disponibilidade constante em ajudar.

Ao Dr. Renato de Oliveira Resende do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília e ao Dr. Luis Alfredo Pereira do Departamento de Botânica da Universidade de Brasília pelo acolhimento, apoio, pelos ensinamentos e pelas parcerias realizadas.

À minha amiga Carolina de Mello Franco pela amizade, pelo apoio nos anos de Graduação em Ciências Biológicas e por ter me apresentado ao mundo da Biologia Molecular.

À Dra. Izabel Cristinha Bezerra-Agassie pelos ensinamentos e pelo acolhimento no início da minha carreira científica.

Aos meus colegas do curso de Fitopatologia por terem tornado esta jornada mais divertida do que cansativa.

Aos professores e funcionários do curso de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade de Brasília pelo apoio e pelos ensinamentos científicos.

Aos membros da banca examinadora pela atenção dispensada.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro concedido.

À Embrapa Hortaliças por oferecer a infraestrutura para execução dos trabalhos.

Agradeço muito a todas essas pessoas e instituições que fizeram do meu trabalho um prazer e não uma obrigação.

Banca Examinadora:

Alice Kazuko Inoue-Nagata (Orientadora)

Universidade de Brasília (UnB)

Embrapa Hortaliças (CNPQ)

Rita de Cássia Pereira Carvalho

Universidade de Brasília (UnB)

Fernanda Rausch Fernandes

Embrapa Hortaliças (CNPQ)

Índice

Resumo	2
Abstract.....	4
Objetivo Geral	6
Objetivos Específicos.....	6
1. Introdução.....	7
2. Revisão Bibliográfica	10
2.1. Características dos geminivírus	10
2.2. Organização genômica dos geminivírus.....	12
2.3. Taxonomia em begomovírus.....	15
2.4. Moléculas satélites	15
2.5. Os begomovírus no mundo.....	17
2.6. Begomovírus em malváceas.....	22
2.7. Importância econômico-social de plantas malváceas cultivadas	29
3. Material e Métodos	32
3.1. Fonte de vírus e extração de DNA total	32
3.2. Método de detecção por PCR e amplificação por RCA	34
3.3. Amplificação por círculo rolante e digestão com enzimas de restrição	35
3.4. Clonagem e purificação plasmidial.....	36
3.5. Determinação e análise da sequência genômica	37
4. Resultados	42
4.1. Detecção de begomovírus em amostras de malváceas	42
4.2. Clonagens dos DNAs virais	43
4.3. Análises das sequências genômicas	50
5. Discussão	61
6. Considerações Finais	71
7. Referências Bibliográficas	75

Resumo

No Brasil, plantas pertencentes à família *Malvaceae* estão amplamente distribuídas em todo país, como plantas cultivadas, ornamentais, daninhas ou espécies selvagens. É comum observar claros sintomas de mosaico em plantas daninhas da família *Malvaceae* e, invariavelmente, elas são infectadas por begomovírus, no entanto, é raro observar sintomas semelhantes de vírus em plantas malváceas ornamentais e cultivadas. Neste trabalho foi realizado um estudo sobre a presença de infecção por begomovírus bipartidos em três espécies da família *Malvaceae*: malva-preta (*Sidastrum micranthum*), algodão (*Gossypium hirsutum*) e chapéu-de-turco ou hibisco-colibri (*Malvaviscus arboreus*). Nove plantas de algodoeiro apresentando sintoma de mosaico amarelo foram coletadas em casa de vegetação da Embrapa Algodão em Campina Grande, Paraíba, seis plantas de hibisco-colibri foram coletadas em um jardim no centro da cidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, com forte sintoma de clorose nas folhas e apenas uma amostra de malva-preta foi coletada no Jardim Zoológico Sgt. Sívio Delmar Holleback, Brasília, Distrito Federal, com sintoma de mosaico dourado típico de begomovirose. As sequências dos genomas destes begomovírus foi determinada (DNA-A e DNA-B, 2629 – 2711 nucleotídeos de comprimento) após clonagem dos produtos amplificados via círculo rolante de cada amostra de DNA. As sequências nucleotídicas dos clones de DNA-A dos isolados tiveram identidade de 62% entre si e para os clones de DNA-B dos isolados as sequências nucleotídicas foram 62% a 70% idênticas entre si, sugerindo que distintos begomovírus estavam presentes nessas amostras. Não foi encontrado o componente de DNA-A na amostra de malva-preta e a sequência do componente de DNA-B compartilhou 69% de identidade nucleotídica com *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV) sugerindo a presença de uma nova espécie de begomovírus. Das amostras de algodão, a sequência de DNA-A apresentou identidade máxima de 78% com Tomato common mosaic virus (ToCMV) e o DNA-B compartilhou 64% de identidade genômica com *Cabbage leaf curl virus* (CabLCV) e Rhyncosia rugose golden mosaic virus (RhRGMV). Finalmente, da planta

ornamental hibisco-colibri foi isolado uma sequência de DNA-A com 78% de identidade com Abutilon mosaic Bolivia virus (AbMBoV) e uma sequência de DNA-B com 74% de identidade também com Abutilon mosaic Bolivia virus (AbMBoV). Ficou claro que novas espécies de begomovírus estão ocorrendo em plantas daninhas, cultivadas e ornamentais da família *Malvaceae* no Brasil, podendo causar epidemias futuras no país e em países vizinhos. Uma análise detalhada foi realizada com estas sequências, algumas das quais não possuem características tipicamente encontradas nos geminivírus, tais como o motivo nonanucleotídeo conservado TAATATTAC.

Caracterização molecular de begomovírus de malváceas. Palavras-chave: *Malvaceae*, *Gossypium hirsutum*, *Malvaviscus arboreus*, *Sidastrum micranthum* e *Begomovirus*.

Orientador: Dra. Alice Kazuko Inoue-Nagata, Universidade de Brasília – UnB, Embrapa Hortaliças – CNPH.

Abstract

In Brazil, malvaceous plants are widely spread throughout the country, as cultivated plants, ornamental plants and weeds or wild species. It is common to see clear mosaic symptoms on weeds in the *Malvaceae* family and invariably they are infected by begomoviruses, however, it is rare to observe virus-like symptoms on cultivated and ornamental malvaceous plants. In this work was made a study on the presence of bipartite begomovirus infection in three malvaceous species: dainty sand mellow (*Sidastrum micranthum*), cotton (*Gossypium hirsutum*) and turkcap (*Malvaviscus arboreus*). Nine cotton plants showing yellow mosaic symptoms were collected in a greenhouse at Embrapa Cotton in Campina Grande, Paraíba, six turkcap plants were collected in a garden in the center of Rio de Janeiro city, Rio de Janeiro, with strong symptoms of chlorosis in the leaves and only one sample of dainty sand mellow was collected at the Zoo Sgt. Sílvio Delmar Hollembach, Brasília, Distrito Federal, with golden mosaic symptoms typical of begomoviruses. The genome sequence of these begomovirus was determined (DNA-A and DNA-B, 2629 to 2711 nucleotide-long) after cloning of rolling circle amplified products of each DNA sample. The nucleotide sequence of clones of the DNA-A isolates had 62% identity to each other and to the clones of DNA-B isolates the nucleotide sequence were 62% to 70% identical to each other, suggesting that distinct begomovirus were present on these samples. From dainty sand mellow plant, a DNA-A component was not found and a DNA-B component sequence with 69% nucleotide identity to *Sida micrantha* mosaic virus (SiMMV) was found, suggesting the presence of a new begomovirus species. From cotton plants, a DNA-A sequence sharing the maximum nucleotide identity of 78% with Tomato common mosaic virus (ToCMV) and a DNA-B sequence sharing 64% identity with *Cabbage leaf curl virus* (CabLCV) and *Rhyncosia rugose* golden mosaic virus (RhRGMV) were found. Finally, from ornamental plant turkcap, the DNA-A sequence was 78% identical to *Abutilon* mosaic Bolivia virus (AbMBoV) and the DNA-B 74% to *Abutilon* mosaic Bolivia virus (AbMBoV). It was clear

that new begomovirus species are occurring on weed, cultivated and ornamental malvaceous plants in Brazil, and may cause future epidemics in the country and surrounding countries. A detailed analysis was carried on with these sequences, some of them lacking some particular characteristics commonly found on geminiviruses, such as the conserved nonanucleotide motif TAATATTAC.

Molecular characterization of begomoviruses of malvaceous plants. Keywords: *Malvaceae*, *Gossypium hirsutum*, *Malvaviscus arboreus*, *Sidastrum micranthum* and *Begomovirus*.

Guidance committee: Dissertation advisor: Dra. Alice Kazuko Inoue-Nagata, Universidade de Brasília – UnB, Embrapa Hortaliças – CNPH.

Objetivo Geral

O objetivo dessa dissertação foi caracterizar molecularmente três novas espécies de begomovírus isoladas de três espécies de plantas da família *Malvaceae*: a cultivada algodão (*Gossypium hirsutum*), a daninha malva-preta (*Sidastrum micranthum*) e a ornamental chapéu-de-turco ou hibisco-colibri (*Malvaviscus arboreus*).

Objetivos Específicos

- Clonar e sequenciar os genomas completos dos isolados B012-6, T51-1, MA5-1, MB5-1 e S6.
- Comparar as sequências dos DNAs-A e dos DNAs-B dos isolados B012-6, T51-1, MA5-1, MB5-1 e S6 com as sequências de outros begomovírus.
- Realizar análise filogenética com as sequências completas de nucleotídeos dos DNAs-A e dos DNAs-B.
- Comparar as sequências da região comum (RC) com outros isolados de begomovírus brasileiros.

1. Introdução

Os vírus do gênero *Begomovirus*, pertencentes à família *Geminiviridae*, apresentam DNA circular fita simples, encapsidados por partículas geminadas quasi-isométricas. O genoma viral é caracterizado por possuir um (monopartidos) ou dois (bipartidos) componentes de aproximadamente 2,6 Kb cada (Harrison, 1985; Zhang et al, 2001). Os begomovírus possuem grande importância econômica, sendo uma das maiores ameaças à agricultura, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (Briddon et al, 2003; Morales & Anderson, 2001b). No Brasil prevalecem os representantes com dois componentes, que são capazes de infectar indivíduos de variadas famílias botânicas (Albuquerque et al, 2011; Paprotka et al, 2010a).

Os begomovírus são transmitidos por *Bemisia tabaci*, inseto Hemiptera, popularmente conhecido como mosca-branca (Hull, 2002b). No Brasil, embora os primeiros relatos de mosca-branca sejam de 1928, o primeiro registro oficial ocorreu em 1968 em algodoeiro, soja e feijão no estado do Paraná e em 1972 e 1973 no estado de São Paulo (Ferreira & Diniz, 1998). Até o início dos anos de 1990, os begomovírus transmitidos por *Bemisia tabaci* eram um problema apenas na produção de leguminosas no Hemisfério Ocidental, sendo que havia apenas relatos dispersos de begomovírus causando problemas em outras culturas. Contudo, com a introdução do biótipo B da mosca-branca em meados dos anos de 1980 no Hemisfério Ocidental vindo do Mediterrâneo, possivelmente pelo tráfego de plantas ornamentais hospedeiras do vetor, o cenário mudou. Desde meados dos anos de 1990 o Brasil vem sofrendo com grandes incidências de moscas-brancas transmissoras de begomovírus, gerando graves perdas econômicas na agricultura e na indústria (Polston & Anderson, 1997).

Atualmente, são conhecidas dez espécies definitivas de begomovírus bipartidos no país, dez tentativas e, aproximadamente, treze foram propostas. A maior parte das espécies descritas foi isolada de plantas da família *Solanaceae*. Desse total, três espécies definitivas,

três tentativas e duas propostas foram isoladas de plantas da família *Malvaceae*. As três espécies definitivas de begomovírus isoladas de malváceas são: *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV), *Sida mottle virus* (SiMoV) e *Sida yellow mosaic virus* (SiYMV). As espécies tentativas são: Okra mottle virus (OMoV), *Sida yellow leaf curl virus* (SiYLCV) e *Sida common mosaic virus* (SiCmMV). As espécies de begomovírus propostas isoladas de malváceas no Brasil são: *Abutilon mosaic Brazil virus* (AbMBV) e *Sida golden mosaic Brazil virus* (SiGMBV) (Aranha et al, 2011; Castillo-Urquiza et al, 2008; Jovel et al, 2004; Paprotka et al, 2010b) (King et al, 2012).

Os vírus associados a malváceas têm tido importância no Brasil desde a década de 1930 quando a clorose infecciosa das malváceas foi primeiramente descrita e associada a doenças em diferentes espécies de plantas cultivadas, como o feijão, tomate e algodão (Costa, 1954). Durante muitas décadas, os vírus encontrados infectando plantas daninhas, plantas ornamentais e plantas cultivadas da família *Malvaceae* eram chamados unicamente de vírus da clorose infecciosa das malváceas e eram erroneamente associados a uma variante do vírus *Abutilon mosaic virus* (AbMV), primeiro begomovírus bipartido caracterizado no mundo e descrito na Índia. Mais tarde, foi descoberto que o sintoma de mosaico em *Sida* sp. era causado por, pelo menos, duas espécies de begomovírus típicos da América do Sul, o *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV) e o *Sida mottle virus* (SiMoV) (Jovel et al, 2004), e que os sintomas de amarelecimento observados em folhas de quiabeiro eram causados por outra espécie de begomovírus, o Okra mottle virus (OMoV) (Aranha et al, 2011).

Representantes da família *Malvaceae* mundialmente conhecidas e susceptíveis as begomoviroses são as cultiváveis algodão (*Gossypium hirsutum*) e quiabo (*Abelmoschus esculentus*) e a daninha guanxuma em suas variadas espécies (*Sida* spp.) (Aranha et al, 2011; Briddon et al, 2003; Brown & Nelson, 1984; Castillo-Urquiza et al, 2008; Jovel et al, 2004). Dessas apenas o algodão não apresenta ocorrência da doença no Brasil, sendo infectado

principalmente por espécies de begomovírus monopartidos, com apenas um relato de begomovírus bipartido, ocorrendo na América Central e extremo sul da América do Norte: *Cotton leaf crumple virus* (CLCrV) (Briddon et al, 2003; Brown & Nelson, 1984; Idris & Brown, 2004).

Relatos de plantas ornamentais da família *Malvaceae* suscetíveis a begomovírus são escassos no Brasil. Apenas recentemente foi descoberto uma nova espécie Abutilon mosaico Brazil virus (AbMBV) infectando plantas de *Abutilon* sp., anos depois dos primeiros relatos da clorose infecciosa das malváceas (Costa, 1954; Paprotka et al, 2010b). O quadro é muito semelhante no resto do mundo, pois poucas espécies de begomovírus infectando malváceas são conhecidas, como a espécie *Mesta yellow vein mosaic virus* (MeYVMV) encontrada infectando espécies de hibisco (*Hibiscus cannabinus* e *Hibiscus sabdariffa*) em diversos países asiáticos e a espécie proposta *Althea rosea enation virus* (AREV), infectando malva-rosa (*Althea rosea*) no Egito (Bigarre et al, 2001; Chatterjee & Ghosh, 2007b; Chatterjee & Ghosh, 2007a; Chatterjee et al, 2008; Chatterjee et al, 2005; Das et al, 2008).

A escassa literatura sobre begomovírus em malváceas no Brasil pode refletir a ausência de infecção dessas plantas pelos begomovírus ou a falta de estudos dirigidos a essas espécies. Com o objetivo de contribuir com informações sobre a ocorrência e diversidade de begomovírus em malváceas, este trabalho foi conduzido em três espécies de malváceas coletadas no Brasil. Isolados de begomovírus extraídos de amostras da planta ornamental chapéu-de-turco, ou hibisco-colibri (*Malvaviscus arboreus*), da planta daninha malva-preta (*Sidastrum micranthum*) e da cultivada algodão (*Gossypium* sp.) apresentando sintomas de mosaico intenso e bem definido, característicos das begomovirose, coletadas em diferentes regiões do Brasil, foram caracterizados molecularmente nesse trabalho.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Características dos geminivírus

Os geminivírus são vírus que infectam plantas e estão classificados na família *Geminiviridae*. Eles apresentam genoma circular organizado em uma ou duas moléculas de DNA de fita simples, cada uma delas com aproximadamente 2,5 a 3,0 kb de comprimento, sendo que o tamanho total do genoma varia de 2,5 a 6,0 kb. O genoma viral é encapsidado em partículas icosaédricas imperfeitas e geminadas, com diâmetro em torno de 18 e 30nm de comprimento, de onde deriva o nome da família (Harrison, 1985; Zhang et al, 2001). Estes vírus são encontrados basicamente no floema das plantas infectadas e, entretanto, alguns vírus podem atingir outros tipos de tecidos mais externos, como as células do mesófilo. Esta capacidade de colonizar o tecido epidérmico pode ser derivada de características genéticas adquiridas por algumas espécies, como por exemplo o *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) e também o *Bean golden mosaic virus* (BGMV), quando associado ao TGMV (Morra & Petty, 2000). A partir do momento em que a infecção foi estabelecida no ponto de inoculação, esta torna-se sistêmica, ou seja, atinge toda planta. A família *Geminiviridae* é formada por um grande número de vírus de plantas que causam significativas perdas em importantes culturas em campos cultivados no mundo inteiro (Rojas et al, 1993).

A família é dividida em quatro gêneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus*, os quais se diferenciam uns dos outros por meio da sua organização genômica, do tipo de vetor, do ciclo de hospedeiros e devido às similaridades nas sequências genômicas (Stanley et al, 2005). O gênero *Mastrevirus* possui apenas um componente genômico. Os mastrevírus podem ser transmitidos por mais de um gênero do inseto vetor vulgarmente conhecido por cigarrinha, classificado na família Cicadellidae, de forma circulativa e não propagativa (Mayo & Brunt, 2002). A espécie-tipo do gênero é o *Maize streak virus* (MSV), agente causal da doença da risca do milho e responsável por impor sérias barreiras à produção

alimentícia nos países africanos (Monjane et al, 2011). Todos os membros do gênero *Mastrevirus* apresentam gama de hospedeiro restrita às monocotiledôneas da família *Poaceae*, com exceção de duas espécies, *Tobacco yellow dwarf virus* (TYDV) e *Bean yellow dwarf virus* (BeYDV) que infectam dicotiledôneas (Mayo & Brunt, 2002). Os vírus do gênero *Curtovirus* são monossegmentados, ou seja, apresentam apenas um componente genômico. Os curtovírus são transmitidos por cigarrinhas do gênero *Circulifer* de forma circulativa e não propagativa (Hull, 2002b). A espécie-tipo do gênero *Curtovirus*, o *Beet curly top virus* (BCTV), é comum do México ao Canadá e na bacia do Mediterrâneo, ou seja, nas regiões banhadas pelo mar Mediterrâneo. O vírus tem uma ampla gama de hospedeiros, causando doença em mais de 300 espécies de plantas dicotiledôneas classificadas em mais de 44 famílias botânicas. O BCTV tem como hospedeiros mais comuns o *Beta vulgaris* (beterraba), motivo pelo qual foi nomeado, *Solanum lycopersicum* (tomate), *Capsicum* spp. (pimentas), *Phaseolus vulgaris* (feijão), *Solanum tuberosum* (batata), *Spinacia oleracea* (espinafre), plantas da família *Cucurbitaceae*, *Brassica oleracea* (repolho), *Medicago sativa* (alfafa) e muitas ornamentais. Além disso, o vírus pode sobreviver em muitas ervas daninhas, que podem atuar como hospedeiras alternativas e fontes do vírus (Mayo & Brunt, 2002; Shannon, 2001; Stanley et al, 2005). O vírus do gênero *Topocuvirus* apresenta uma organização genômica similar aos vírus do gênero *Curtovirus*, mas é transmitido pelo membracídeo *Micrutalis malleifera*, inseto homóptero, pertencente à família Membracidae. Apenas a espécie-tipo *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV) compõe o gênero e sua gama de hospedeiros ainda é pouco conhecida, sendo restrita às plantas dicotiledôneas, incluindo as ervas daninhas *Solanum nigrum*, popularmente conhecida como maria-pretinha, e *Datura stramonium*, conhecida como figueira-do-diabo, culturas como a do tomateiro e do feijoeiro e a hospedeira experimental *Nicotiana benthamiana* (Hull, 2002b; Stanley et al, 2005). O quarto e último gênero da família *Geminiviridae*, o *Begomovirus*, que possui como espécie-tipo o *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) e é o que possui mais espécies

reconhecidas atualmente, apesar de seus membros terem uma estreita gama de hospedeiros entre as espécies dicotiledôneas. Os begomovírus são transmitidos de maneira circulativa e não propagativa pelo aleirodídeo *Bemisia tabaci*, família Aleyroididae, e vulgarmente conhecido por mosca-branca. O genoma da maioria dos begomovírus é constituído de dois componentes, conhecidos como DNA-A e DNA-B, cada um com 2,5-3,0 kb de comprimento, apesar de alguns membros apresentarem genoma monossegmentado. O componente A dos begomovírus bipartidos pode se replicar sozinho e produzir partículas completas, mas necessita do componente B para estabelecer a infecção sistêmica (Hull, 2002b; Mayo & Brunt, 2002; Stanley et al, 2005).

2.2. Organização genômica dos geminivírus

As espécies atualmente descritas nos gêneros *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus* apresentam genoma com cinco a oito genes e uma região intergênica (IR). Os mastrevírus apresentam apenas três genes, mas duas regiões intergênicas, a grande “large intergenical region” (LIR) e a pequena “small intergenic region”(SIR) (Stanley et al, 2005; Varsani et al, 2009; Wright et al, 1997). Nas regiões intergênicas dos curtovírus, topocuvírus, begomovírus e na grande região intergênica dos mastrevírus, há uma sequência altamente conservada de nove nucleotídeos (motivo nonanucleotídeo): TAATATTAC localizada em uma estrutura de “stemloop”. A síntese de uma nova fita de DNA dos vírus pertencentes à família *Geminiviridae* inicia-se no corte da fita no sentido viral pela proteína associada à replicação (Rep) perto da extremidade 3` da sequência nonanucleotídica. A replicação ocorre por meio de uma forma intermediária de fita dupla através do mecanismo de círculo rolante. A síntese da fita complementar de DNA, formando uma fita dupla, depende unicamente de fatores do hospedeiro. Os geminivírus não codificam a DNA polimerase, com isso, são altamente dependentes da maquinaria celular do hospedeiro logo nos primeiros estádios da replicação. Em todos os casos, regiões codificadoras no sentido viral e no sentido complementar

divergem da região intergênica e a transcrição é bidirecional, com transcrições controladas de forma independente, iniciando na região intergênica (Gutierrez et al, 2004).

Regiões abertas de leitura, ou as “open reading frames” (ORFs), são localidades no genoma codificadoras de proteínas essenciais para o metabolismo viral. Os mastrevírus codificam duas ORFs no sentido viral, habitualmente chamadas de V1 e V2, e uma na fita complementar, C1:C2. A ORF V1 codifica a proteína de movimento célula-à-célula (MP), a ORF V2 a proteína da capa proteica (CP) e a ORF C1:C2 codifica a proteína fusionada Rep, que dará origem à própria Rep e à sua isoforma RepA, sendo esse grupo de vírus o único a possuir duas proteínas necessárias para replicação (Hull, 2002a; Varsani et al, 2009; Wright et al, 1997). Os curtovírus produzem de seis a sete proteínas. As ORFs V1, V2 e V3 estão no sentido viral e as ORFs C1, C2, C3 e C4 encontram-se no sentido complementar. O produto da ORF V1 é a CP, que é responsável pela encapsidação da fita simples do DNA viral, e está envolvida na movimentação viral e na transmissão pelo inseto vetor; o produto da ORF V2 está envolvido nos níveis relativos de DNA fita simples e fita dupla na demanda do processo de replicação viral; e a proteína V3 atua na movimentação celular, sendo uma proteína de movimento (MP). A ORF C1 codifica a proteína associada à replicação (Rep), requisitada na iniciação da replicação do DNA viral; a C2 resulta em uma proteína que atua no fator de patogenicidade de alguns hospedeiros; a proteína potencializadora da replicação (REn) é originada pela ORF C3; e a proteína C4 é uma importante determinadora de sintomas, que está relacionada ao controle do ciclo celular (Stanley et al, 2005). Os begomovírus podem ser constituídos por apenas um segmento de DNA, ou por dois segmentos, DNA-A e DNA-B. Os begomovírus bissegmentados codificam de cinco a seis genes no DNA-A, um ou dois no sentido viral (ORFs AV1 e AV2) e quatro no sentido complementar (ORFs AC1, AC2, AC3 e AC4). O DNA-B codifica duas proteínas, uma no sentido viral (BV1) e outra no sentido complementar da fita (BC1). O produto da ORF AV1 é a CP e o da AV2 é a proteína de movimento célula-à-célula, que somente está presente nos begomovírus do velho mundo. As

proteínas codificadas pela fita complementar do DNA-A estão todas envolvidas com a replicação e a expressão de sintomas. A ORF AC1 é responsável por originar a Rep, proteína associada à replicação viral; a AC2 é a proteína ativadora da transcrição (Trap); a AC3 é a proteína potencializadora da replicação (REn); e a AC4 é um importante fator na determinação dos sintomas, estando comprometida no controle do ciclo celular, além disso, ela pode combater uma resposta do hospedeiro à expressão da Rep. A ORF BV1 codifica no sentido viral do DNA-B uma proteína responsável pelo transporte nuclear do vírus na célula hospedeira e a BC1 está envolvida, igualmente com o produto da ORF AV2, quando houver, no movimento célula-à-célula. A organização dos begomovírus monossegmentados é essencialmente a mesma do DNA-A dos vírus bissegmentados (Hull, 2002a; Stanley et al, 2005). O DNA-A e o DNA-B possuem uma região de aproximadamente 200 nucleotídeos, denominada região comum (RC), que engloba o “stemloop” e a sequência raramente mutável de 9 nucleotídeos: TAATATTAC. Os segmentos de um mesmo vírus apresentam identidade maior do que 95% na região comum, porém esta região não é conservada entre os segmentos de diferentes vírus. Na região comum encontram-se sinais para reconhecimento de processos comuns para ambos os genomas (replicação, iniciação da transcrição e encapsidação) (Harrison, 1985). O genoma dos topocuvírus codifica seis proteínas e assemelha-se aos begomovírus monossegmentados. Comparações nas sequências nucleotídicas sugerem que a única espécie relatada no gênero, *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV), e os begomovírus divergiram depois de um evento de recombinação que alterou a especificidade do inseto vetor. A proteína da capa proteica está mais próxima àquelas associadas à transmissão por cigarrinhas dos curtovírus do que as moscas-brancas dos begomovírus. A proteína V2 dos topocuvírus, relacionada ao movimento celular, é distante geneticamente da mesma proteína dos curtovírus.

2.3. Taxonomia em begomovírus

Na tentativa de ordenar todos os isolados de begomovírus de uma maneira sistematizada, e com isso obter uma classificação homogênea, critérios de classificação são sugeridos pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV). De acordo com o último relatório do ICTV (King et al, 2012), inicialmente deve-se comparar a sequência do componente A (ou do genoma completo, se monopartido) do novo isolado de begomovírus com todas as sequências representativas das espécies. Caso a comparação entre as sequências seja igual ou inferior a 88% da espécie mais próxima, este novo isolado pertencerá a uma espécie distinta; se a identidade das sequências for entre 88% e 89%, pertencerá provavelmente à espécie mais próxima; e, se for superior a 89%, o novo isolado definitivamente pertencerá a esta espécie. Depois de cumprida esta etapa, deve-se comparar a sequência do novo isolado de begomovírus com todas as sequências representativas de estirpes e variantes das espécies já identificadas, se a identidade das sequências for menor do que 93%, o isolado pertence a uma nova estirpe da espécie em questão; e se a identidade das sequências for maior do que 94%, o novo isolado será uma variante de uma estirpe de uma espécie viral (King et al, 2012).

2.4. Moléculas satélites

Recentemente, observou-se que alguns begomovírus encontram-se associados a dois novos componentes de cadeia simples de DNA (Mansoor et al, 2003). Acredita-se que hospedeiras impuseram algumas limitações à colonização celular, o que levou à associação com formas replicativas menores de DNA circular de fita simples, as quais co-evoluíram independentemente com as plantas e resistiram às pressões seletivas do ambiente, os chamados DNAs satélites. Estas moléculas de ácido nucleico dependem de um auxiliar para sua replicação, mas são dispensáveis na replicação dele e não possuem identidade com seu genoma. O ganho dessas novas moléculas de DNA com tamanho aproximado de 1,4 kb, hoje

conhecidos como DNA- β e DNA- α , garantiu função essencial ao vírus auxiliar, análoga à aquisição do DNA-B pelos begomovírus bipartidos. A maioria dos satélites interfere na replicação de seus vírus auxiliares, aumentando a incidência da doença e atenuando os sintomas provocados por ela. Um pequeno número de satélites, no entanto, é conhecido por potencializar os sintomas, ou por produzir novos sintomas não associados ao vírus auxiliar (Bridson et al, 2004; Dry et al, 1997).

Os DNAs satélites têm sido observados em muitos begomovírus monopartidos e eram relacionados apenas a esse grupo no gênero, mas foi recentemente relatado por Paprotka (2010c) o primeiro DNA- α satélite associado aos begomovírus bipartidos. Os DNAs satélites estão amplamente disseminados no Velho Vundo, mas pouco se sabe sobre sua ocorrência no Novo Mundo. Estudos mostraram que o complexo DNA- β +begomovírus, como observado causando doenças do tipo “cotton leaf curl disease” (CLCuD) e “okra leaf curl disease” (OLCD) no Paquistão e “*Ageratum* yellow vein disease” (AYVD) em Singapura, é normalmente associado a um DNA- α satélite, indicando que essas moléculas possuem a mesma distribuição geográfica (Bridson et al, 2003; Paprotka et al, 2010c).

As moléculas satélites de DNA- β contêm três características conservadas: uma sequência rica em adenina, uma região conservada em todos os DNAs- β até agora identificados “the satellite conserved region” (SCR) e uma ORF terminal (β C1). A ORF β C1 é preservada no tamanho e na posição em todos os betasatélites e está envolvida na indução de sintomas, na determinação da gama de hospedeiros, supressão de silenciamento gênico pós-transcricional, movimento e na acumulação do vírus auxiliar e da molécula satélite. A região comum (SCR) das moléculas de DNA- β contém supostamente uma estrutura de “stemloop” com uma sequência conservada de nove nucleotídeos, como nos geminivírus, mas sem evidências de sítios de ligação para proteína Rep do vírus auxiliar. A sequência nonanucleotídica da molécula de DNA- β difere da dos geminivírus e assemelha-se a dos nanovírus e das moléculas de DNA- α , anteriormente conhecidas como DNA1: TAGTATTAC

(Briddon et al, 2004; Briddon et al, 2001; Dry et al, 1997). DNAs- α são um outro grupo de moléculas de DNA de fita simples associadas a begomovírus. Estas moléculas satélites diferem dos DNAs- β ao codificar uma proteína Rep similar aos nanovírus, habilitando a replicação autônoma nas células de plantas hospedeiras. DNAs- α não são requisitadas na proliferação do vírus auxiliar, ou na indução dos sintomas da doença, mas essas moléculas, como os DNAs- β , necessitam de um begomovírus auxiliar para seu movimento na planta e para sua encapsidação, permitindo a transmissão pelo inseto vetor (Briddon et al, 2001; Paprotka et al, 2010c).

2.5. Os begomovírus no mundo

As begomoviroses têm prejudicado a produção de importantes culturas, como feijão (*Phaseolus vulgaris*), mandioca (*Manihot esculenta*), algodão (*Gossypium* sp.), tabaco (*Nicotiana tabacum*) e tomate (*Solanum lycopersicum*), resultando em perdas significativas nas regiões tropicais e subtropicais (Graham et al, 2010). O aumento da população de mosca-branca biótipo B da espécie *Bemisia tabaci* provocou aumento na incidência de begomoviroses e no volume de perdas (Jovel et al, 2004). Perdas substanciais na cultura do tomateiro devido à infecção por diferentes begomovírus têm sido relatadas desde os anos 80 na Flórida, Caribe, México, Venezuela, América Central e Brasil (Polston & Anderson, 1997). Doenças causadas pelos begomovírus *Tomato yellow leaf curl virus* e *Tomato leaf curl virus* têm causado sérios danos em vários países do Mediterrâneo, África, Oriente Médio, Ásia e Austrália sendo, em alguns países, fator limitante na produção (Czosnek & Laterrot, 1997).

No Brasil, as culturas mais prejudicadas por infecções de begomovírus são feijoeiro e tomateiro. Em feijão, os begomovírus provocam perdas econômicas que podem variar de 30% a 100%, dependendo da cultivar, estágio de infecção da planta, população do vetor, presença de hospedeiros alternativos e condições ambientais (Quintela et al, 2008). Em estudos da

infecção de plantas de tomate por begomovírus foi observada uma redução de aproximadamente 60% na produtividade, sendo essa redução causada principalmente pela redução significativa do número médio de frutos por planta (Giordano et al, 2005). Após relatos de doenças transmitidas por mosca-branca ocorridos na década de 1950 (Costa, 1955; Costa & Bennett, 1950), Costa (1965) foi o primeiro a descrever o *Bean golden mosaic virus* (BGMV) no estado de São Paulo, um dos agentes etiológicos do mosaico dourado do feijoeiro. Na época, era considerada uma doença de importância econômica secundária, mas logo se espalhou tornando-se a doença mais importante em feijoeiros no Brasil, afetando principalmente os estados de Minas Gerais e Paraná (Gilbertson et al, 1991). O aumento populacional de seu inseto vetor, a mosca-branca *Bemisia tabaci* biótipo A, durante a década de 70, foi determinante para a disseminação do BGMV no Brasil (Costa, 1965). O primeiro relato mundial de begomovírus em tomateiro ocorreu no estado de São Paulo, em 1960 (Flores et al, 1960). O agente etiológico foi posteriormente caracterizado e denominado *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), também transmitido por *Bemisia tabaci* (Matyis et al, 1975). Apesar do primeiro relato de begomovírus infectando plantas de tomate no país ter sido feito há mais de 40 anos, as infecções por begomovírus só se tornaram relevantes economicamente para a cultura em meados dos anos de 1990. Plantas de tomate no estado de São Paulo com sintomas de amarelecimento das nervuras, mosaico e deformação foliar foram observadas em mais de 20% dos campos cultivados, sintomas semelhantes aos transmitidos por mosca-branca de plantas doentes de tomate à batateira e tomateiro sadios (Faria et al, 1997). DNA-A e DNA-B foram clonados a partir das amostras de tomateiro sintomáticas do campo, constatando-se a presença de begomovírus que foi previamente denominado “tomato yellow vein streak geminivirus”, sendo posteriormente conhecido com *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) (Faria et al., 1997). O aumento da incidência de begomovírus em plantas de tomate coincidiu com o surgimento do biótipo B de *Bemisia tabaci*, que ao

contrário do biótipo A, rapidamente colonizou plantas da família *Solanaceae*, como o tomateiro (Ribeiro et al, 1998).

Logo após o aparecimento de moscas-brancas na região do Submédio do Vale São Francisco, região situada nos estados de Pernambuco e Bahia, no segundo semestre de 1995, notou-se nos anos seguintes o aparecimento de sintomas típicos de begomovírus como paralisação do crescimento da planta, folíolos pequenos, encarquilhados, coriáceos, com bordos voltados para cima e com mosaico em plantios de tomateiro e na cultura do pimentão (*Capsicum annuum*), com perdas de até 30% em tomateiro e incidência de 10% a 20% em pimentão (Lima et al, 2001). Ambrozevicius et al. (2002) analisando geneticamente a variabilidade de geminivírus infectando tomateiros e algumas plantas daninhas associadas na região Sudeste do Brasil, além do tomateiro, detectaram begomovírus em três amostras diferentes de plantas daninhas: *Sidastrum micranthum*, *Blainvillea rhomboidea* e em um tipo selvagem de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*). Os autores observaram que os isolados de begomovírus extraídos das plantas de tomate e das plantas daninhas associadas aproximavam-se filogeneticamente, sugerindo que os hospedeiros naturais têm um importante papel como reservatório de espécies de begomovírus e que os vírus de tomate estão evoluindo a partir de plantas daninhas, devido principalmente a recombinações e pseudorecombinações. Ribeiro et al. (2003) e Santos et al. (2004) testaram diferentes solanáceas hospedeiras de begomovírus isolados de tomateiro em diferentes estados do Brasil e observaram que pimenta (*Capsicum chinense*), pimentão (*Capsicum annuum*), *Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. rustica*, *N. tabacum*, e as daninhas figueira-do-diabo (*Datura stramonium*), joá-de-capote (*Nicandra physaloides*) e bucho-de-rã (*Physalis floridana*) eram suscetíveis a begomovírus. Bezerra-Agasie et al. (2006) relataram a primeira ocorrência de begomovírus infectando pimenta no Brasil. Amostras de uma pimenta dedo-de-moça (*Capsicum baccatum* var. *pendulum*) apresentando sintomas de mosaico e distorção foliar foram coletadas em Petrolina de Goiás. Análises posteriores mostraram que a planta estava infectada com o begomovírus *Tomato*

severe rugose virus (ToSRV). Assunção et al. (2006) analisaram dez espécies de plantas daninhas na região Nordeste para a presença de *Begomovirus*, algumas ainda não tinham sido relatadas como hospedeiras do gênero. As espécies estudadas foram coletadas nos estados de Alagoas, Pernambuco e Bahia com sintomas de mosaico amarelo, deformação do limbo foliar e redução do crescimento. Da família *Capparaceae* foi encontrada mussambê (*Cleome affinis*); *Euphorbiaceae*, cansanção (*Cnidoscolus urens*); *Fabaceae*, carrapicho (*Desmodium* sp.) e feijão-de-rolinha (*Macroptilium lathyroides*); *Malvaceae* foram encontradas malva-guanxuma (*Sida rhombifolia*), mela-bode (*Herissantia crispa*), mela-veludo (*Sidastrum micranthum*) e malva (*Sida spinosa*); e, da família *Sterculiaceae*, carrapicho (*Triumfetta semitriloba*) e malva-sedosa (*Waltheria indica*). *H.crispa*, *W. indica*, *T. semitriloba* e *Desmodium* sp. ainda não tinham sido relatadas como hospedeiras desses vírus no Brasil e no mundo, até o momento. No mesmo ano, um complexo viral causador de mosaico dourado e rugosidade nas folhas de tomateiro foi extraído de moscas-brancas virulíferas. O complexo foi inoculado mecanicamente em plantas de tomate e *Nicotiana benthamiana*, sendo em seguida isolado um novo begomovírus capaz de causar infecções sistêmicas em tomateiro e *N. benthamiana* denominado de *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) (Fernandes et al, 2006). Souza-Dias et al. (2008) analisando amostras de batata (*Solanum tuberosum*) com moscas-brancas, relataram pela primeira vez ToSRV ocorrendo nessa solanácea. Castillo-Urquiza et al. (2008) relataram a ocorrência de seis novas espécies de begomovírus infectando tomate e plantas daninhas associadas na região Sudeste: Tomato mild mosaic virus (ToMMV), Sida common mosaic virus (SiCMV), Tomato leaf distortion virus (ToLDV), Blainvillea yellow spot virus (BIYSV), Sida yellow leaf curl virus (SiYLCV) e Tomato common mosaic virus (ToCMV). Fernandes et al. (2009) reportou a ocorrência de três espécies distintas de begomovírus infectando soja (*Glycine max*) no estado de Goiás: *Bean golden mosaic virus* (BGMV), *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV) e Okra mottle virus (OMoV). Okra mottle virus (OMoV) foi uma nova espécie descrita e caracterizada completamente por Aranha et al.

(2011). O vírus foi isolado de quiabeiros no estado de Goiás e no Distrito Federal. Fernandes et al. (2011) caracterizaram completamente um begomovírus brasileiro da planta daninha amplamente distribuída no Brasil *Euphorbia heterophylla* pertencente a uma linhagem diferente do *Euphorbia mosaic virus* isolado da América Central e próximo ao *Euphorbia mosaic Peru virus* (EuMPV), sendo proposto o nome *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV).

Em geral, os begomovírus possuem limitado número de hospedeiros. A predominância de solanáceas entre os hospedeiros já foi relatada por Pooma et al. (1996) para TGMV, um dos begomovírus de tomateiro melhor caracterizado. O *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), ainda que afete espécies de outras cinco famílias, infecta principalmente membros da família *Solanaceae*, principalmente tomate e fumo (Picó et al, 1996). E, quando se diz respeito às plantas daninhas, as espécies relatadas geralmente pertencem às famílias *Malvaceae*, *Euphorbiaceae* e *Fabaceae* (Morales & Anderson, 2001b).

Atualmente, existem dez espécies definitivas de begomovírus bipartidos descritas no Brasil, dez tentativas, que de acordo com Fauquet et al. (2003), espécie tentativa é o vírus para o qual não há informação suficiente para permitir designação como espécie, e treze espécies foram propostas, mas ainda não foram caracterizadas como espécies tentativas. As espécies aceitas descritas em plantas cultivadas são: *Bean golden mosaic virus* (BGMV), *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV), *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) e *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) (Castillo-Urquiza et al, 2008; Costa, 1965; Fernandes et al, 2008; Flores et al, 1960; Inoue-Nagata et al, 2006; Ribeiro et al, 2007). Três espécies definitivas foram descritas em plantas daninhas: *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV), *Sida mottle virus* (SiMoV) e *Sida yellow mosaic virus* (SiYMV) (Castillo-Urquiza et al, 2008; ICTV, 2011; Jovel et al, 2004; Paprotka et al, 2010c) (King et al, 2012).

Dez espécies tentativas foram descritas no Brasil: Blainvillea yellow spot virus (BIYSV), Okra mottle virus (OMoV), Passionfruit severe leaf distortion virus (PSLDV), Sida yellow leaf curl virus (SiYLCV), Sida common mosaic virus (SiCMV), Tomato common mosaic virus (ToCMV), Tomato crinkle yellow leaf virus (ToCYLV), Tomato leaf distortion virus (ToLDV), Tomato mild leaf curl virus (ToMLCV) e Tomato mild mosaic virus (ToMMV) (Aranha et al, 2011; Castillo-Urquiza et al, 2008; Fernandes et al, 2006; Ferreira et al, 2010). Aproximadamente, doze espécies de begomovírus foram propostas no país: Abutilon mosaic Brazil virus (AbMBV), Cleome leaf crumple virus (CILCrV), Leonurus mosaic virus (LeMV), Passion flower little leaf mosaic virus (PFLLMV), Sida mosaic Brazil virus (SiMBV), Tomato crinkle virus (ToCV), Tomato golden vein virus (TGVV), Tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV), Tomato infectious yellows virus (TIYV), Tomato severe mosaic virus (ToSMV), Tomato chlorotic vein virus (ToCVV) e Tomato interveinal chlorosis virus (ToICV). (Albuquerque et al, 2012; Faria & Maxwell, 1999; Novaes et al, 2003; Paprotka et al, 2010c; Ribeiro et al, 2003).

A primeira descrição de begomovírus monopartido no Brasil foi feita recentemente infectando plantas de batata-doce (*Ipomoea batatas*), família *Convolvulaceae* (Paprotka et al., 2010a). De acordo com os últimos relatos de begomovírus em batateira-doce, as espécies definitivas *Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV) e *Sweet potato leaf curl Georgia virus* (SPLCGoV) e as espécies propostas Sweet curl golden vein-associated virus e Sweet potato leaf curl São Paulo virus são relatadas no Brasil (Albuquerque et al, 2011; ICTV, 2011; Paprotka et al, 2010a).

2.6. Begomovírus em malváceas

Begomovírus estão associados com diversas doenças infectando malváceas no Velho Mundo. Partículas geminadas foram purificadas de plantas de quiabo (*Abelmoschus esculentus*) com sintomas de enrolamento foliar na Costa do Marfim por Fauquet &

Thouvenel (1987), enquanto que Swanson & Harrison (1993) e Konate et al. (1995) após estudos sorológicos com diferentes isolados de plantas de algodão e quiabo na África, confirmaram a presença de geminivírus em plantas sintomáticas. Idris & Brown (2000) relataram um isolado típico de DNA-A de begomovírus a partir de uma planta de algodão com sintomas de deformação foliar no Sudão. Sanz et al. (2000) por meio da utilização de hibridização no Paquistão revelaram que um complexo numeroso de genótipos de begomovírus infecta de uma forma não específica uma variedade de plantas da família *Malvaceae*, tais como as cultivadas algodoeiro e quiabeiro e as ornamentais hibisco (*Hibiscus* spp.) e malva-rosa (*Althea rosea*).

A “cotton leaf curl disease” (CLCuD) é uma séria doença que afeta o algodoeiro e outras malváceas. A doença é originária da Índia e foi descrita em 1985, mas já havia relatos de sua ocorrência desde 1967. No início dos anos de 1990, CLCuD se tornou a maior limitação à produção algodoeira no Paquistão, disseminando-se pela Índia (Briddon & Markham, 2000). O agente etiológico da doença foi transmitido por *Bemisia tabaci*, associando-o a um begomovírus (Mansoor et al, 1993). Este vírus foi previamente chamado de *Cotton leaf curl virus* (CLCuV), apesar de nenhuma relação ter sido estabelecida entre o vírus e a doença (Briddon et al, 2000). Parte do problema foi solucionado quando clones completos de CLCuV, equivalentes ao DNA-A, foram obtidos. Os clones infectaram sistematicamente plantas de *Nicotiana benthamiana* e algodoeiro, mas as plantas suscetíveis não apresentaram os sintomas típicos da doença, apresentando enrolamento leve da folha, amarelecimento e algum nanismo, quando os verdadeiros sintomas incluíam enrolamento foliar, escurecimento e alargamento das nervuras e enações que frequentemente tomavam forma de taça, como se fossem estruturas foliares na parte abaxial das folhas (Briddon et al, 2000; Briddon & Markham, 2000). A diferenciação nos sintomas das plantas inoculadas com clones de CLCuV sugeriu que o vírus CLCuV não era o agente etiológico da “cotton leaf curl disease” (CLCuD), ou que não era a única causa (Briddon et al, 2000).

Mansoor et al. (2000) reportaram uma nova molécula circular de DNA com aproximadamente metade do tamanho de um DNA-A de begomovírus associada ao CLCuV e que compartilhava semelhança com os nanovírus. Estas moléculas eram capazes de se replicar sozinhas nas células hospedeiras, mas requeriam o CLCuV para se movimentar pela planta, assim como para serem transmitidas pelo inseto vetor e não desempenhavam nenhum papel na indução dos sintomas. Estas foram chamadas de DNA 1. Posteriormente, uma nova molécula de DNA de fita simples de aproximadamente 1350 nucleotídeos de comprimento também associada ao CLCuV foi identificada e isolada e, quando inoculada juntamente com CLCuV, induzia os mesmos sintomas da CLCuD, incluindo o alargamento e escurecimento das nervuras, enrolamento foliar e enações. Esta molécula foi então chamada de DNA-β e requeria o CLCuV para replicação e encapsidação (Bridson et al, 2001). Bridson (2003) observou que todas os begomovírus isolados de plantas com sintomas de CLCuD, para os quais clones infecciosos foram produzidos, eram monopáticos e tinham organização genômica típica dos begomovírus do Velho Mundo. Além disso, relatou que cinco diferentes espécies de begomovírus foram isoladas de plantas afetadas por CLCuD na Índia: *Cotton leaf curl Alabad virus* (CLCuAV), *Cotton leaf curl Kokhran virus* (CLCuKV), *Cotton leaf curl Multan virus* (CLCuMV), *Cotton leaf curl Rajasthan virus* (CLCuRV), *Papaya leaf curl virus* (PaLCuV). A maioria das plantas de algodão afetadas pela CLCuD mostraram-se infectadas por duas ou mais espécies de begomovírus. No entanto, apenas um único tipo de DNA-β foi identificado em todas as plantas, sugerindo que o DNA-β associado à CLCuD é capaz de recrutar diferentes begomovírus para o sucesso da epidemia e demonstrando a natureza de inespecificidade do satélite (Mansoor et al, 2003). Dessa forma, elucidou-se que “cotton leaf curl disease” é causada por um complexo de begomovírus com mais de um componente (Bridson et al, 2003).

Doenças em algodoeiros associadas a begomovírus têm sido relatadas em duas outras regiões no mundo, na África e nas Américas/Caribe. “Cotton leaf crumple disease” (CLCrD)

é uma doença que ocorre no sul da América do Norte e na América Central (Briddon et al, 2003). Esta doença foi registrada em algodoeiros em 1984, no estado do Arizona, Estados Unidos, causando uma das maiores epidemias do estado. A doença CLCrD foi relatada em 1981 e posteriormente foi associada a um geminivírus pelo fato de ser transmitida por *Bemisia tabaci* e por ter sido detectada partículas típicas de geminivírus ao microscópio eletrônico em amostras de algodoeiro e feijoeiro com sintomas da doença (Brown & Nelson, 1984). Mais tarde, o genoma de um begomovírus extraído de plantas apresentando os sintomas de CLCrD e na mesma região da primeira descrição foi clonado, completamente sequenciado e teve os postulados de Koch cumpridos, sendo denominado *Cotton leaf crumple virus* (CLCrV). Este begomovírus apresentou características singulares, pois a região comum entre os componentes A e B mostrou uma baixa identidade nucleotídica e análises de sequência mostraram que o DNA-A provavelmente pode ter sido derivado de ancestrais de dois clados diferentes do hemisfério ocidental, fortes indícios de pseudorecombinação e recombinação, respectivamente (Idris & Brown, 2000). Além disso, é geneticamente distante dos begomovírus no complexo da doença “cotton leaf curl disease” (CLCuD) (Briddon et al, 2003).

O quiabeiro é uma importante malvacea cultivada nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Os vírus impõem sérios limites à produção dessa hortaliça em países africanos, asiáticos e do Oriente Médio. Os begomovírus *Okra yellow vein mosaic virus* (OYVMV), *Bhendi yellow vein mosaic virus* (BYVMV) e *Okra leaf curl virus* (OLCuV) e o tymovírus *Okra mosaic virus* (OkMV) já foram relatados causando as principais viroses do quiabeiro (Ali et al, 2000; Ghanem, 2003; Jose & Usha, 2003; N'Guessan et al, 1992; Ndunguru & Rajabu, 2004; Sanz et al, 2000).

O OYVMV e BYVMV são reponsáveis por causar a doença “yellow vein mosaic disease”, principal doença do quiabeiro na Índia. A doença também é causada por um complexo, como CLCuD, pois necessita de um outro componente para sua viabilidade, o

DNA-β. As plantas infectadas apresentam clareamento de nervuras seguido de mosaico difuso na folhas, os frutos apresentam má formação e toda planta tem o tamanho reduzido, resultando na queda da produção, podendo ser maior do que 96% dependendo do estágio de infecção da planta e com incidência de até 100% na plantação (Ali et al, 2000; Jose & Usha, 2003).

O OLCuV é um vírus de grande ameaça na produção de quiabo em diversas partes da África Ocidental e do Oriente Médio, tornando-se a causa da doença mais séria do quiabeiro nessas regiões. Sintomas de nanismo grave, folha encurvilhada, curvada, má formação, enação e necrose das nervuras são associados à doença, que pode ter incidência de 15% a 70% dependendo da idade da planta (Ghanem, 2003; Ndunguru & Rajabu, 2004).

Okra mosaic virus (OkMV) foi relatado a primeira vez em 1969 ocasionando clorose, mosaico e escurecimento de nervuras em folhas de quiabeiro na Costa do Marfim (Givord & Hirth, 1973). OkMV é um tymovírus com simetria icosaédrica, formado de RNA e transmitido tanto mecanicamente quanto pelo besouro *Podagrica decolorata* (Givord & Boer, 1980). As características biológicas e a sequência completa do genoma são conhecidas para um isolado nigeriano (Stephan et al, 2008). A incidência da doença pode variar de 30% a 89% nos campos cultivados e, comparado com plantas saudáveis, a redução no peso é de 19,5% e nos frutos é de 34,7%, levando a perdas de 12% a 19,5% na produtividade (Ndunguru & Rajabu, 2004; Stephan et al, 2008).

Atualmente, são relatados os seguintes begomovírus em quiabeiro: *Abutilon mosaic virus* (AbMV), *Bhendi yellow vein mosaic virus* (BYVMV), *Okra yellow crinkle virus* (OYCrV), *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OYMMV), *Okra yellow mottle Iguala virus* (OYMoIgV), *Okra yellow vein mosaic virus* (OYVMV), *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV), *Pepper huasteco yellow vein virus* (PepHYVV), *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV), *Okra leaf curl Bihar virus* (OLCBV), *Okra leaf curl Cameroon virus* (OLCCM), *Okra mottle virus* (OMoV), *Okra leaf curl virus* (OLCuV), *Okra mosaic Mexico virus*

(OMMV) (Aranha et al, 2011; Fauquet et al, 2008; ICTV, 2011). Plantas de malva-rosa (*Althea rosea*) com sintomas de enações e enrolamento foliar frequentemente observadas no Egito serviram de fonte de transmissão por moscas-brancas para plantas saudáveis da mesma espécie. Estas expressaram sintomas muito similares ao alargamento das nervuras típico de CLCuD. A hipótese de que uma população de begomovírus poderia infectar malva-rosa levou à determinação de uma sequência de DNA-A típica de begomovírus monopartido, com a possibilidade de DNA satélite, indicando como nova espécie: *Althea rosea enation virus* (AREV) (Bigarre et al, 2001).

O hibisco (*Hibiscus cannabinus* e *Hibiscus sabdariffa*) é cultivado na Índia principalmente para produção de fibras, utilizadas por muitas agroindústrias e para fins medicinais. A Índia é maior importador de fibras derivadas do hibisco devido a ocorrência de doenças, principalmente doenças virais, causando quedas de produtividade. Recentemente, uma doença viral caracterizada por amarelecimento das folhas, seguida por uma forte clorose, conhecida como “mesta yellow vein mosaic disease”, tem sido disseminada em áreas de cultivo de hibisco por diversos estados da Índia. A incidência nos campos tem sido de 92,5% em *H. sabdariffa* e de 89,5% em *H. cannabinus* (Chatterjee et al, 2008; Das et al, 2008). Chatterjee et al. (2005) relataram que a doença era transmitida por mosca-branca ou por enxertia, e observações ao microscópio revelaram associação com partículas geminadas de 20 x 30 nm de tamanho. Testes de hibridização sugeriram a possibilidade de associação da doença com o DNA-A e com o satélite DNA-β, depois ampliações por PCR confirmaram o envolvimento de um begomovírus na doença (Chatterjee & Ghosh, 2007b). Um DNA-β e um genoma completo de DNA-A de um begomovírus infectando hibisco foi clonado e sequenciado. Este genoma era homólogo ao DNA-A de begomovírus monopartidos originários do Velho Mundo, propondo o nome da nova espécie como *Mesta yellow vein mosaic virus* (MeYVMV) (Chatterjee & Ghosh, 2007b; Chatterjee & Ghosh, 2007a).

No Brasil, Costa (1954) observou que o mosaico comum do algodoeiro era causado pelo mesmo vírus da clorose infecciosa das malváceas e que, provavelmente, o inseto vetor, embora capaz de infectar o algodoeiro, dificilmente tornava-se virulífero quando alimentado em plantas de algodão infectadas pelo, então, mosaico comum do algodoeiro. O autor relatou também que plantas de *Sida micrantha* (sinônimo de *Sidastrum micranthum*) poderiam atuar como boas fontes de vírus da clorose infecciosa das malváceas. Além disso, observou que apenas em condições excepcionais o ataque pelo mosaico comum atingia porcentagem elevada, embora moscas-brancas fossem bastante comuns nas plantações e sempre existiam algumas plantas infectadas pela doença. Concluiu dizendo que provavelmente a infecção de plantas nos algodoads se dava a partir de insetos que se tornaram virulíferos por terem se alimentado em plantas infectadas do gênero *Sida* e que passaram posteriormente a se alimentar em plantas de algodão. Dessa forma, a transmissão de algodoeiro para algodoeiro deveria ser rara e que mesmo nos casos de infecção tardia observados em algodoads poderiam ser devido a insetos virulíferos provenientes de plantas de *Sida*, que muitas vezes estavam presentes na própria plantação, ou nas proximidades. Aranha et al. (2011) caracterizaram um begomovírus isolado de quiabeiros observados em áreas produtoras no Distrito Federal e no estado de Goiás, a partir de plantas com mosaico e pontos cloróticos nas folhas, sintomas anteriormente associados à clorose infecciosa das malváceas (Kitajima, 1979).

Uma grande variedade de plantas daninhas hospedeiras de begomovírus estão classificadas na família *Malvaceae*, entre elas muitas estão no gênero *Sida*. Além disso, begomovírus têm sido propagados por meio de plantas ornamentais também pertencentes à família *Malvaceae*, por exemplo plantas do gênero *Abutilon* são hospedeiras do begomovírus Abutilon mosaic Brazil virus (AbMBV), apresentando sintomas característicos de clorose variegada na folhagem (Paprotka et al, 2010b). Inicialmente, os vírus encontrados infectando plantas daninhas, plantas ornamentais e plantas cultivadas da família *Malvaceae* eram chamados unicamente de vírus da clorose infecciosa das malváceas e acreditava-se que estava

relacionado ao *Abutilon mosaic virus* (AbMV). Posteriormente, tornou-se evidente a presença de distintas espécies de begomovírus nos isolados do Brasil e da América Central. Diversas espécies virais, como *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV), *Sida mottle virus* (SiMoV), *Sida common mosaic virus* (SiCMV), foram relacionados à doença causadora de mosaico em *Sida micrantha*, doença que era anteriormente associada a uma estirpe brasileira do AbMV (Castillo-Urquiza et al, 2008; Jovel et al, 2004; Paprotka et al, 2010b). Embora, até o momento, as plantas daninhas não se mostraram como potenciais reservatórios de espécies de begomovírus virulentos para plantas cultivadas, aquelas ainda podem exercer papel como fonte de vírus para importantes culturas, já que estão inseridas ao redor, ou entre a plantação. Além disso, ervas daninhas podem ser hospedeiras alternativas para begomovírus importantes agronomicamente (Graham et al, 2010).

2.7. Importância econômico-social de plantas malváceas cultivadas

O malvavisco (*Malvaviscus arboreus*), hibisco-colibri ou chapéu-de-turco, é um arbusto lenhoso, nativo do México e é frequentemente utilizado como cerca-viva. As flores são em formato de sino, permanecendo semi-fechadas e florindo o ano inteiro e a coloração varia de tons de rosa a vermelho. Plantas de malvavisco com intenso mosaico dourado são ocasionalmente encontradas no Brasil, acreditando-se ser um begomovírus responsável pela expressão desse sintoma (Kitajima et al, 2010).

A cultura do algodoeiro no Brasil, caracterizada essencialmente pelo algodão herbáceo (*Gossypium hirsutum*), realizada em condições de sequeiro destaca-se como uma das mais importantes para a região Nordeste do Brasil, em especial para os pequenos e médios produtores, tendo assim importância social e econômica muito elevada para o agronegócio nordestino, sendo que esta região é na atualidade um dos maiores pólos de consumo industrial de algodão da América Latina, junto com o Estado de São Paulo e o México (Azevêdo et al, 2006). Uma das grandes vantagens desta atividade é que mais de 75% do custo de produção é

com mão-de-obra, o que significa ocupação para milhares de trabalhadores rurais. O algodão produzido pelas pequenas propriedades na região Nordeste é todo colhido a mão, o que proporciona, quando esta operação é bem feita, a obtenção de um produto de elevada qualidade intrínseca, ou seja, de tipo superior, de 4,5 a 5,0 na classificação de fibra pelo HVI com qualidade intrínseca da fibra superior, especialmente a reflectância a finura, a resistência e a fiabilidade. Os pequenos produtores de algodão herbáceo no Nordeste têm grande tradição com o cultivo desta malvácea e utilizam poucos insumos, principalmente fertilizantes inorgânicos, herbicidas e inseticidas, tendo assim a grande vantagem com relação às demais áreas de produção do Brasil de ter um custo de produção bem menor, o que eleva a rentabilidade, apesar de ter um potencial de produção bem menor do que, por exemplo, o do Mato Grosso, condições de cerrado com grandes produtores (Azevêdo et al, 2006).

Como alternativa para rotação com a soja, os produtores do Centro-Oeste viram no algodão uma grande oportunidade de negócios. A segunda metade da década de 90 significou um marco na migração da cultura do algodoeiro, das áreas tradicionalmente produtoras para o cerrado brasileiro. Hoje esta região responde por 84% da produção brasileira de algodão, tendo o estado de Mato Grosso como maior produtor brasileiro. O sucesso da cultura do algodoeiro no cerrado tem sido impulsionado pelas condições de clima favorável, terras planas, que permitem mecanização total da lavoura, programas de incentivo à cultura implementada pelos estados da região e, sobretudo, o uso intensivo de tecnologias modernas. Este último aspecto tem feito com que o cerrado brasileiro detenha as mais altas produtividades na cultura do algodoeiro no Brasil e no mundo, em áreas não irrigadas (Richetti et al, 2003).

A produção agrícola do algodão herbáceo em caroço teve um aumento de 72,6% na safra de 2011 em relação à safra de 2010 e para a safra de 2012 espera-se um aumento de 2,2% na produção em relação ao ano anterior. Ainda, estima-se para 2012 um aumento na área a ser colhida do produto (IBGE, 2011). Análises de produtividade demonstraram que a

infecção de algodoeiro por begomovírus causam prejuízos na produtividade da planta como observado em outras culturas, porém, são importantes outras análises, como peso dos capulhos (Allem et al, 2011). Costa & Carvalho (1962) relataram que a produção de plantas de algodão infectadas com begomovírus, causando a doença conhecida como mosaico comum do algodoeiro, tinham perda de até 50% na produção de capulhos e que em ensaios efetuados em 1954 e 1955, mudas inoculadas com o vírus e depois levadas a campo tinham redução na produção de capulhos maior do que 50%.

3. Material e Métodos

3.1. Fonte de vírus e extração de DNA total

Os isolados virais utilizados no trabalho foram coletados em três regiões brasileiras distintas: Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste. Em agosto de 2009, nove amostras de plantas de algodoeiro apresentando mosaico amarelo nas folhas e deformação foliar foram coletadas em casa de vegetação na Embrapa Algodão, na cidade de Campina Grande, no estado da Paraíba (Figura 1). As nove amostras de algodoeiro B009, B012, B015, B016, B022, B027, T4, T30 e T51 tiveram os DNAs totais extraídos e encaminhados ao laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Hortaliças. No mesmo período, seis amostras de plantas ornamentais de hibisco-colibri (hibisco-colibri 1, hibisco-colibri 2, hibisco-colibri 3, hibisco-colibri 4, hibisco-colibri 5 e hibisco-colibri 6) com sintomas de mosaico dourado foram coletadas na cidade do Rio de Janeiro, estado do Rio de Janeiro (Figura 2). E, em novembro de 2010 amostras de uma planta de malva-preta com fortes sintomas de mosaico dourado foram coletadas no Jardim Zoológico de Brasília, Distrito Federal (Figura 3).



Figura 1. Plantas de algodoeiro com sintomas de begomovírus: mosaico amarelo nas folhas e distorção foliar.



Figura 2. Plantas de hibisco-colibri com forte sintoma de clorose nas folhas



Figura 3. Planta de malva-preta com sintoma de mosaico dourado

O DNA total das amostras de hibisco-colibri e de malva-preta foi extraído através do método desenvolvido por Doyle & Doyle (1987). Três discos foliares de 1cm de diâmetro foram macerados em tubos de microcentrífuga de 1,5ml, contendo 650 μ l de tampão CTAB (2% de CTAB; 100mM de tris-HCl, pH8,0; 50mM de NaCl e 0,2% de 2- β -mercaptoetanol). A maceração foi realizada em dois ciclos de 30 segundos a 2000 rpm em agitação (Precellys – Bertin Technologies) e a seguir os tubos foram incubados à temperatura de 65°C por 5

minutos. Em seguida foram adicionados 650µl de clorofil (24 clorofórmio:1ácool isoamílico) e agitados (vórtex) vigorosamente. Os tubos foram então centrifugados por 5 minutos a 12000 rpm em microcentrífuga. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e a este adicionado 300µl de isopropanol. Após agitação lenta dos tubos, os mesmos permaneceram à temperatura ambiente por 20 minutos para precipitação do DNA. Após este período os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (pellet) lavado duas vezes com 400µl de etanol 70% gelado. Após as lavagens o sobrenadante foi eliminado e o precipitado foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 300µl de água pura filtrada e autoclavada.

O DNA total de algodoeiro foi extraído pela equipe da Dra. Lúcia Hoffmann, Embrapa Algodão, basicamente como descrito anteriormente para as demais plantas.

3.2. Método de detecção por PCR e amplificação por RCA

Os DNAs totais de *Malvaviscus arboreus* e de *Sidastrum micranthum* foram submetidos à amplificação por PCR utilizando primers universais para detecção do DNA-A de begomovírus (pAR1c496 e pAL1v1978) (Rojas et al, 1993). A reação de PCR consistiu de 1,0µl do tampão 10X da enzima *Taq* polimerase (100mM tris-HCl, pH8,3, e 500mM KCl, Invitrogen), 0,8µl de MgCl₂ (50mM, Invitrogen), 0,4µl de dNTPs (2,5mM, GE Healthcare), 0,1µl de cada primer (10µM), 0,1µl da enzima *Taq* polimerase (5U/µl Invitrogen), 6,5µl de água estéril e 1µl de DNA (10ng). A amplificação ocorreu por meio de uma desnaturação inicial das fitas de DNA por 5 minutos a 94°C, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e uma extensão de 72°C por 90 segundos; e, finalizando, uma extensão final de 5 minutos a 72°C. O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose 1% em TBE 0,5X e corado com brometo de etídeo.

Os DNAs totais de algodoeiro foram submetidos à amplificação por PCR pela equipe da Dra. Lúcia Hoffmann, Embrapa Algodão, utilizando primers universais PAL1v1978 e

PCR_{v19} (Rojas et al., 1993). A reação de PCR foi realizada com volume de 15µl contendo aproximadamente 10ng de DNA molde, com a concentração final dos primers de 0,1µM. *Taq* polimerase, dNTP e o tampão da reação foram utilizados de acordo com as recomendações do fabricante (Invitrogen). A amplificação foi realizada com uma desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturação à 94°C por 1 minuto, anelamento à 55°C por 1 minuto e a extensão à 72°C por 2 minutos; para completar uma extensão final à 72°C por 10 minutos. O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose e corado com brometo de etídeo.

3.3. Amplificação por círculo rolante e digestão com enzimas de restrição

Os DNAs totais das amostras foram submetidos à amplificação por círculo rolante (RCA) (Inoue-Nagata et al, 2004) e, em seguida, cada DNA viral amplificado foi digerido com diferentes enzimas de restrição para selecionar aquela enzima que cliva o genoma em um único ponto.

As amostras foram digeridas separadamente com seguintes enzimas: *SacI*, *PstI*, *HindIII*, *EcoRI*, *BamHI*, *EcoRV*, *ClaI*, *XhoI*, *KpnI*, *XbaI*, *SmaI* e *SphI*. As reações de digestões foram feitas com 1µl de produto de RCA, 0,2µl de enzima (10u/µl), tampão universal 10X “One For All” (Pharmacia) com a concentração variando com o tipo de enzima utilizada, completando com água estéril o volume da reação para 10µl. Os produtos das digestões foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 0,5X e corado com brometo de etídeo.

Os produtos das digestões de hibisco-colibri separados em gel de agarose foram transferidos e fixados 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 para detecção, utilizando nucleotídeos marcados com

digoxigenina, gerada a partir de PCR, específica para detectar DNA-A conforme descrita por Santana et al. (2007).

3.4. Clonagem e purificação plasmidial

Selecionou-se as enzimas para a clonagem genômica dos isolados de begomovírus: PstI (DNA-A) e SacI (DNA-B) para hibisco-colibri, XbaI (ambos componentes) para algodoeiro e BamHI (ambos componentes) para malva-preta. Após a escolha das enzimas de restrição para clonagem, procedeu-se a digestão dos DNAs amplificados por RCA como descrita anteriormente, seguida de precipitação e ligação em vetor de clonagem. Os vetores utilizados foram pBluescript SK₊ (Stratagene) para clonar o begomovírus das amostras de hibisco-colibri e de algodoeiro e o pCambia0380 (Hajdukiewicz et al, 1994) para clonar o isolado de malva-preta. Os vetores foram digeridos com as respectivas enzimas de restrição e 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 o uso da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen). As ligações de pBluescript SK₊ (pBS) com os insertos das amostras de hibisco-colibri e de algodoeiro foram transformadas seguindo a metodologia do choque térmico e a ligação do inserto da amostra de malva-preta ao pCambia0380 seguiu a transformação por eletroporação. Ambas as transformações foram realizadas com células competentes de *Escherichia coli* DH5α conforme recomendação do fabricante. As células transformadas foram plaqueadas em meio de cultura LB com o antibiótico ampicilina para pBS e canamicina para pCambia0380 e incubadas a 37°C por uma noite. Nas transformações com pBS, as colônias recombinantes, de coloração branca, foram transferidas individualmente para tubos de ensaio contendo meio de cultura LB líquido com ampicilina; e, nas transformações com pCambia0380, algumas colônias foram selecionadas e também incubadas em meio LB líquido. Os tubos de ensaio foram mantidos sob agitação a 37°C por uma noite. A purificação plasmidial foi realizada conforme descrito por Sambrook et al. (1989). A

presença do inserto do DNA-A, ou do DNA-B, foi confirmada através da digestão dos plasmídeos com as enzimas de restrição utilizadas na clonagem e por enzimas que eram capazes de cortar todo o clone (inserto+vetor) em um único ponto, gerando uma única molécula linearizada. Dessa forma, pode-se verificar o tamanho esperado para o inserto, ou o tamanho esperado de toda a molécula, inserto e vetor.

Os clones obtidos foram digeridos com enzima de corte frequente MspI para visualização de padrões de digestões e, com isso, determinação dos genomas diferentes. Os clones com características genômicas diferentes foram submetidos ao sequenciamento nucleotídico com primers universais e primers específicos.

3.5. Determinação e análise da sequência genômica

Os clones (plasmídeos) selecionados para determinação da sequência nucleotídica foram purificados em coluna Ilustra plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare). Para o sequenciamento dos clones produzidos a partir de amostras de hibisco-colibri, algodoeiro e de malva-preta utilizou-se o sequenciador automático com os primers listados na Tabela 1, realizado na Macrogen Inc. (Coréia do Sul). A determinação das sequências nucleotídicas por meio da utilização de primers ocorreu, primeiramente, com o uso dos oligonucleotídeos universais, seguindo com a construção de primers específicos tendo os primeiros resultados de sequências como molde.

As sequências obtidas foram analisadas pelo algoritmo Blast disponível online (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). As sequências foram montadas e analisadas utilizando o programa Staden 4 (Staden, 1996). As análises filogenéticas tanto para o DNA-A quanto para o DNA-B foram realizadas utilizando as sequências nucleotídicas completas de todos os isolados de hibisco-colibri, algodoeiro e malva-preta, e as sequências nucleotídicas da maioria dos begomovírus relatados no Novo Mundo e do *Abutilon mosaic virus* (AbMV) (Tabela 2). A ferramenta disponível online Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) foi

utilizada para múltiplos alinhamentos. Para determinação das ORFs, para analisar e comparar as sequências foram utilizados os algoritmos ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) e Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), disponíveis online, respectivamente, e o programa DNAMAN (versão 4.0; Lynnon Biosoft). As análises filogenéticas foram realizadas após alinhamento das sequências, através do programa Mega 5 (Tamura et al, 2011), utilizando o método Neighbour Joining em análise “bootstrap” com 1000 repetições. A construção de tabelas por escala de cores para visualização de níveis de identidade entre as sequências analisadas foi feita em Microsoft Office Excel 2007.

Tabela1. Primers utilizados para o sequenciamento completo dos clones de begomovírus.

Primer	Sequência (5' - 3')
₁ T7 ^{*,**}	AATACGACTCACTATAG
₁ T3 [*]	AATTAACCCTCACTAAAGGG
₁ PAL1v1978 [*]	GCATCTGCAGGCCACATYGTCTTYCCNGT
₁ PAR1c496 [*]	GGCTTYCTRTACATRGG
₁ M13F [*]	GTAAAACGACGGCCAGT
₁ M13R ^{*,**}	GCGGATAACAATTCACACAGG
₁ 6500F ^{***}	AGGTGTTGGCTGGCTGGTG
₁ 90R ^{***}	GGCAACAGGATTCAATCTT
₂ B124-1B ^{**}	CAGCGAGAGCGTTCAAGTG
₂ B124-2B ^{**}	TGTTCTTTCATTTTTACACCATC
₂ T516-1A ^{**}	GTCACATCAGATACACAAATCACC
₂ T516-2A ^{**}	ATGATTATACTAATAGGACGTT
₂ B3F ^{**}	AAGGCATTTGGGGGATTAAC

₂ Hib1-a*	AAGACAATAAGTTAGAATCTAG
₂ Hib1-b*	ATGAACACGTTCAATCTTGACAG
₂ hibA-1*	CCCCCAGTGACCTTAGAGTAG
₂ HibA-2*	AGTGCTTCTGCTACGGATC
₂ ZooFor***	GAAGAGTAAAGTGACGAAGTG
₂ ZooRev***	GAAGGGAATGTGATGTATG

₁ Primers universais

₂ Primers construídos no trabalho

* Primers utilizados no sequenciamento dos isolados de hibisco-colibri.

** Primers utilizados no sequenciamento dos isolados de algodoeiro.

*** Primers utilizados no sequenciamento dos isolados de malva-preta.

Tabela 2. Sequências de DNA-A e DNA-B utilizadas nas análises filogenéticas

Espécie	Acrônimo	Nº acesso GenBank	
		DNA-A	DNA-B
Abutilon Brazil virus	AbBV	NC_014138	NC_014139
<i>Abutilon mosaic virus</i>	AbMV	NC_001928	NC_001929
Abutilon mosaic Bolivia virus	AbMBoV	NC_015045	NC_015048
<i>Bean calico mosaic virus</i>	BCaMV	NC_003504	NC_003505
<i>Bean dwarf mosaic virus</i>	BDMV	NC_001931	NC_001930
<i>Bean golden mosaic virus</i>	BGMV	NC_004042	NC_004043
<i>Bean golden yellow mosaic virus</i>	BGYMV	NC_001439	NC_001438
Blainvillea yellow spot virus	BIYSV	NC_010837	NC_010838
<i>Cabbage leaf curl virus</i>	CabLCV	NC_003866	NC_003887
<i>Chino del tomate virus</i>	CdTV	NC_003830	NC_003831
Cleome leaf crumple virus	CILCrV	NC_016578	NC_016572

<i>Corchorus yellow spot virus</i>	CoYSV	NC_008492	NC_008493
<i>Cotton leaf crumple virus</i>	CLCrV	NC_004580	NC_004581
<i>Cucurbit leaf curl virus</i>	CuLCrV	NC_002984	NC_002985
<i>Desmodium leaf distortion virus</i>	DesLDV	NC_008494	NC_008495
<i>Dicliptera yellow mottle virus</i>	DiYMoV	NC_003856	NC_003857
<i>Euphorbia mosaic virus</i>	EuMV	NC_008304	NC_008305
Euphorbia yellow mosaic virus	EuYMV	NC_012553	NC_012554
Macroptilium golden mosaic virus	MacGMV	NC_010952	NC_010953
<i>Macroptilium mosaic Puerto Rico virus</i>	MacMPRV	NC_004097	NC_004098
<i>Macroptilium yellow mosaic virus</i>	MacYMV	NC_010647	NC_010648
Malvastrum yellow mosaic Jamaica virus	MaYMJV	FJ600482	FJ600484
Merremia mosaic virus	MerMV	NC_007965	NC_007966
Okra mottle virus	OMoV	NC_011181	NC_011182
<i>Okra yellow mottle Iguala virus</i>	OYMoIgV	AY751753	ND
<i>Okra yellow mosaic Mexico virus</i>	OYMMV	NC_014066	NC_014067
Passionfruit severe leaf distortion virus	PSLDV	NC_012786	NC_012787
<i>Pepper golden mosaic virus</i>	PepGMV	NC_004101	NC_004096
<i>Pepper huasteco yellow vein virus</i>	PHYVV	NC_001359	NC_001369
<i>Potato yellow mosaic virus</i>	PYMV	NC_001934	NC_001935
<i>Rhynchosia golden mosaic virus</i>	RhGMV	NC_010294	NC_010293
Rhynchosia rugose golden mosaic virus	RhRGMV	HM236370	HM236371
Sida mosaic Brazil virus	SiMBV	FN436001	FN436002
Sida common mosaic virus	SiCMV	EU710751	ND
<i>Sida golden mosaic virus</i>	SiGMV	NC_002046	NC_002047
Sida micrantha Bolivia virus	SiMBoV	NC_015046	NC_015044

<i>Sida micrantha mosaic virus</i>	SiMMV	NC_005330	NC_005331
<i>Sida mottle virus</i>	SiMoV	NC_004637	ND
Sida yellow leaf curl virus	SiYLCV	EU710750	ND
<i>Sida yellow mosaic Yucatan virus</i>	SiYMYuV	NC_008779	NC_008780
<i>Squash mild leaf curl virus</i>	SMLCuV	NC_004645	NC_004646
Tomato common mosaic virus	ToCMV	NC_010835	NC_010836
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i>	ToCMoV	NC_003664	NC_003665
Tomato crinkle leaf yellow virus	ToCrLYV	ND	AY090556
<i>Tomato golden mosaic virus</i>	TGMV	NC_001507	NC_001508
<i>Tomato golden mottle virus</i>	ToGMoV	NC_008058	NC_008057
Tomato golden vein virus	TGVV	JF803257	JF803265
Tomato interveinal chlorosis virus	ToICV	JF803252	ND
Tomato leaf distortion virus	ToLDV	EU710749	ND
Tomato mild leaf curl virus	ToMLCV	ND	DQ336352
Tomato mild mosaic virus	ToMMV	NC_010833	NC_0101834
<i>Tomato mosaic Havana virus</i>	ToMHaV	NC_003867	NC_003868
Tomato mottle leaf curl virus	TMoLCV	JF803246	JF803264
<i>Tomato mottle virus</i>	ToMoV	NC_001938	NC_001939
<i>Tomato rugose mosaic virus</i>	ToRMV	NC_002555	NC_002556
<i>Tomato severe rugose virus</i>	ToSRV	NC_009607	NC_009612
<i>Tomato yellow margin leaf curl virus</i>	TYMLCV	NC_005852	NC_005853
<i>Tomato yellow spot virus</i>	ToYSV	NC_007726	NC_007727
<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	ToYVSV	NC_010949	NC_010950
Wissadula golden mosaic virus	WGMV	NC_010948	NC_010951

ND = não disponível

4. Resultados

4.1. Detecção de begomovírus em amostras de malváceas

Um total de 16 amostras foram coletadas para estudo da ocorrência de begomovírus: seis de hibisco-colibri, nove de algodoeiro e uma de malva-preta.

Cinco das seis amostras de hibisco-colibri foram positivas para begomovírus em PCR utilizando primers universais: hibisco-colibri 1, hibisco-colibri 2, hibisco-colibri 3, hibisco-colibri 5 e hibisco-colibri 6, apresentando uma banda de ca. 1,4 kb em gel de agarose, correspondente à amplificação com os primers universais (Figura 4). A única amostra de malva-preta com sintomas de mosaico dourado utilizada no estudo também foi PCR positiva para begomovírus (dados não mostrados).

Nove amostras de DNA total de algodoeiro foram submetidas à amplificação por PCR e oito (B009, B012, B015, B016, B022, B027, T30 e T51) apresentaram a banda de 1,5 kb esperada com a utilização dos primers PAL1_v1978 e PCR_v19 (Rojas et al., 1993) (dados não mostrados). Apenas a amostra T4 foi considerada negativa.

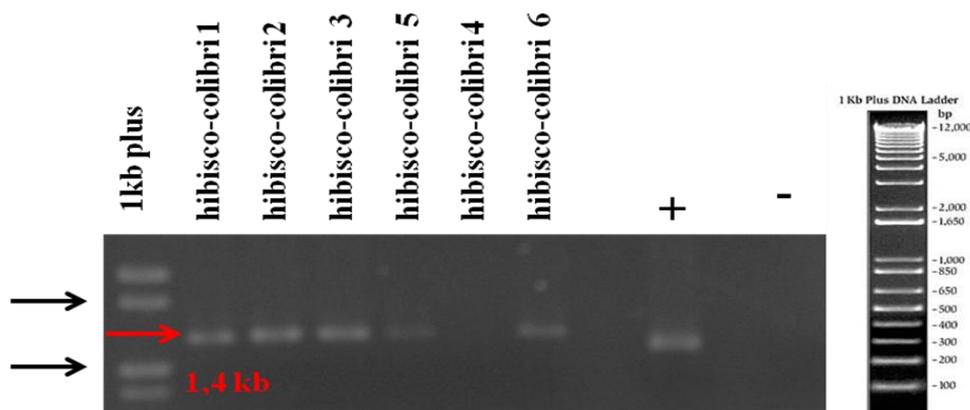


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose, mostrando os produtos amplificados das amostras de hibisco-colibri. A seta vermelha indica a posição do fragmento de DNA amplificado, correspondendo a 1,4kb. (+) indica controle positivo para begomovírus; (-) indica o controle negativo da reação negativo da reação. (1kb Plus) Marcador molecular DNA Ladder (Invitrogen).

4.2. Clonagens dos DNAs virais

Os DNAs virais extraídos de todas as amostras com detecção de begomovírus positiva foram amplificados por RCA e digeridos com diferentes enzimas de restrição para determinação daquelas que cortavam o DNA genômico viral em apenas um único ponto. Apenas a enzima XbaI clivou todos os DNAs derivados de algodoeiro em um único ponto e a enzima EcoRI clivou apenas a mostra B027, gerando um fragmento esperado de 2,6 kb (Figura 5). A hibridização dos produtos da digestão das amostras de hibisco-collibri com sonda específica para o DNA-A permitiu analisar qual componente foi digerido pelas enzimas utilizadas. Dessa forma, PstI e HindIII cortaram apenas o DNA-A do isolado de hibisco-colibri e SacI clivou somente o DNA-B (Figura 6). As enzimas BamHI e EcoRV cortaram o DNA viral extraído de malva-preta em apenas um ponto (Figura 7).

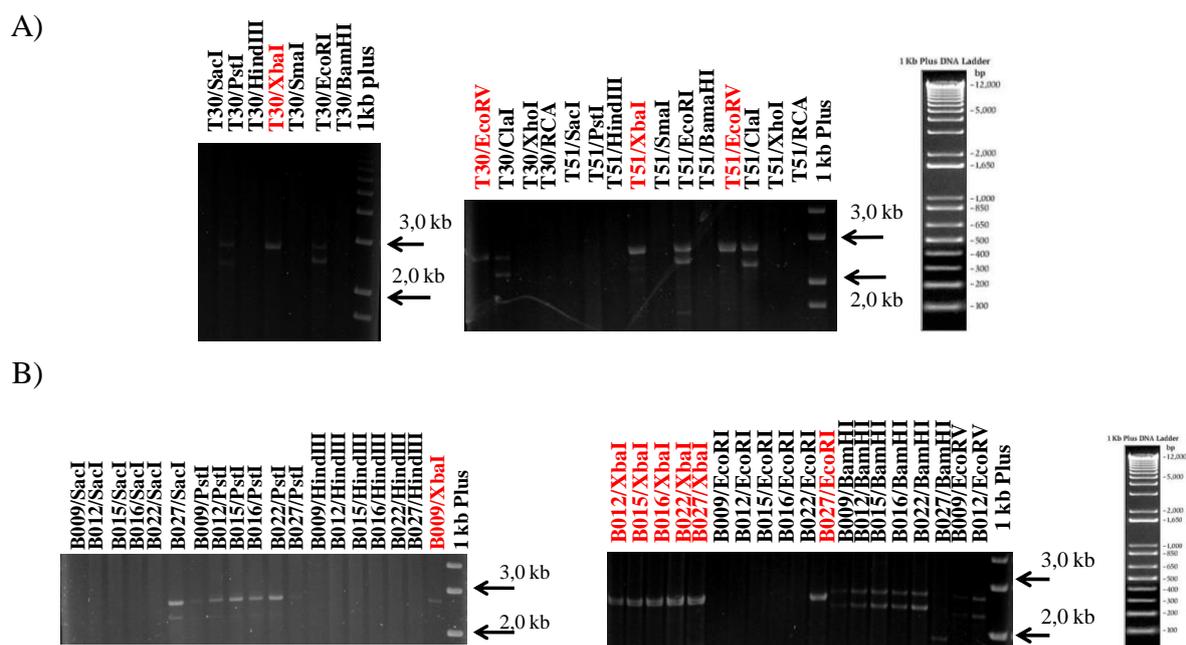


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose mostrando as digestões das amostras de algodoeiro com enzimas de restrição. Presença de bandas esperadas de 2,6 kb com digestões por EcoRI e XbaI. A) Amostras T30 e T51. B) Amostras B009, B012, B015, B016, B022 e B027. (1kb Plus) Marcador molecular DNA Ladder (Invitrogen).

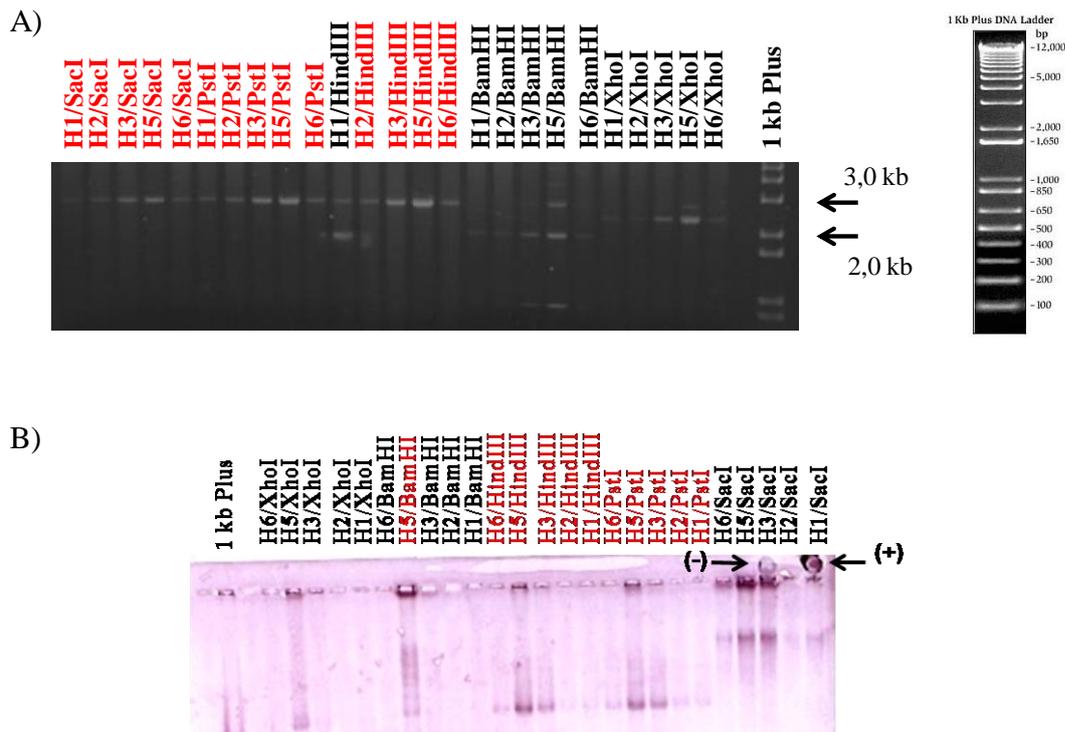


Figura 6. A) Eletroforese em gel de agarose mostrando as digestões do DNA amplificado por RCA das amostras de hibisco-colibri. Destaque em vermelho para as amostras clivadas em um único ponto. (1kb Plus) Marcador molecular DNA Ladder (Invitrogen). B) Hibridização com sonda DNA-A das digestões de hibisco-colibri. Destaque em vermelho para as enzimas que clivaram somente o DNA-A. H1 = hibisco-colibri 1, H2 = hibisco-colibri 2, H3 = hibisco-colibri 3, H5 = hibisco-colibri 5 e H6 = hibisco-colibri 6.

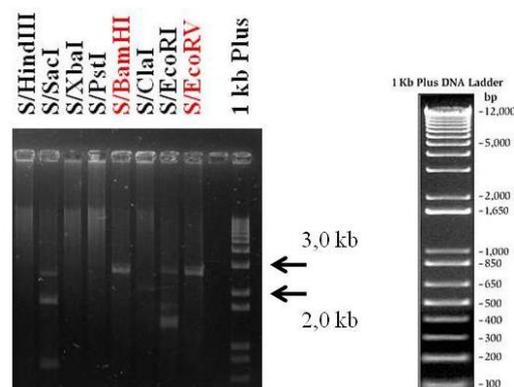


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose mostrando as digestões com enzimas de restrição da amostra de malva-preta. Destaque em vermelho das amostras que foram clivadas em um só ponto com BamHI e EcoRV. (1kb Plus) Marcador molecular DNA Ladder (Invitrogen). S = *Sidastrum micranthum* (malva-preta).

Selecionou-se as seguintes enzimas para a clonagem genômica dos begomovírus das amostras: PstI (DNA-A) e SacI (DNA-B) para hibisco-colibri, XbaI (ambos componentes) para algodoeiro e BamHI (ambos componentes) para malva-preta. Os fragmentos digeridos do tamanho esperado a partir de cada amostra das três espécies de plantas foram ligados aos vetores de clonagem pBluescript SK+ (fragmentos de hibisco-colibri e de algodão) e pCambia0380 (fragmento de malva-preta) e procederam-se com as transformações. Dessa forma, colônias recombinantes de cada amostra foram selecionadas para extração plasmidial seguida de digestão com as enzimas da restrição. Cinco colônias recombinantes do DNA-A e três do DNA-B foram selecionadas de cada amostra de hibisco-colibri, seis colônias de cada amostra de algodoeiro, com exceção da amostra B027 que só teve uma colônia recombinante, e quatro colônias de malva-preta. Os plasmídeos extraídos das colônias recombinantes foram digeridos com as enzimas apropriadas, sendo visualizados dois fragmentos de DNA em gel de agarose - um de aproximadamente 2,6 kb correspondente ao inserto e outro em torno de 3,0 kb referente ao vetor pBS, ou em torno de 7,0 kb referente ao vetor pCambia - e com uma enzima capaz de clivar o DNA plasmidial em um único ponto, gerando apenas um fragmento linearizado.

Os plasmídeos extraídos das transformações dos isolados de algodoeiro foram digeridos com a enzima HindIII, pois esta não digere o DNA do inserto (Figura 5) e possui sítio no vetor. Dessa forma, o resultado esperado para essa digestão seria uma banda de aproximadamente 6,0 kb (inserto + vetor). Vinte clones apresentaram bandas com tamanho aproximado de 6,0 kb depois das digestões com HindIII: B012-2, B012-4, B012-5, B012-6, B015-6, B016-2, B016-5, B016-6, B022-1, B022-2, B022-3, B022-4, B022-5, B022-6, B027, T-51-1, T51-2, T51-3, T51-4 e T51-6 (Figura 8). Os clones foram em seguida digeridos com enzima de corte frequente (MspI) para observação de padrões de digestão e seleção daqueles que eram diferentes para sequenciamento, sendo escolhidos os clones B012-2, B012-4, B012-6, B015-6, B016-4, B016-5, B022-6, B027, T51-1, T51-2 e T51-6 (Figura 9).

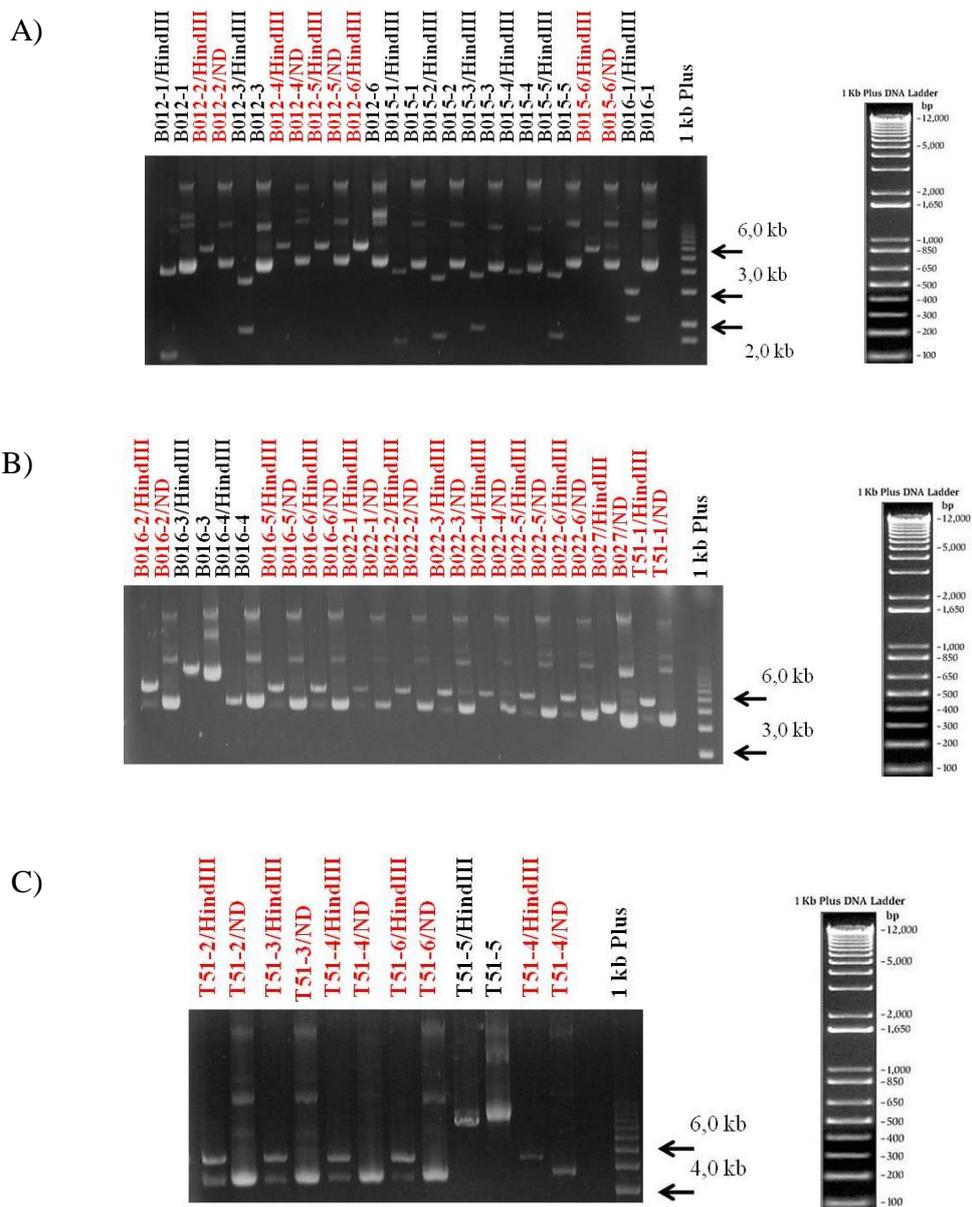


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose mostrando as digestões dos plasmídeos dos clones de algodoeiro com a enzima HindIII capaz de linearizar o fragmento completo dos clones adquiridos. Destacados em vermelho os clones que apresentaram fragmento de 6,0 kb. B) As digestões dos clones B016-2, B016-5, B016-6, B022-1, B022-3, B022-5, B022-6 e T51-1 não foi completa, por isso o aparecimento de duas bandas. C) As digestões dos clones T51-2, T51-3, T51-4 E T51-6 também não foi completa. ND = não digerido. (1kb Plus) Marcador molecular DNA Ladder (Invitrogen).

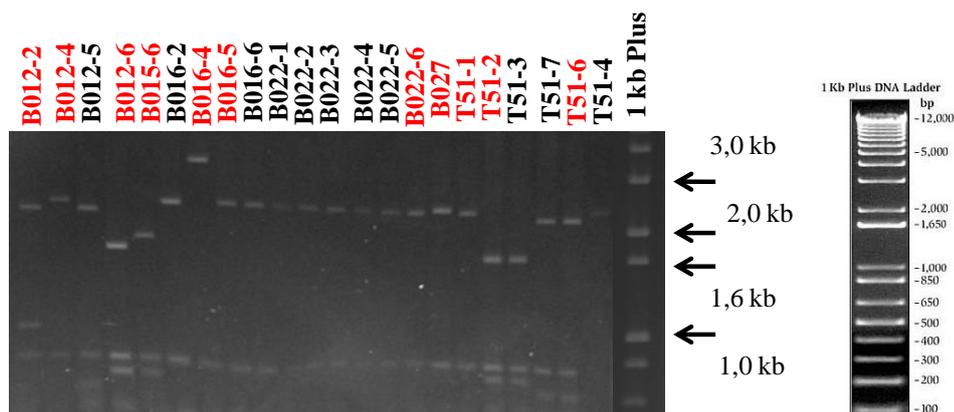


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose mostrando as digestões dos clones dos isolados de algodoeiro com MspI, em vermelho os clones selecionados para sequenciamento. (1kb Plus) Marcador molecular DNA Ladder (Invitrogen).

Os DNAs plasmidiais das transformações de hibisco-colibri foram digeridos com as enzimas de clonagem (PstI para o DNA-A e SacI para o DNA-B) e apenas os plasmídeos das colônias recombinantes do DNA-B também foram digeridos com EcoRI, pois esta enzima clivou apenas o plasmídeo pBS, gerando um único fragmento linearizado de, aproximadamente, 6,0kb. Dezesesseis clones do DNA-A apresentaram as duas bandas esperadas, 2,6 kb do inserto e 3,0 kb do vetor, após digestão com PstI: HA1-1, HA1-4, HA2-1, HA2-2, HA2-3, HA2-5, HA3-1, HA3-2, HA3-3, HA3-4, HA3-5, HA5-1, HA5-2, HA 5-3, HA5-4 e HA5-5 (Figura 10). Oito clones do DNA-B digeridos com SacI e EcoRI mostraram os tamanhos de bandas esperados, 2,6 kb + 3,0 kb (SacI) e 6,0 kb (EcoRI): HB1, HB2-1, HB2-2, HB2-3, HB3-1, HB3-2, HB5-1 e HB5-2 (Figura 11). Todos os clones listados foram digeridos com MspI, selecionando para sequenciamento: HA-1-1, HA1-4, HA2-1, HA2-2, HA2-4, HA3-1, HA3-2, HA5-1 e HA-5-3 do DNA-A; e HB1, HB2-1, HB2-3, HB3-1, HB5-1 e HB5-2 do DNA-B (Figura 12).

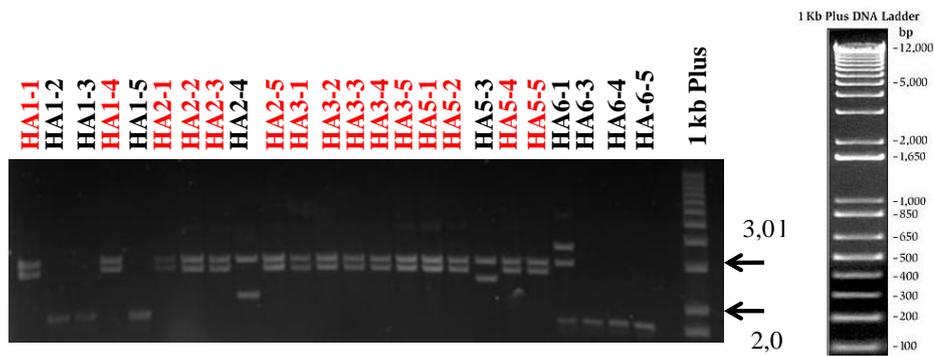


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose mostrando as digestões dos plasmídeos das transformações do DNA-A de hibisco-colibri com a enzima de clonagem PstI. Destaque em vermelho para os clones selecionados para digestão com enzima de corte frequente MspI para posterior sequenciamento. (1kb Plus) Marcador molecular DNA Ladder (Invitrogen).

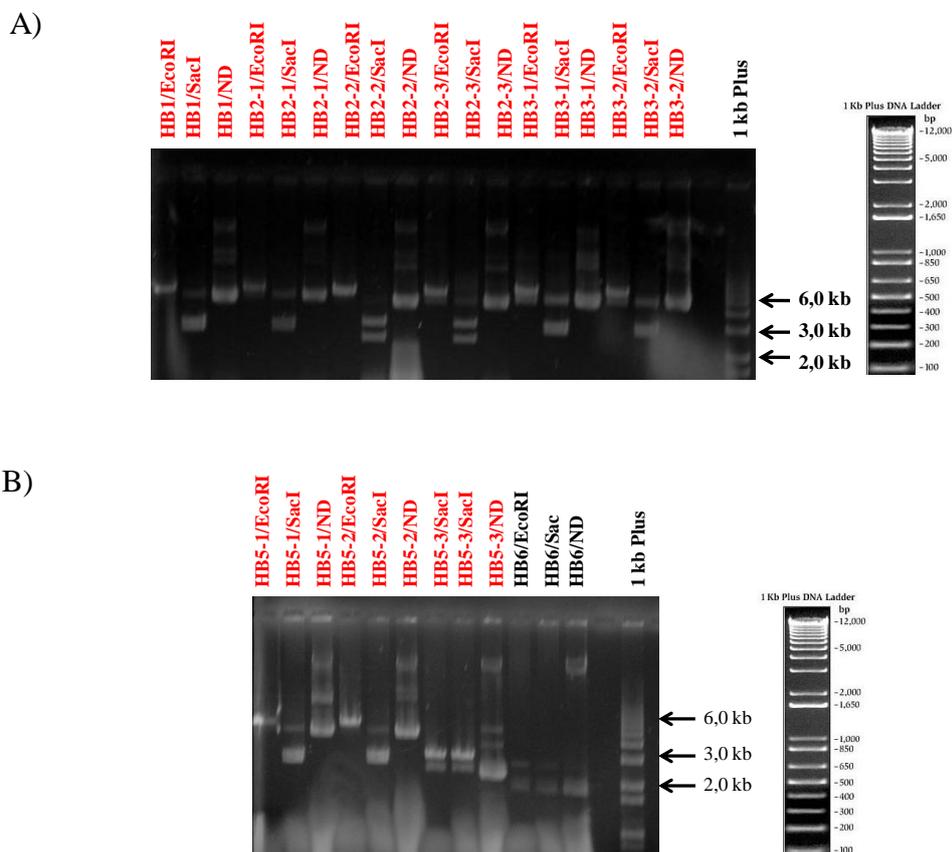


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose mostrando as digestões dos plasmídeos das transformações do DNA-B de hibisco-colibri com a enzima de clonagem SacI e com a enzima EcoRI capaz de linearizar os plasmídios, gerando um único fragmento de 6,0kb. A) As digestões dos clones HB1, HB2-1, HB3-1 e HB3-2 com SacI não foi completa. B) As digestões dos clones HB5-1 e HB5-2 com SacI também não foi completa. As amostras em vermelho destacam os clones selecionados para digestão com enzima de corte frequente MspI. ND = não digerido. (1kb Plus) Marcador molecular DNA Ladder (Invitrogen).

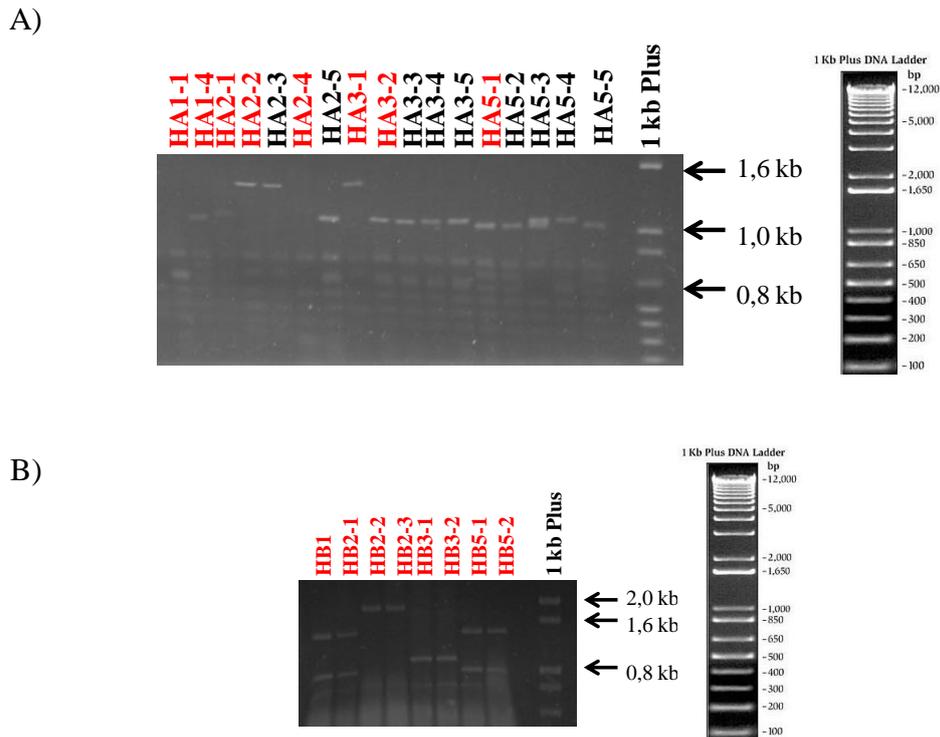


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose mostrando as digestões dos clones dos isolados de hibisco-colibri com MspI. A) Clones do DNA-A. B) Clones DNA-B. Em vermelho os clones que foram selecionados para sequenciamento. (1kb Plus) Marcador molecular DNA Ladder (Invitrogen).

Os plasmídeos da transformação de malva-preta foram digeridos apenas com a enzima de clonagem BamHI, gerando duas bandas aproximadamente de 2,6kb, correspondente ao inserto, e de 6,8kb, correspondente ao vetor pCambia0380, sendo selecionados três clones para sequenciamento: S1, S3 e S6 (Figura 13).

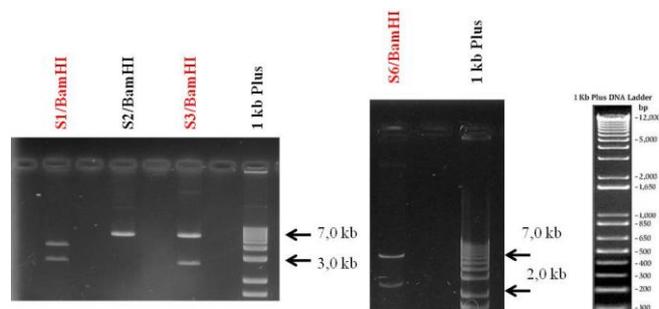


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose mostrando as digestões plasmidiais dos clones de malva-preta. Três clones foram selecionados para sequenciamento (em vermelho). (1kb Plus) Marcador molecular DNA Ladder (Invitrogen).

4.3. Análises das sequências genômicas

A comparação dos primeiros resultados dos sequenciamentos dos clones com as sequências depositadas no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) revelou que os clones B016-4 e B027 dos isolados de algodoeiro e os clones HA1-1, HA2-2, HA2-4, HA3-1, HA5-3, HB2-3 e HB3-1 dos isolados de hibisco-colibri tratavam-se de sequências genômicas sem nenhuma semelhança com sequências nucleotídicas de begomovírus, diferentemente, o restante dos clones analisados mostraram características nucleotídicas comuns aos begomovírus bipartidos do Novo Mundo. Os clones listados na Tabela 3 foram completamente sequenciados. Os clones homólogos compartilharam alta identidade nucleotídica entre si e todas as características comuns dos genomas, sendo escolhidos os clones B012-6 (DNA-A do isolado de algodoeiro), T51-1 (DNA-B do isolado de algodoeiro), HA5-1 (DNA-A do isolado de hibisco-colibri), HB-5-1 (DNA-B do isolado de hibisco-colibri) e S6 (DNA-B do isolado de malva-preta) para prosseguir com as análises filogenéticas. Nenhum clone do DNA-A do isolado de malva-preta foi obtido. Analisando o grau de identidade dos clones dos isolados de algodoeiro, hibisco-colibri e de malva-preta entre si através do programa DNAMAN pode-se observar que os clones do DNA-A HA5-1 (hibisco-colibri) e B012-6 (algodão) apresentaram 66% de identidade entre si, enquanto que os clones do DNA-B HB5-1 (hibisco-colibri), T51-1 (algodão) e S6 (malva-preta) apresentaram identidade de 64% entre si.

Tabela 3. Clones dos isolados de algodoeiro, hibisco-colibri e malva-preta que foram sequenciados completamente.

Algodão		<i>Malvaviscus arboreus</i>		<i>Sidastrum micranthum</i>	
DNA-A	DNA-B	DNA-A	DNA-B	DNA-A	DNA-B
B012-6*	T51-1*	MA1-4	MB5-1*		S6*
B015-6	T51-6	MA2-1	MB5-2		
		MA3-2			
		MA5-1*			

*Clones selecionados para análises filogenéticas.

O DNA-A (clone B012-6) e o DNA-B (clone T51-1) de algodoeiro apresentaram 2670 nucleotídeos e 2650 nucleotídeos, respectivamente. O DNA-A e DNA-B apresentaram uma região comum (RC) com 97% de identidade e com 237 nucleotídeos. A RC de ambos os componentes contém a sequência nonanucleotídica TAATATT↓AC característica da maioria dos geminivírus, onde encontra-se a origem de replicação. Esta região contém a provável sequência de íteron GGAG e possui a sequência rica em G conhecida como G Box (Figura 14).

O genoma viral do begomovírus de hibisco-colibri HA5-1 (DNA-A) e HB51(DNA-B) apresentou 2711 nucleotídeos e 2683 nucleotídeos, respectivamente, e os componentes genômicos compartilham 98% de identidade na região comum com 257 nucleotídeos. Ambos os componentes possuem a G Box e provável sequência de íteron GGAA, contudo, diferentemente da maior parte dos geminivírus já relatados, a sequência nonanucleotídica diverge do restante da família, pois possui uma substituição de A para G: TAGTATT↓AC (Figura 15).

O clone do DNA-B (S6) do isolado de malva-preta possui 2629 nucleotídeos e a sequência dos 9 nucleotídeos da região comum é idêntica a da maioria da família: TAATATT↓AC.

Os DNAs-A de ambos os clones (B012-6 de algodão e HA5-1 de hibisco-colibri) possuem uma ORF no sentido viral (AVI) e quatro no sentido complementar (AC1, AC2, AC3 e AC4) e todos os clones do DNA-B (T51-1 de algodão, HB5-1 de hibisco-colibri e S6 de malva-preta) possuem duas ORFs, uma no sentido viral (BV1) e uma no sentido complementar (BC1) (Figura 16).

```

B012-6      TTGGGACTCCGTCCGTACCAGGACTCTCTCAACTTCTGTGATATTTGCGGAGTCCTGGA 2620
T51-1      TTGGGACTTCTTCCGTACCAGGACTCTCTCAACTTCTGTGATATTTGCGGAGTCCTGGA 2600

B012-6      G TCCCATTTATACTAGAACTCCAGACCCGCGGCCATCAACTATAATATT 2670
T51-1      G TCCCATTTATACTAGAACTCCAGACCCGCGGCCATCAACTATAATATT 2650
  
```

Figura 14. Alinhamento de parte da sequência da região comum (RC) dos clones do isolado de algodoeiro B012-6 (DNA-A) e T51-1 (DNA-B). A sequência do íteron em verde, em amarelo a região TATA Box, em azul a região G Box e em rosa a sequência TAATATT↓AC onde encontra-se a origem de replicação.

```

MA5-1      ATGAATTGGAACTGGAACTAATTTATACAAGTCCCTCTAATCAACCGACAAGGACACC 2678
MB5-1      ATGAATTGGAACTGGAACTAATTTATACAAGTCCCTCTAATCAACCGACAAGGACACC 2650

MA5-1      TGGCGGCCATCCGAAGGGCGAAGCCCTAGTATT 2711
MB5-1      TGGCGGCCATCCGAAGGGCGAAGCCCTAGTATT 2683
  
```

Figura 15. Alinhamento de parte da sequência da região comum (RC) dos clones do isolado de hibisco-colibri HA5-1 (DNA-A) e HB5-1 (DNA-B). A sequência do íteron em verde, em amarelo a região TATA Box, em azul a região G Box e em rosa a sequência TAGTATT↓AC diferenciada onde encontra-se a origem de replicação.

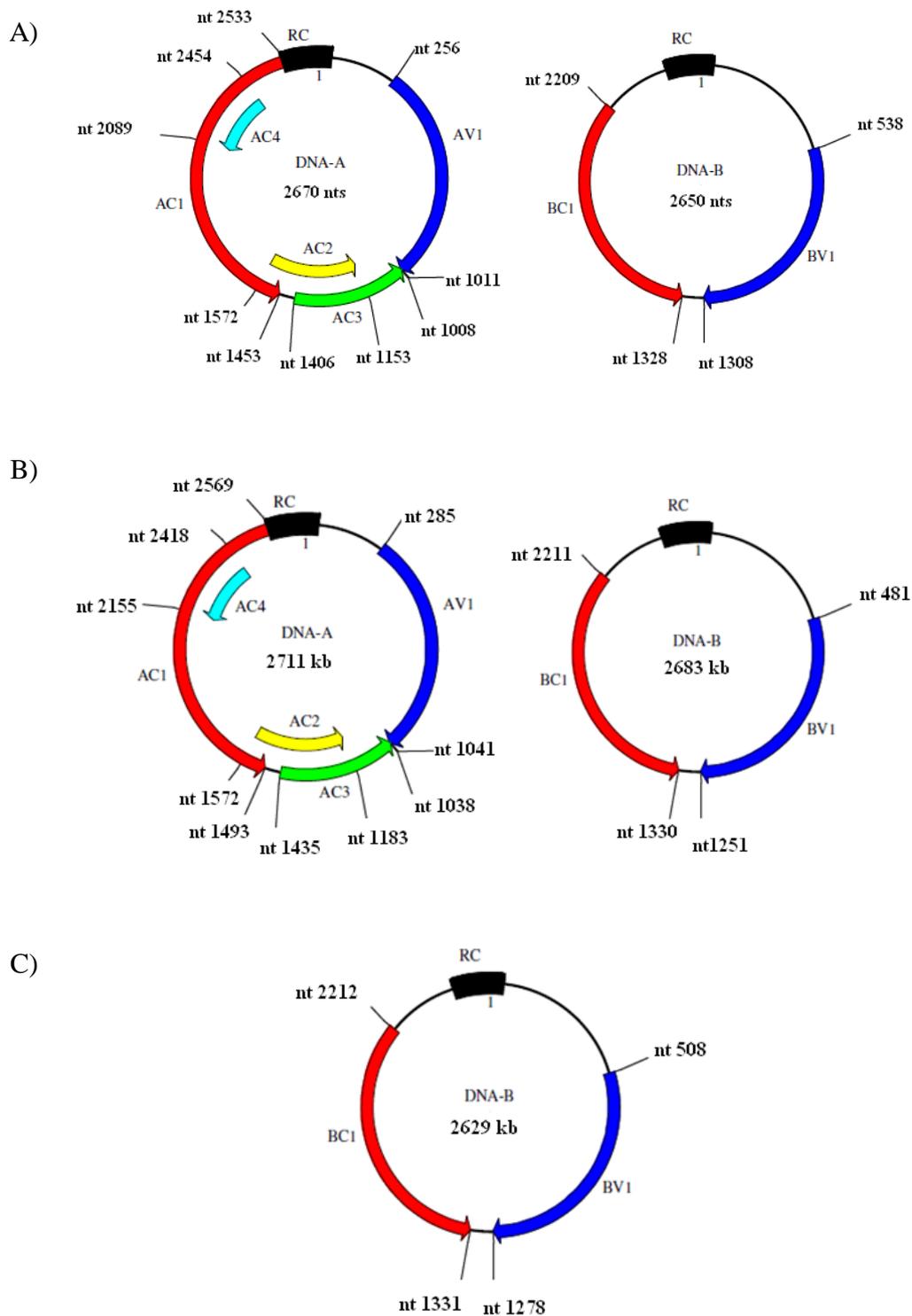


Figura 16. Organização genômica dos begomovírus de malváceas. A) Clones B012-6 (DNA-A) e T51-1 (DNA-B) de algodão. B) Clones MA5-1 (DNA-A) e MB5-1 (DNA-B) de *Malvaviscus arboreus*. C) Clone S6 (DNA-B) de *Sidastrum micranthum*. As setas indicam as direções das ORFs no sentido viral (V) e complementar (C). As posições numeradas indicam o códon de iniciação e o códon de parada de cada ORF. O nucleotídeo número 1 localizado dentro da região intergênica representa a sítio de clivagem (\downarrow) na sequência nonanucleotídica.

As sequências dos clones de DNA-A e DNA-B obtidos foram comparadas através do programa Mega 5 (Tamura *et al.*, 2011) após alinhamento com Clustal W (www.ebi.ac.uk/clustalw/) com a maioria dos begomovírus bipartidos relatados no Novo Mundo e com o AbMV (Tabela 2). Estas comparações mostraram que a identidade dos clones de DNA-A com qualquer das sequências de begomovírus das Américas não foi maior do que 78% (Tabela 4 e Figura 17). O clone HA5-1 de hibisco-colibri teve maior proximidade com a sequência do begomovírus Abutilon mosaic Bolivia virus (AbMBoV) e o clone B012-6 de algodoeiro com Tomato common mosaic virus (ToCMV). Analisando o alinhamento dos DNAs-B, a maior identidade com os clones obtidos no trabalho foi de 74% do clone HB5-1 do isolado de hibisco-colibri com Abutilon mosaic Bolivia virus (AbMBoV) (Tabela 4 e Figura 18). O clone T51-1 pelo alinhamento obteve a maior identidade com *Cabbage leaf curl virus* (CabLCV) e Rhyncosia rugose golden mosaic virus (RhRGMV) (Figura 18). O clone S6 do isolado de malva-preta apresentou identidade maior com o begomovírus *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV) (Figura 18 e Tabela 4).

Tabela 4. Identidade máxima dos clones de begomovírus com sequências depositadas no GenBank.

Clones begomovírus	Sequências do GenBank
B012-6 (DNA-A)	78% Tomato common mosaic virus (ToCMV)
T51-1 (DNA-B)	64% <i>Cabbage leaf curl virus</i> (CabLCV) e Rhyncosia rugose golden mosaic virus (RhRGMV)
HA5-1 (DNA-A)	78% Abutilon mosaic Bolivia virus (AbMBoV)
HB5-1 (DNA-B)	74% Abutilon mosaic Bolivia virus (AbMBoV)
S6 (DNA-B)	69% <i>Sida micrantha mosaic virus</i> (SiMMV)

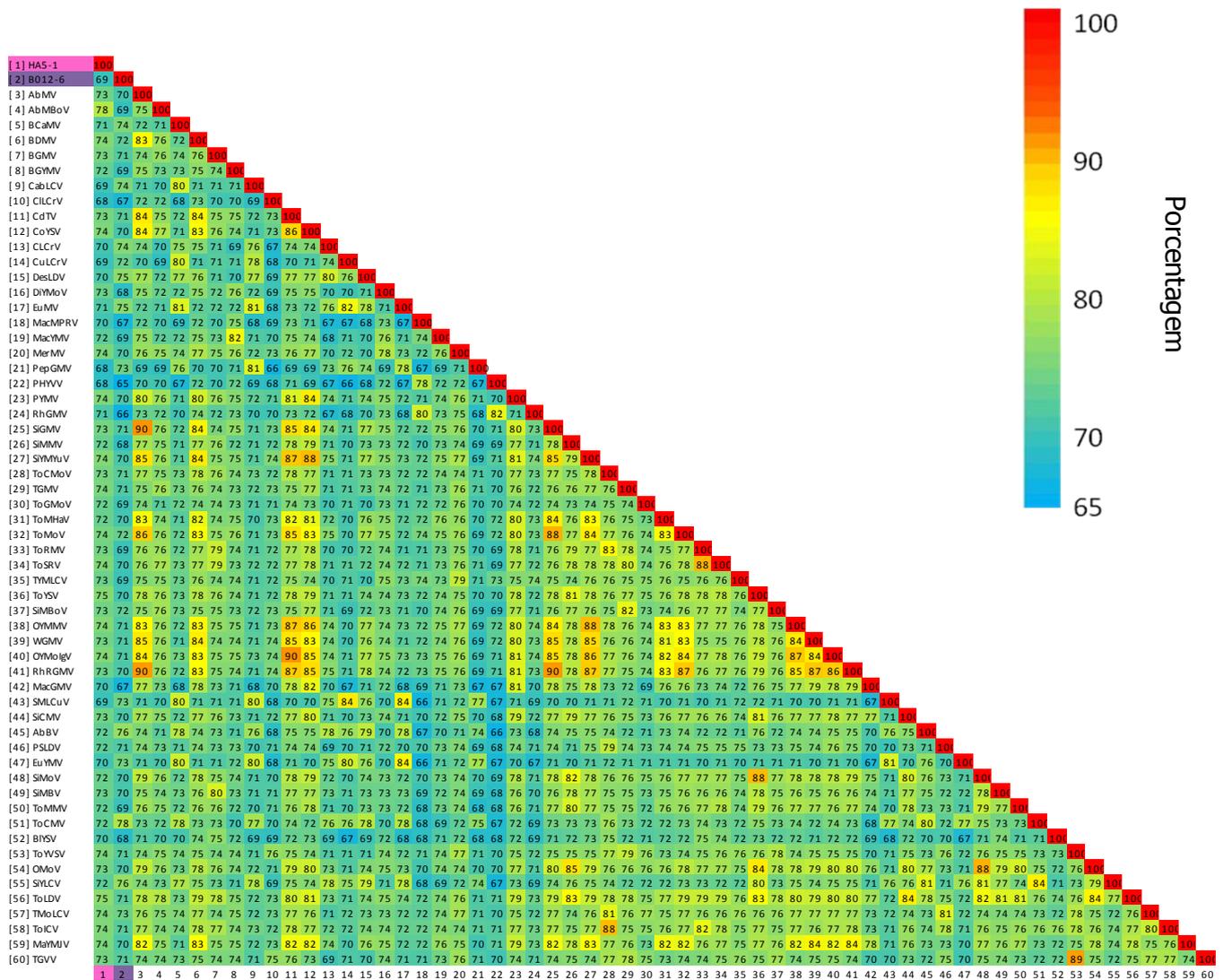


Figura 17: Comparação das seqüências do DNA-A dos clones do isolado de hibisco-colibri (HA5-1), em rosa, e do isolado de algodoeiro (B012-6), em roxo, com as seqüências da maioria dos begomovírus relatados no Novo Mundo disponíveis no banco de dados GenBank. Os acrônimos dos vírus no eixo vertical (eixo y) correspondem à numeração do eixo horizontal (eixo x). Os valores do grau de identidade entre as seqüências é dado em porcentagem.

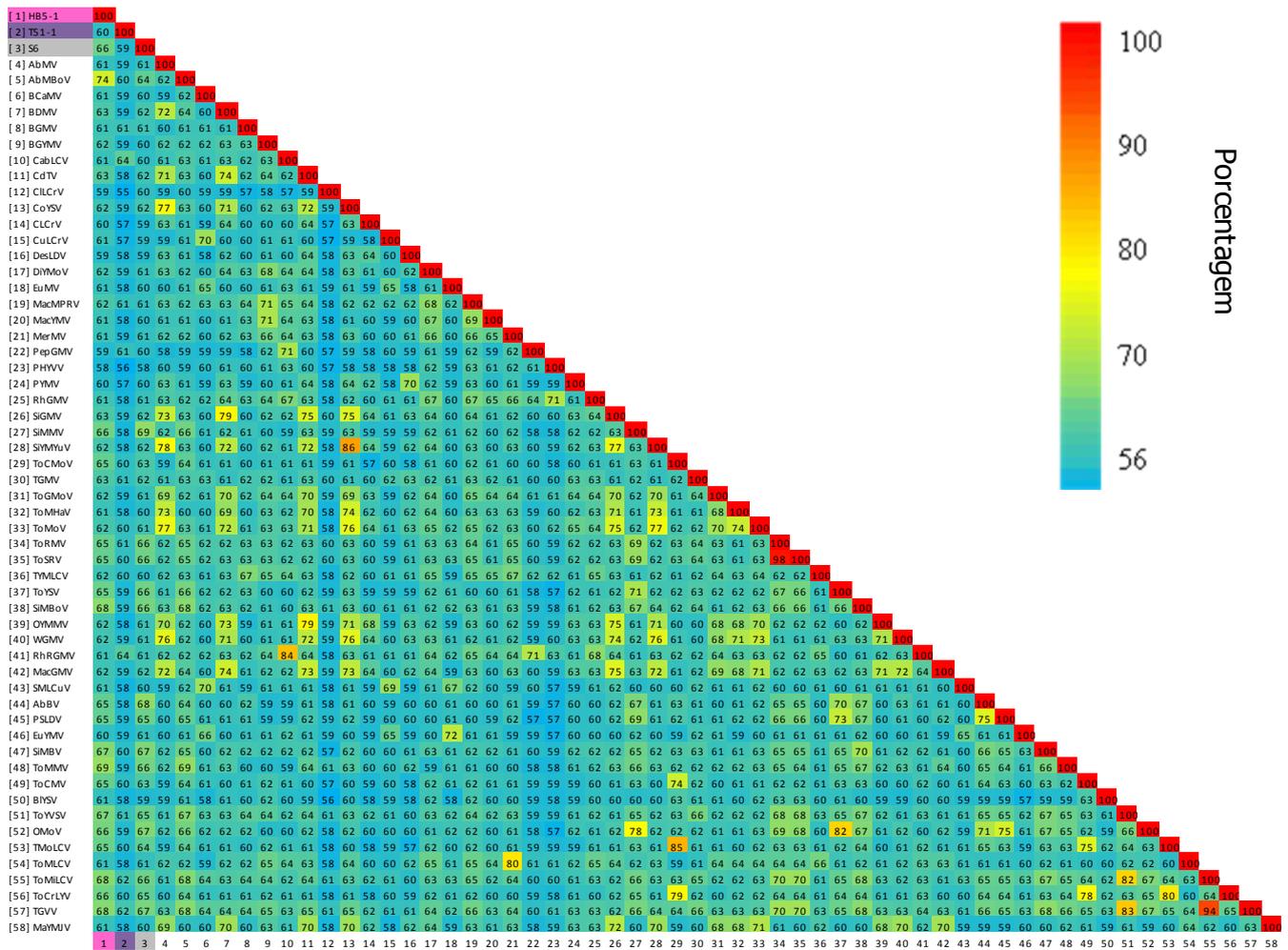


Figura 18: Comparação das sequências do DNA-B dos clones do isolado de hibisco-colibri (HB5-1), em rosa, do isolado de algodoeiro (T51-1), em roxo, e do isolado de malva-preta, em cinza, com as sequências da maioria dos begomovírus relatados no Novo Mundo disponíveis no banco de dados GenBank. Os acrônimos dos vírus no eixo vertical (eixo y) correspondem à numeração do eixo horizontal (eixo x). Os valores do grau de identidade entre as sequências é dado em porcentagem.

As análises filogenéticas dos clones selecionados no trabalho juntamente com as sequências da Tabela 2 foram utilizadas para obtenção de árvores filogenéticas através do programa Mega 5 (Tamura *et al*, 2007), utilizando o método de Neighbour Joining em análise bootstrap com 1000 repetições. A árvore filogenética para o DNA-A mostrou que o isolado de hibisco-colibri (HA5-1) é bem distante filogeneticamente dos demais begomovírus, sendo que foi agrupado com um vírus recentemente relatado em plantas de abutilon na Bolívia (Paprotka *et al.*, 2010b), o Abutilon mosaic Bolivia virus (AbMBoV) (Figura 19).

O DNA-A isolado de algodoeiro (B012-6) compôs um agrupamento com poucos begomovírus brasileiros. Este agrupamento é dividido em três sub-grupos. O grupo I é formado pelo *Cotton leaf curl virus* (CLCrV) e pelo *Desmodium leaf distortion virus* (DesLDV), ambos do México. O grupo II, onde está inserido o isolado B012-6, foi formado somente por espécies brasileiras: Tomato common mosaic virus (ToCMV), Sida yellow leaf curl virus (SiYLCV) e Abutilon Brazil virus (AbBV). O grupo III é mais diverso, sendo formado por *Cabbage leaf curl virus* (CabLCV), *Cucurbit leaf curl virus* (CuLCrV) e *Squash mild leaf curl virus* (SMLCuV) dos Estados Unidos, *Bean calico mosaic virus* do México (BCaMV) *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) da Costa Rica, *Euphorbia mosaic virus* (EuMV) de Cuba e *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV) do Brasil (Figura 19).

A árvore filogenética para o DNA-B colocou os clones HB5-1 (hibisco-colibri) e S6 (malva-preta) em um mesmo grupo (grupo I, Figura 20), o qual é formado em sua maioria por begomovírus brasileiros, com exceção de Abutilon mosaic Boliva virus (AbMBoV) e Sida micrantha Bolivia virus (SiMBoV) isolados de plantas de malváceas da Bolívia.

O clone do isolado do DNA-B de algodoeiro T51-1, assim como seu provável cognato B012-6 (DNA-A) agrupou-se com begomovírus de todas as Américas (Figura 20).

Figura 19. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento das sequências completas de nucleotídeos do DNA-A dos vírus relacionados da Tabela 2 e dos clones HA5-1 e B012-6. A árvore foi construída utilizando-se o programa MEGA versão 5.03. Os números que aparecem nas ramificações da árvore (lado esquerdo) indicam a frequência de cada agrupamento em uma análise “bootstrap” com 1000 repetições. Em verde, o clone HA5-1 e em rosa considerações do clone B012-6.

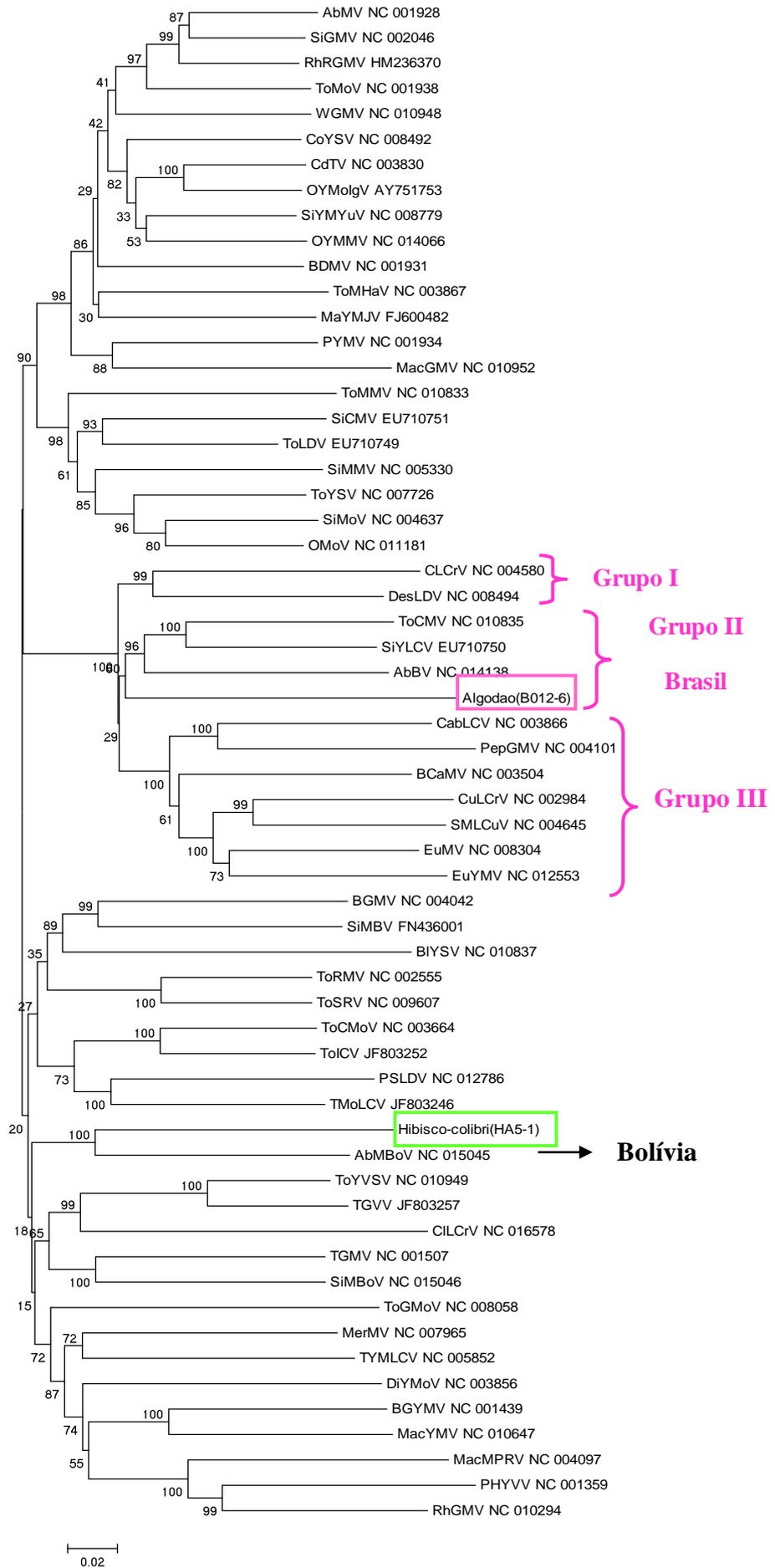
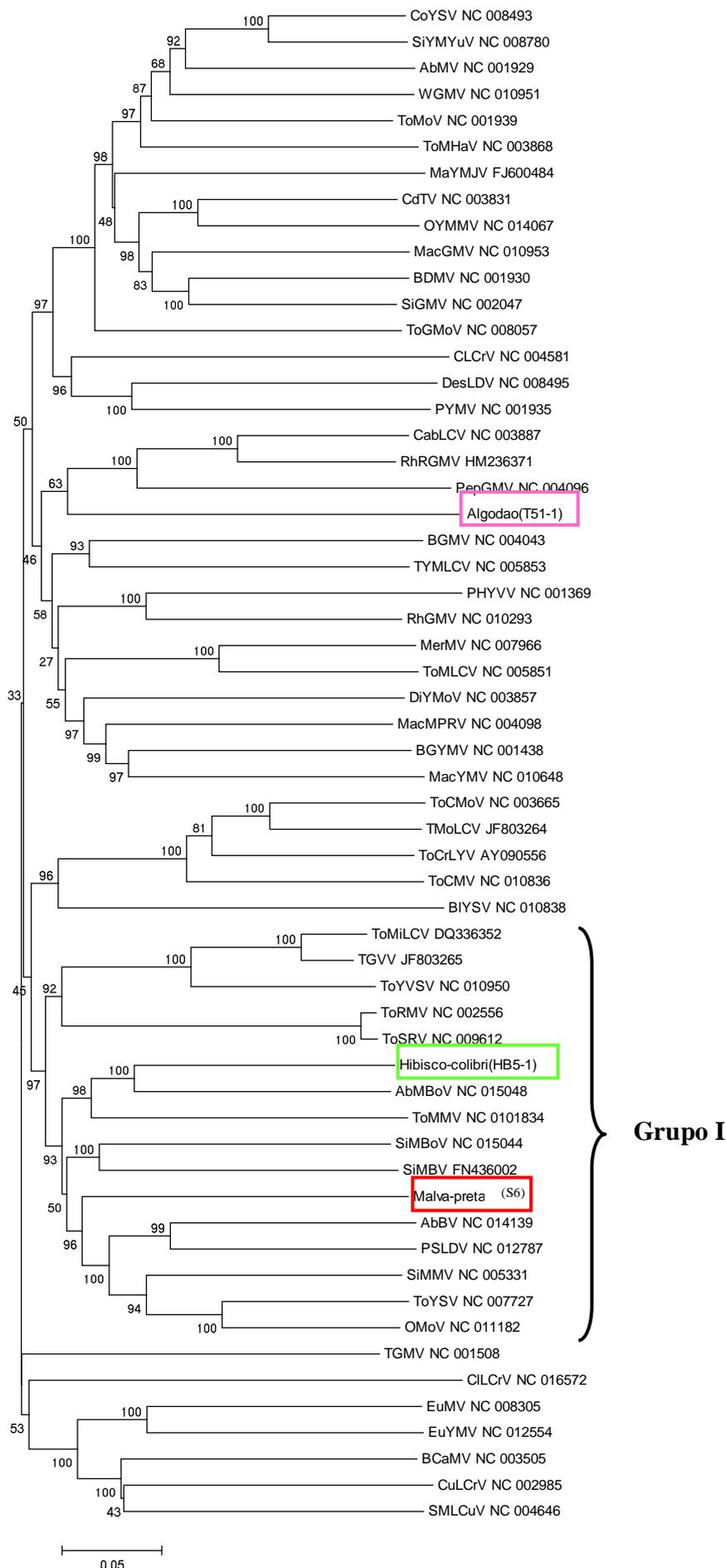


Figura 20. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento das seqüências completas de nucleotídeos do DNA-B dos vírus relacionados da Tabela 2 e dos clones HB5-1, T51-1 e S6. A árvore foi construída utilizando-se o programa MEGA versão 5.03. Os números que aparecem nas ramificações da árvore (lado esquerdo) indicam a frequência de cada agrupamento em uma análise “bootstrap” com 1000 repetições. Em verde, o clone HB5-1; em rosa, o clone T51-1; e em vermelho, o clone S6.



Análises de múltiplos alinhamentos da região comum (RC) do DNA-B de begomovírus brasileiros demonstraram que o isolado de hibisco-colibri HB5-1 não compartilha a mesma sequência provável de íteron com as sequências alinhadas, contudo apresenta semelhanças com o isolado S6 de malva-preta e com os begomovírus RhRGMV, CabLCV, MaYMJV, AbMV, ToMLCV, TGVV, ToYVSV, SiMBoV, NDNV, SiBV, ToMMV, ToRMV, ToSRV, SiMMV, ToYSV, OMoV, PSLDV, AbMBoV, BGMV e ToCMoV na região rica em G conhecida como G Box; o isolado de algodeiro T51-1 possui a mesma sequência de íteron do isolado S6 e dos vírus AbMV e OMoV mas não apresenta a G Box com a sequência típica completa (Figura 21).

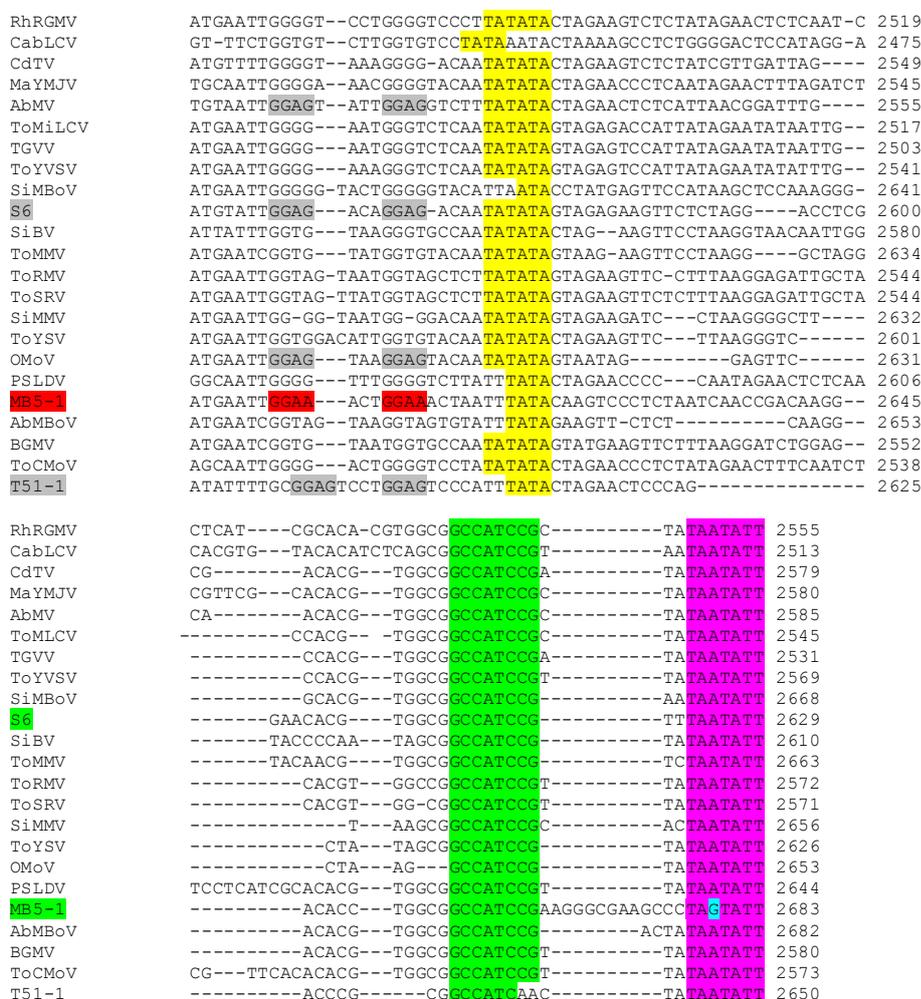


Figura 21. Alinhamento das sequências da região comum (RC) dos clones MB5-1, T51-1 e S6 com outros begomovírus. Cinza = sequência de íteron dos clones S6 e T51-1. Vermelho = sequência de íteron de MB5-1. Verde = G Box de S6 e MB5-1. Amarelo = TATA Box. Magenta = sequência diferenciada TAGTATT↓AC (MB5-1) e TAATATTAC (T51-1 e S6) onde se encontra a origem de replicação.

5. Discussão

As análises das sequências dos isolados B012-6 (DNA-A de algodoeiro), T51-1 (DNA-B de algodoeiro), HA5-1 (DNA-A de hibisco-colibri), HB5-1 (DNA-B de hibisco-colibri) e S6 (DNA-B de malva-preta) revelaram que a organização genômica de todos eles é típica dos begomovírus bipartidos.

O isolado do DNA-A de algodoeiro B012-6 quando comparado com diversos begomovírus bipartidos apresentou identidade máxima de sequência de 78% com Tomato common mosaic virus (ToCMV) (Figura 17) e, em análises filogenéticas, este agrupou-se com begomovírus recentemente relatados no Brasil como o Tomato common mosaic virus (ToCMV), Sida yellow leaf curl virus (SiYLCV) e Abutilon Brazil virus (AbBV), sendo dois deles isolados de malváceas. Além disso, o isolado B012-6 também foi agrupado com *Cucurbit leaf curl virus* (CuLCrV) e *Desmodium leaf distortion virus* (DesLDV) do México e *Squash mild leaf curl virus* (SMLCuV) dos Estados Unidos (Figura 19). De acordo com o critérios taxonômicos do ICTV para o gênero *Begomovirus*, sequências do DNA-A com mais de 89% de identidade são consideradas da mesma espécie. Identidade de sequência abaixo de 93% caracteriza nova estirpe dentro da espécie, enquanto que identidade acima de 94% caracteriza uma variante daquela estirpe (King et al, 2012), assim o clone B012-6 é considerado um isolado de uma nova espécie. Apesar do vírus isolado de algodoeiro compartilhar ancestrais comuns com espécies da América do Norte e Central, aparentemente esse vírus evoluiu independentemente no Brasil. Estudos de círculo de hospedeiras não foram realizadas, por isso ainda não se sabe se o vírus é importante para a agricultura do país e se ele causa perdas em algodoeiro.

O isolado T51-1 do DNA-B de algodoeiro apresentou identidade de 64% com *Cabbage leaf curl virus* (CabLCV) e *Rhynchosia golden mosaic virus* (RhRGMV) (Figura 18) e a análise filogenética colocou o isolado em um grupo composto principalmente por

begomovírus típicos da América Central (Figura 20). O clone B de algodoeiro apresentou a mesma sequência de íteron GGAG do clone A (B012-6), indicando que podem ser componentes de um mesmo isolado viral (Figura 14), mas somente uma avaliação biológica de círculo de hospedeiras poderá confirmar se os clones T51-1 (DNA-B) e B012-6 (DNA-A) compõem um mesmo vírus. Análises da região comum de ambos os componentes isolados de algodoeiro mostraram que apenas o clone S6 de malva-preta obtido no trabalho tinha a mesma sequência de íteron GGAG, ou seja, há possibilidade de ocorrer pseudorecombinação com o isolado B de malva-preta (Figura 21).

Os clones de hibisco-colibri HA5-1 (DNA-A) e HB5-1 (DNA-B) apresentaram identidade maior de 78% e 74%, respectivamente, com Abutilon mosaic Bolivia virus (AbMBoV) (Figura 17 e Figura 18). As análises filogenéticas mostraram que os isolados têm relação filogenética semelhante, pois ambos aproximaram-se de um mesmo begomovírus não relatado no Brasil (Figura 20 e Figura 21). De acordo com o critérios taxonômicos do ICTV para o gênero *Begomovirus* (King et al., 2012) o HA5-1 juntamente com o HB5-1 são considerados componentes de uma nova espécie, já que o clone B (HB5-1) de hibisco-colibri apresentou a mesma provável sequência de íteron GGAA do clone A (HA5-1), indicando que provavelmente são componentes cognatos de um mesmo vírus (Figura 15), mas somente uma avaliação biológica de círculo de hospedeiras poderá confirmar que os clones HA5-1 (DNA-A) e HB5-1 (DNA-B) representam componentes do mesmo vírus. Estudos de infectividade e círculo de hospedeiras ainda não foram realizadas, não sendo possível verificar se o vírus é importante para a agricultura do país e se ele é infectivo para outras malváceas. A análise da região comum revelou que a sequência de íteron GGAA é diferente dos outros begomovírus (Figura 21).

O clone S6 do DNA-B do isolado de malva-preta aproximou-se em 69% com *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV) (Figura 18). As análises filogenéticas mostraram que o

isolado faz parte de um grupo formado basicamente por begomovírus brasileiros (Figura 20). O DNA-A ainda não foi encontrado, apesar de comprovada a sua presença por PCR. Muito provavelmente o componente A do isolado de malva-preta não foi encontrado porque a enzima BamHI utilizada na clonagem não foi capaz de clivar os dois componentes de DNA, sendo necessário um novo estudo de digestão de enzimas para selecionar a que corta apenas o DNA-A e seguir com as clonagens. A presença do DNA-A é essencial para seguir com os estudos de identificação desse vírus.

Baseado nos critérios taxonômicos atuais (King et al, 2012) os clones obtidos no trabalho muito provavelmente representam novas espécies no gênero *Begomovirus*. As regiões comuns dos possíveis clones cognatos apresentam identidade superior a 97% e possuem íterons idênticos: GGAA (clones de hibisco-colibri) e GGAG (clones de algodoeiro), e o clone do DNA-B (S6) isolado de malva-preta, para o qual não foi encontrado o DNA-A, apresenta todas as características do DNA-B dos begomovírus.

Begomovírus em algodoeiro causam sérias doenças em países asiáticos e do continente Africano, como por exemplo a “cotton leaf curl disease” (CLCuD) associada a mais de uma espécie de begomovírus. Nas Américas, *Cotton leaf crumple virus* (CLCrV) foi descrito pela primeira vez no estado do Arizona, México. Essas viroses foram pouco relatadas nas Américas, apesar de uma doença associada a begomovírus causadora de sintomas de mosaico e amarelecimento ser sempre observada em algodoads no Caribe, nas Américas do Sul e Central. O vírus associado a esse sintoma ainda não foi muito bem caracterizado, mas baseado em poucas sequências disponíveis, aproxima-se do CLCrV (Bridson et al, 2000; Idris & Brown, 2004). Análises de pseudorecombinação demonstraram que CLCrV há grandes possibilidades de ter sofrido pseudorecombinação com um isolado de cucurbitácea *Squash leaf curl virus* (SLCuV) e *Abutilon mosaic virus* (AbMV) (Idris & Brown, 2004). Nas análises filogenéticas, o isolado B012-6 aproximou-se, entre outros, dos vírus de algodão CLCrV,

cucurbitáceas SMLCuV e CuLCrV e da espécie brasileira isolada de abutilon (AbBV). Além disso, *Desmodium leaf distortion virus* (DesLDV) que apresentou relação filogenética com B012-6 e foi caracterizada na mesma região do CLCrV.

Os vírus mais relacionados aos isolados obtidos no trabalho foram os brasileiros Tomato mild mosaic virus (ToMMV), Sida yellow leaf curl virus (SiYLCV), Abutilon Brazil virus (AbBV) e Abutilon mosaic Bolivia virus (AbMBoV) (Castillo-Urquiza et al, 2008; Paprotka et al, 2010b; Wyant et al, 2011). ToMMV e SiYLCV em uma análise filogenética com outros begomovírus não agruparam com os vírus brasileiros, indicando que essas novas espécies podem representar uma linhagem distinta nos begomovírus do Novo Mundo, encontrada no Brasil pela primeira vez (Castillo-Urquiza et al, 2008). Os componentes do AbMBV são proximamente relatados com vírus de malváceas do Brasil que infectam plantas daninhas do gênero *Sida* e quiabeiro. Tanto o DNA-A quanto o DNA-B de AbMBV são distantes filogeneticamente do begomovírus clássico que infecta plantas de *Abutilon* sp. originário da Índia. O DNA-A de AbMBoV agrupou-se filogeneticamente aos vírus Sida micrantha Bolivia virus (SiMBoV) e Cleome leaf crumple virus (CILCrV), primeiro begomovírus bipartido relatado a possuir DNA- α , juntamente com EuMV. O DNA-B foi agrupado aos begomovírus brasileiros ToYVSV, TGMV e aos recentemente relatados ToMMV e SiBV (Castillo-Urquiza et al, 2008; Paprotka et al, 2010c; Wyant et al, 2011).

Durante muitas décadas, o mosaico frequentemente associado a plantas daninhas do gênero *Sida* era erroneamente associado a uma variante do vírus *Abutilon mosaic virus* (AbMV), primeiro begomovírus bipartido caracterizado no mundo e descrito na Índia. Mais tarde, foi descoberto que o sintoma de mosaico em plantas do gênero *Sida* era causado por, pelo menos, duas espécies de begomovírus típicos da América do Sul: *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV) e *Sida mottle virus* (SiMoV) (Jovel et al, 2004). A espécie brasileira de begomovírus isolada de *Abutilon* sp. não apresenta relação filogenética com AbMV (Paprotka

et al, 2010c), além disso, em ambas árvores filogenéticas construídas no trabalho o AbMV agrupou-se de forma distante tanto dos componentes A (HA5-1 e B012-6) quanto dos componentes B (HB5-1, T51-1 e S6) (Figura 19 e Figura 20). Sida common mosaic virus (SiCMV), recentemente descrito no Brasil, apresentou uma relação filogenética próxima com os conhecidos SiMMV e SiMoV indicando que é um vírus que está presente na natureza há muito tempo e que provavelmente já fazia parte do complexo infeccioso de *Sida* spp. responsável por causar o famoso mosaico associado anteriormente a AbMV (Castillo-Urquiza et al, 2008).

Os begomovírus *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OYMMV), *Sida yellow mosaic Yucatan virus* (SiYMYuV) e *Sida golden mosaic virus* (SiGMV) são importantes vírus de malváceas, são filogeneticamente próximos e estão associados a plantas daninhas e plantas cultivadas (Hernández-Zepeda et al, 2007). SiYMYuV e SiGMV foram originalmente agrupados no clado do AbMV, mantendo esse posicionamento nas análises realizadas no trabalho e, conseqüentemente, distante dos isolados do DNA-A e do DNA-B obtidos (Figura 19 e Figura 20).

No Brasil há grande diversidade de begomovírus infectando plantas cultivadas, plantas daninhas e plantas ornamentais. Desde o aumento da incidência de begomovírus em tomateiros no início dos anos de 1990, associado ao “boom” populacional de mosca-branca em campos cultivados no Brasil, já foram relatados dez espécies definitivas de begomovírus bipartidos no país, dez tentativas e, aproximadamente, treze foram propostas. A maior parte das espécies descritas foi isolada de plantas da família *Solanaceae*. Dessa total, três espécies definitivas, três tentativas e duas propostas foram isoladas de plantas da família *Malvaceae*. As três espécies definitivas de begomovírus isoladas de malváceas são: *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV), *Sida mottle virus* (SiMoV) e *Sida yellow mosaic virus* (SiYMV). As espécies tentativas são: Okra mottle virus (OMoV), Sida yellow leaf curl virus (SiYLCV) e

Sida common mosaic virus (SiCmMV). As espécies de begomovírus propostas isoladas de malváceas no Brasil são: Abutilon mosaic Brazil virus (AbMBV) e Sida golden mosaic Brazil virus (SiGMBV) (Aranha et al, 2011; Castillo-Urquiza et al, 2008; Jovel et al, 2004; King et al, 2012; Paprotka et al, 2010b; Paprotka et al, 2010c). Grande parte das plantas invasoras relatadas como hospedeiras de begomovírus são malváceas. Dados convincentes indicam que plantas invasoras podem funcionar como fontes de inóculo de begomovírus para plantas cultivadas e que a erradicação dessas plantas das áreas de cultivo deve ser uma medida adotada visando a redução da incidência desses vírus (Assunção et al, 2006). No Brasil, já se realizaram estudos objetivando caracterizar molecularmente isolados de geminivírus que infectam plantas cultivadas, sobretudo o feijoeiro e o tomateiro (Calegario et al, 2007; Castillo-Urquiza et al, 2008; Faria & Maxwell, 1999; Faria et al, 1997; Ribeiro et al, 1998). Os resultados desses estudos revelam enorme variabilidade genética entre os isolados. Resultados prévios indicam que, a exemplo do que ocorre com plantas cultivadas, a variabilidade é muito grande entre os begomovírus que infectam plantas invasoras (Ambrozevicius et al, 2002; Calegario et al, 2004; Castillo-Urquiza et al, 2008). A caracterização de begomovírus que infectam plantas invasoras é a etapa inicial para se chegar a importantes informações sobre aspectos ecológicos e evolutivos a respeito desses vírus. Poderá também contribuir para elucidar se esses isolados podem infectar plantas cultivadas de importância para todo o país.

No Brasil, embora os primeiros relatos de mosca-branca sejam de 1928, o primeiro registro oficial ocorreu em 1968 em algodoeiro, soja e feijão no estado do Paraná e em 1972 e 1973 no estado de São Paulo (Ferreira & Diniz, 1998). A mosca-branca além de vetora de vírus também é considerada praga para culturas agrícolas de hortaliças e fruteiras. Nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste a mosca-branca vem causando sérios danos à culturas de pimentão, tomate, pepino, repolho, soja, melancia, algodão, feijão, abóbora e jiló. Nas regiões Sul e Sudeste também têm ocorrido grandes perdas pela incidência de moscas-brancas. No

estado de São Paulo, este inseto vem se dispersando com muita rapidez, atacando um número cada vez maior de culturas, principalmente soja, algodão e milho, além do tomate, abóbora, brócolis, crisântemo, poinsettia e até mesmo plantas invasoras da família *Malvaceae*. Além disso, tem disseminado de forma agressiva o begomovírus (Ferreira & Diniz, 1998).

Begomovírus são agentes de uma importante doença em algodoads na Ásia e na África a “cotton leaf curl disease” (CLCuD) relatada desde o final dos anos de 1960, vindo a se tornar uma das maiores barreiras à produção algodoeira no início dos anos de 1990, causando perdas estimadas de US\$5 bilhões em apenas cinco anos (Briddon et al, 2000). No sudeste da América do Norte e na América Central, o begomovírus bipartido *Cotton leaf crumple virus* (CLCrV) foi responsável por causar uma das maiores epidemias na produção algodoeira do estado do Arizona no início dos anos de 1980, sendo registrado também na época plantas da família *Malvaceae*, *Malva parviflora*, associadas à cultura com sintomas da doença provocada pelo vírus CLCrV, a “cotton leaf crumple disease” (CLCrD). Mas atualmente essa doença não tem causado perdas significativas na cultura nessas regiões (Briddon & Markham, 2000; Brown & Nelson, 1984). No Brasil e em toda América do Sul, algodoeiros com mosaico amarelo são observados com frequência, mas poucos estudos foram realizados. O CLCrV, apesar de ser um begomovírus bipartido, é próximo filogeneticamente de algumas espécies causadoras da CLCuD, já que possui um complexo viral etiológico. As poucas sequências existentes do vírus que causa sintomas de mosaico em plantas de algodoeiro no Brasil e em países da América do Sul mostram relação com o CLCrV (Briddon & Markham, 2000).

Inicialmente, a CLCuD não era uma doença importante, tornado-se totalmente relevante 20 anos depois das primeiras observações, as quais foram negligenciadas. Fato semelhante ocorrido com o aumento repentino de infecções por begomovírus em meados dos anos de 1990 em importantes culturas no Brasil, como feijão e tomate, devido à disseminação da mosca-branca biótipo B, quando os primeiros relatos do patógeno tinham sido há anos atrás. A produção algodoeira no Brasil cresceu mais de 70% no ano de 2011 (IBGE, 2011),

destacando o estado do Mato Grosso como o maior produtor brasileiro e tornou-se uma alternativa para a rotação de cultura com a soja, outro importante produto agrícola para a economia brasileira. Além disso, mais de 75% do custo de produção com a cultura do algodão é com mão-de-obra, o que significa ocupação para milhares de trabalhadores rurais. A cultura do algodoeiro tem tido grande importância não só na balança comercial brasileira, mas também no desenvolvimento social, com a agricultura familiar. Begomovírus já mostraram grande potencial para causar epidemias no Brasil e no mundo, portanto o levantamento e o acompanhamento da detecção de novas espécies deve ser constante.

Hibisco-colibri é uma planta ornamental muito utilizada em jardins, dessa forma é usualmente propagada vegetativamente e tem a mosca-branca como praga (Ingram et al, 2003). Por isso, pode se tornar um importante fator na disseminação de begomovírus, além de ter a possibilidade de atuar como fonte de vírus por um longo período, pois é um arbusto lenhoso, perene e adaptável a diferentes condições ambientais, como solos úmidos ou secos, ácidos ou alcalinos, férteis ou pobres, ambiente com muita ou pouca luz, florescendo quase o ano todo (Ingram et al, 2003). A sequência nonanucleotídica encontrada nos clones dos isolados de hibisco-colibri HA5-1 e HB5-1 é diferente da maior parte dos geminivírus já relatados, divergindo do restante da família, pois possui uma substituição de A para G: TAGTATT↓AC (Figura 15), semelhante aos nanovírus, algumas moléculas de DNA-β e a maioria dos DNAs-α. Tanto nos geminivírus quanto nos nanovírus, essa sequência conservada de nove nucleotídeos se encontra em uma estrutura tipo grampo ou “hairpin”, atuando como a origem de replicação da fita viral de DNA. Essa sequência é reconhecida pela proteína Rep, iniciando a replicação (Bigarre et al, 2001; Briddon et al, 2003; Briddon et al, 2004).

A planta de malva-preta (*Sidastrum micranthum*) com sintomas de mosaico dourado foi encontrada na região central da cidade de Brasília, mais precisamente no Jardim Zoológico Sgt. Sílvio Delmar Holleback. No local de coleta, havia apenas uma planta da espécie, se tratando de um arbusto grande e vistoso, indicando a atuação de moscas-brancas também na

cidade. A planta pode ter de dois a três metros de altura e está distribuída no Brasil, Colômbia, Cuba, Guiana, Costa Rica, Venezuela e foi recentemente relatada na Índia (Shimpale et al, 2009). O gênero *Sidastrum* é muito semelhante ao gênero *Sida*, diferindo apenas em sutis características morfológicas, como tipo do cálice da flor e a consistência do fruto (Shimpale et al, 2009). Por esse motivo, *Sidastrum micranthum* e *Sida micrantha* são sinônimos para uma mesma espécie botânica. Um número considerável de espécies de begomovírus já foram isoladas de *Sida micrantha* encontrada na zona rural, associadas a importantes culturas como o tomateiro (Castillo-Urquiza et al, 2008) ou no perímetro urbano, como jardins residenciais (Paprotka et al, 2010c) e agora em um jardim zoológico.

A mosca-branca não é só vetora de vírus, sendo que também atua como praga nas culturas agrícolas, por se alimentar da seiva das plantas, podendo levá-las à morte ou à diminuição da produção, especialmente quando há alta densidade do inseto. Além disso, elimina uma excreção açucarada que induz o aparecimento de fungos, provocando a apodrecimento de ramos, folhas flores e frutos (Ferreira & Diniz, 1998). Esses danos comprometem a aparência, prejudicando a comercialização dos produtos, principalmente de frutas para exportação e de plantas ornamentais, como poinsettia (bico-de-papagaio) e o crisântemo (Ferreira & Diniz, 1998; Shimpale et al, 2009). Pela sua ampla distribuição e por se tratar de um inseto polífago, atacando diversas espécies de plantas de todo o mundo, a mosca-branca tornou-se conhecida como a praga do século XX, limitando tanto o mercado agrícola nacional, quanto o de paisagismo e jardinagem. Além disso, a mosca-branca adquire facilmente resistência aos produtos químicos utilizados no seu controle, por isso as perdas ocasionadas por essa praga chegam a 100% em diversas culturas de frutas e hortaliças, o que pode resultar em sérias epidemias, comprometendo a economia nacional.

O constante aumento das população de moscas-brancas, juntamente com a grande diversidade de begomovírus, demanda continuados esforços para o estabelecimento de

medidas eficientes de manejo desse complexo de pragas, medidas essas indispensáveis para viabilizar a produção agrícola nacional.

6. Considerações Finais

Atualmente, as begomoviroses vêm causando prejuízos devastadores, com epidemias e perdas de produtividade em diversos países das regiões tropical e subtropical. Doenças causadas por begomovírus são referidas repetitivamente como um fator biótico limitante para produção de diversas culturas agrícolas ao redor do mundo, como feijão, tomate, algodão, mandioca, pimentão, diversas cucurbitáceas, fumo, quiabo, batata, repolho, etc. As perdas de produção por área podem chegar a 100% dependendo na cultura afetada e da espécie viral atuante, gerando perdas de milhões de dólares para o país (Polston & Anderson, 1997).

Plantas invasoras, ou plantas daninhas também exercem um importante papel no estabelecimento deste quadro. Infecções de plantas invasoras por begomovírus no Brasil são relatadas desde a década de 1940. Ao que tudo indica, essas plantas podem atuar como reservatório de vírus para importantes culturas cultivadas. Vírus de plantas alternativas transmitidos para plantas cultivadas foram relatados há mais de 40 anos por Costa & Carvalho (1960) quando os begomovírus *Abutilon mosaic virus* e o *Euphorbia mosaic virus* foram transmitidos para tomateiro por meio do inseto vetor mosca-branca. Ainda, em condições experimentais Frichmuth et al. (1997) demonstraram que o *Sida golden mosaic virus* (SiGMV) pode ser transmitido por moscas-brancas para feijoeiros. Pesquisa recente conduzida por Cotrim et al. (2007) determinou que cerca de 10% das amostras de tomateiros coletadas com sintomas de mosaico na região Centro-Oeste do Estado de São Paulo estavam infectadas com *Sida mottle virus* (SiMoV). Calegario et al. (2004), em Minas Gerais, verificaram infecção natural do tomateiro com um isolado de *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV).

Neste trabalho três novas espécies de begomovírus foram apresentadas: uma infectando a cultivada algodoeiro (*Gossypium hirsutum*), outra infectando uma planta ornamental conhecida como hibisco-colibri (*Malvaviscus arboreus*) e a terceira infectando a planta daninha malva-preta (*Sidastrum micranthum*), todas fazendo parte da família

Malvaceae. Ainda não havia relatos de begomovírus em hibisco-colibri, sendo que o begomovírus encontrado nesta planta apresentou sequência genômica distinta para ser considerado como um isolado pertencente a uma nova espécie. Adicionalmente, os dois componentes virais não continham os nove nucleotídeos típicos dos geminivírus, sugerindo ser este um vírus que merece um estudo mais aprofundado. *Gossypium* spp. é conhecidamente afetado por uma importante doença em países asiáticos e africanos a “cotton leaf curl disease”, causada por um complexo viral de begomovírus monopartidos e também sendo os primeiros vírus a serem reportados como associados à presença de DNAs satélites no gênero. Plantas de algodão também são infectadas por begomovírus bipartidos, mas estas espécies são descritas apenas em regiões da América Central e América do Norte. *Sidastrum micranthum*, sinônimo de *Sida micrantha*, é uma planta daninha muito conhecida por hospedar diferentes espécies de begomovírus e mais uma vez uma nova espécie foi encontrada. O DNA-B, único componente encontrado, apresentou uma relação filogenética próxima com vírus conhecidos com *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV) e com o vírus de tomate associado a plantas daninhas *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), mas se aproximou mais ainda de uma série de vírus descritos recentemente, inclusive do isolado encontrado em hibisco-colibri.

Os begomovírus isolados de diferentes espécies botânicas, até mesmo de diferentes famílias, podem ocorrer em uma mesma planta, criando um nicho favorável para recombinações e pseudorecombinações, como possivelmente ocorreu com o CLCrV (Idris & Brown, 2004). Análises de sequência indicam que o DNA-A de CLCrV foi possivelmente originado por recombinação entre ancestrais de dois grupos divergentes, o grupo formado pelo *Squash leaf curl virus* (SLCV), isolado de cucurbitácea nos Estados Unidos, e *Abutilon mosaic virus* (AbMV), isolado de *Abutilon* sp. na Alemanha. O DNA-B apresentou baixa identidade na região comum com o cognato A, sugerindo que o componente B provavelmente foi originado por uma recombinação entre um ancestral do grupo do SLCuV e outro ancestral distante e desconhecido do hemisfério ocidental, caracterizando uma pseudorecombinação na

formação da espécie *Cotton leaf crumple virus* (CLCrV) (Idris & Brown, 2004). A hipótese mais difundida entre os geminivirologistas é que a recombinação e pseudorecombinação podem gerar espécies ainda mais virulentas e agressivas, capazes de infectar um grupo muito maior de hospedeiras em diferentes famílias botânicas, aumentando os impactos negativos dos begomovírus na produção agrícola, refletindo diretamente na economia do país.

As espécies relatadas no estudo têm potencial para permanecer por muito tempo no ambiente e principalmente de infectar outras espécies de plantas amplamente distribuídas, como o tomateiro ou as plantas da família *Solanaceae*, já que o isolado de hibisco-colibri e o de malva-preta são relativamente próximos filogeneticamente e que espécies de begomovírus isoladas de *Sida micrantha* já foram encontradas infectando o tomateiro (Calegario et al, 2004). Além disso, há a relação filogenética próxima do ToYSV com o SiMoV (Calegario et al, 2007) e os begomovírus típicos de tomateiro infectando mais espécies da família *Solanaceae*, como ToSRV em pimentas, batateira e *Nicandra physaloides* (Barbosa et al, 2009; Bezerra-Agassie et al, 2006; Souza-Dias et al, 2008), indicando que a adaptação dos begomovírus às outras espécies de plantas está ocorrendo.

Os dados apresentados no trabalho exemplificam a alta diversidade dos begomovírus brasileiros, tornando-se essencial o levantamento constante das espécies virais encontradas no país e das culturas afetadas por elas, para que medidas preventivas possam ser tomadas, buscando diminuir o impacto dessas viroses na agricultura brasileira. Além disso, já que a mosca-branca é uma praga altamente resistente aos controles químicos e que não existem medidas curativas para vírus, as medidas preventivas são indispensáveis para tentar conter o avanço de begomovirose com grandes chances de causar epidemias, como o desenvolvimento de cultivares resistentes aos begomovírus.

O estudo em mais amostras de malváceas poderá revelar uma diversidade ainda maior de begomovírus do que em tomateiro, porém, pela longa co-evolução entre moscas-brancas

biótipo A e malváceas no Brasil, essa diversidade pode não ser tão grande assim. Isso somente estudos adicionais poderão dizer.

7. Referências Bibliográficas

- Albuquerque L, Inoue-Nagata A, Pinheiro B, Ribeiro S, Resende R, Moriones E, Navas-Castillo J (2011) A novel monopartite begomovirus infecting sweet potato in Brazil. *Archives of Virology* **156**: 1291-1294
- Albuquerque L, Varsani A, Fernandes F, Pinheiro B, Martin D, de Tarso Oliveira Ferreira P, Lemos T, Inoue-Nagata A (2012) Further characterization of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology*: 1-6
- 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
- Allem LN, Hoffmann LV, Inoue-Nagata AK, Barroso PAV. (2011) Avaliação da perda de produtividade de plantas de algodão com mosaico comum. 8º Congresso Brasileiro de Algodão & I Cotton Expo 2011, São Paulo, pp. 308-312.
- Ambrozevicius LP, Callegario RF, Fontes EPB, Carvalho MG, Zerbini FM (2002) Genetic diversity of begomovirus infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira* **27**: 372-377
- Aranha SA, Albuquerque LC, Boiteux LS, Inoue-Nagata AK (2011) Detection and complete genome characterization of a begomovirus infecting okra (*Abelmoschus esculentus*) in Brazil. *Tropical Plant Pathology* **36**: 14-20
- Assunção IP, Listik AF, Barros MCS, Amorin EPR, Silva SJC, O. Silva I, Ramalho-Neto CE, Lima GSA (2006) Diversidade genética de Begomovirus que infectam plantas invasoras na região nordeste. *Planta Daninha* **24**: 239-244
- Azevêdo DMP, Ramalho FS, Amaral JAB, Medeiros JC, Kouri J, Medeiros JC, Carvalho LP, Suassuna ND, Silva ORRFd, Freire RMM, Coutinho WM. (2006) Cultivo do Algodão Herbáceo na Agricultura Familiar: Importância econômica. In Beltrão NEM (ed.). Embrapa Algodão, Campina Grande, p. http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Algodao/AlgodaoAgriculturaFamiliar_2ed/autores.html.
- Barbosa J, Barreto S, Inoue-Nagata A, Reis M, Firmino A, Bergamin Filho A, Rezende J (2009) Natural infection of *Nicandra physaloides* by *Tomato severe rugose virus* in Brazil. *Journal of General Plant Pathology* **75**: 440-443

Bezerra-Agasie IC, Ferreira GB, de Ávila AC, Inoue-Nagata AK (2006) First Report of Tomato severe rugose virus in Chili Pepper in Brazil. *Plant Disease* **90**: 114-114

Bigarre L, Chazly M, Salah M, Ibrahim M, Padidam M, Nicole M, Peterschmitt M, Fauquet C, Thouvenel JC (2001) Characterization of a new begomovirus from Egypt infecting hollyhock (*Althea rosea*). *European Journal of Plant Pathology* **107**: 701-711

Briddon RW, Bull SE, Amin I, Idris AM, Mansoor S, Bedford ID, Dhawan P, Rishi N, Siwatch SS, Abdel-Salam AM, Brown JK, Zafar Y, Markham PG (2003) Diversity of DNA β , a satellite molecule associated with some monopartite begomoviruses. *Virology* **312**: 106-121

Briddon RW, Bull SE, Amin I, Mansoor S, Bedford ID, Rishi N, Siwatch SS, Zafar Y, Abdel-Salam AM, Markham PG (2004) Diversity of DNA 1: a satellite-like molecule associated with monopartite begomovirus–DNA β complexes. *Virology* **324**: 462-474

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**: 19-26

Briddon RW, Mansoor S, Bedford ID, Pinner MS, Saunders K, Stanley J, Zafar Y, Malik KA, 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 Res* **71**: 151-159

Brown JK, Nelson MR (1984) Geminata Particles Associated with Cotton Leaf Crumple Disease in Arizona. *Phytopathology* **74**: 987-990

Calegario RF, Ferreira SS, Andrade EC, Zerbini F (2007) Characterization of Tomato yellow spot virus, a novel tomato-infecting begomovirus in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **42**: 1335-1343

Calegario RF, Ferreira SS, Zerbini F (2004) Caracterização de um isolado do *Begomovirus Sida micrantha virus* (SimMV) obtido de tomateiro. *Fitopatologia Brasileira* **29**: 150

Castillo-Urquiza G, Beserra J, Bruckner F, Lima A, Varsani A, Alfenas-Zerbini P, Murilo Zerbini F (2008) Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Archives of Virology* **153**: 1985-1989

Chatterjee A, Ghosh S (2007b) Association of a satellite DNA β molecule with mesta yellow vein mosaic disease. *Virus Genes* **35**: 835-844

Chatterjee A, Ghosh SK (2007a) A new monopartite begomovirus isolated from *Hibiscus cannabinus* L. in India. *Archives of Virology* **152**: 2113-2118

Chatterjee A, Roy A, Ghosh SK (2008) Acquisition, transmission and host range of a begomovirus associated with yellow vein mosaic disease of mesta (*Hibiscus cannabinus* and *Hibiscus sabdariffa*). *Australasian Plant Pathology* **37**: 511-519

Chatterjee A, Roy A, Padmalatha KV, Malathi VG, Ghosh SK (2005) Yellow vein mosaic disease of Kenaf (*Hibiscus cannabinus*) and Roselle (*H. sabdariffa*): a new disease in India caused by a *Begomovirus*. *Indian Journal of Virology* **16**: 55-56

Costa AS (1954) Identidade entre o mosaico comum do algodoeiro e a clorose infecciosa das malváceas. *Bragantia* **13**: XXIII-XXVI

Costa AS (1955) Studies on Abutilon mosaic in Brazil. *Phytopathology* **24**: 97-112

Costa AS (1965) Three whitefly-transmitted virus diseases of beans in São Paulo, Brazil. *FAO Plant Protection Bulletin* **13**: 121-130

Costa AS, Bennett CW (1950) Whitefly-transmitted mosaic of *Euphorbia prunifolia*. *Phytopathology* **40**: 266-283

Costa AS, Carvalho AM (1960) Comparative studies between *Abutilon* and *Euphorbia* mosaic viruses. *Phytopathol Zeitsch* **38**: 129-152

Costa AS, Carvalho AMB (1962) Moléstias de vírus do algodoeiro. *Bragantia* **21**: 45-62

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 Phytopathologica* **33**: 300-303

Czosnek H, Laterrot H (1997) A worldwide survey of tomato yellow leaf curl viruses. *Archives of Virology* **142**: 1391-1406

Das S, Ghosh R, Paul S, Roy A, Ghosh S (2008) Complete nucleotide sequence of a monopartite begomovirus associated with yellow vein mosaic disease of mesta from north India. *Archives of Virology* **153**: 1791-1796

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**: 11-15

Dry IB, Krake LR, Rigden JE, Rezaian MA (1997) A novel subviral agent associated with a geminivirus: The first report of a DNA satellite. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 7088-7093

Faria JC, Maxwell DP (1999) Variability in Geminivirus Isolates Associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. *Phytopathology* **89**: 262-268

Faria JC, Souza-Dias JAC, Slack SA, Maxwell DP (1997) A New Geminivirus Associated with Tomato in the State of São Paulo, Brazil. *Plant Disease* **81**: 423-423

Fauquet C, Thouvenel JC (1987) Okra leaf curl virus. In: Plant viral diseases in the Ivory Coast. ' *Editions de l'ORSTOM*: 96-97

Fauquet CM, Bisaro DM, Briddon RW, Brown JK, Harrison BD, Rybicki EP, Stenger DC, Stanley J (2003) <i>Virology division news</i> : Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family <i>Geminiviridae</i> , and an updated list of begomovirus species. *Archives of Virology* **148**: 405-421

Fernandes F, Albuquerque L, de Oliveira C, Cruz A, da Rocha W, Pereira T, Naito F, Dias Nd, Nagata T, Faria J, Zerbini F, Aragão F, Inoue-Nagata A (2011) Molecular and biological characterization of a new Brazilian begomovirus, euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV), infecting <i>Euphorbia heterophylla</i> plants. *Archives of Virology* **156**: 2063-2069

Fernandes F, Cruz A, Faria J, Zerbini F, Aragão F (2009) Three distinct begomoviruses associated with soybean in central Brazil. *Archives of Virology* **154**: 1567-1570

Fernandes F, de Albuquerque L, de Britto Giordano L, Boiteux L, de Ávila A, Inoue-Nagata A (2008) Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes* **36**: 251-258

Fernandes JJ, Carvalho MG, Andrade EC, Brommonschenkel SH, Fontes EPB, Zerbini FM (2006) Biological and molecular properties of Tomato rugose mosaic virus (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Plant Pathology* **55**: 513-522

Ferreira LT, Diniz MF (1998) Mosca-branca: presença indesejável no Brasil. *Biotecnol Cienc Desenv* **1**: 22-26

Ferreira SS, Barros DR, Almeida MRd, Zerbini FM (2010) Characterization of Passionfruit severe leaf distortion virus, a novel begomovirus infecting passionfruit in Brazil, reveals a close relationship with tomato-infecting begomoviruses. *Plant Pathology* **59**: 221-230

Flores E, SILBERSCHMIDT K, KRAMER M (1960) Observações de “clorose infecciosa” das malváceas em tomateiros do campo. *Biológico* **26**: 65-69

Frischmuth T, Engel M, Jeske SL (1997) Nucleotide sequence evidence for the occurrence of three distinct whitefly-transmitted, *Sida*-infecting bipartite geminiviruses in Central America. *Journal of General Virology* **78**: 2675–2682

Ghanem GAM (2003) Okra leaf curl virus: A monopartite begomovirus infecting okra crop in Saudi Arabia. *Arab J Biotech* **6**: 139-152

Gilbertson RL, Hidayat SH, Martinez RT, Leong SA, Faria JC, Morales F, Maxwell DP (1991) Differentiation of bean-infecting geminiviruses by nucleic acid hybridization probes and aspects of bean golden mosaic in Brazil. *Plant Disease* **75**: 336-342

Giordano LB, Fonseca MEN, Silva JBC, Inoue-Nagata AK, Boiteux LS (2005) Efeito da infecção precoce por Begomovirus com genoma bipartido em características de frutos de tomate industrial. *Horticultura Brasileira* **23**: 815-818

Givord L, Boer LD (1980) Insect transmission of okra mosaic virus in the Ivory Coast. *Annals of Applied Biology* **94**: 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 AP, Martin DP, Roye ME (2010) Molecular characterization and phylogeny of two begomoviruses infecting *Malvastrum americanum* in Jamaica: evidence of the contribution of inter-species recombination to the evolution of malvaceous weed-associated begomoviruses from the Northern Caribbean. *Virus Genes* **40**: 256-266

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

Hajdukiewicz P, Svab Z, Maliga P (1994) The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Molecular Biology* **25**: 989-994

Harrison BD (1985) Advances in Geminivirus Research. *Annual Review of Phytopathology* **23**: 55-82

Hernández-Zepeda C, Idris A, Carnevali G, Brown J, Moreno-Valenzuela O (2007) Molecular characterization and phylogenetic relationships of two new bipartite begomovirus infecting malvaceous plants in Yucatan, Mexico. *Virus Genes* **35**: 369-377

Hull R (2002a) Genome Organization. In *Matthew's Plant Pathology*, Hull R (ed), 4th edn, pp 171-221. London: Academic Press

Hull R (2002b) Transmission 1: By Invertebrates, Nematodes and Fungi In *Matthew's Plant Pathology*, Hull R (ed), 4th edn, pp 485-532. London: Academic Press

IBGE. (2011) Indicadores IBGE. In Mata AP, Araújo HdC, Souza MAd, Branco TCV (eds.), *Estatística da Produção Agrícola*. IBGE, p. 100.

ICTV. (2011)
http://talk.ictvonline.org/files/proposals/taxonomy_proposals_plant1/m/plant01/3979.aspx

Idris AM, Brown JK (2000) Identification of a New, Monopartite Begomovirus Associated with Leaf Curl Disease of Cotton in Gezira, Sudan. *Plant Disease* **84**: 809-809

Idris AM, Brown JK (2004) Cotton leaf crumple virus Is a Distinct Western Hemisphere Begomovirus Species with Complex Evolutionary Relationships Indicative of Recombination and Reassortment. *Phytopathology* **94**: 1068-1074

Ingram DL, Midcap JT, Barrick WE. (2003) Selected Shrubs for Central Florida. University of Florida, pp. 1-10.

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 LdB, Bezerra IC, Ávila ACd (2006) New species emergence via recombination among isolates of the Brazilian tomato infecting Begomovirus complex. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **41**: 1329-1332

Jose J, Usha R (2003) Bhendi Yellow Vein Mosaic Disease in India Is Caused by Association of a DNA β Satellite with a Begomovirus. *Virology* **305**: 310-317

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

King AMG, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB (2012) *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* London: Elsevier/Academic Press.

Kitajima EW (1979) Levantamento preliminar de vírus de plantas cultivadas nos arredores de Manaus, AM. *Acta Amazônica* **9**: 633-640

Kitajima EW, Rodrigues JCV, Freitas-Astua J (2010) An annotated list of ornamentals naturally found infected by Brevipalpus mite-transmitted viruses. *Scientia Agricola* **67**: 348-371

Konate G, Barro N, Fargette D, Swanson MM, Harrison BD (1995) Occurrence of whitefly-transmitted geminiviruses in crops in Burkina-Faso, and their serological detection and differentiation. *Annals of Applied Biology* **126**: 121-129

Lima MF, Bezerra IC, Ribeiro SG, Ávila AC (2001) Distribuição de geminivírus nas culturas do tomate e pimentão em doze municípios do Submédio do Vale São Francisco. *Fitopatologia Brasileira* **26**: 81-85

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, Briddon RW, Zafar Y, Stanley J (2003) Geminivirus disease complexes: an emerging threat. *Trends in Plant Science* **8**: 128-134

Mansoor S, Khan SH, Hussain M, Zafar Y, Pinner MS, Briddon RW, Stanley J, Markham PG (2000) Association of a Begomovirus and Nanovirus-like Molecule with Ageratum Yellow Vein Disease in Pakistan. *Plant Disease* **84**: 101-101

Matyis JC, Silva DM, R. OAA, S. CA (1975) Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. *Summa Phytopathologica* **1**: 267-274

Mayo MA, Brunt AA (2002) Nomenclatura and Classification of Plant Viruses. In *Mattews' Plant Virology*, Hull R (ed), 4th edn, pp 13-45. London: Academic Press

Monjane AL, Harkins GW, Martin DP, Lemey P, Lefevre P, Shepherd DN, Oluwafemi S, Simuyandi M, Zinga I, Komba EK, Lakoutene DP, Mandakombo N, Mboukoulida J, Semballa S, Tagne A, Tiendrebeogo F, Erdmann JB, van Antwerpen T, Owor BE, Flett B, Ramusi M, Windram OP, Syed R, Lett JM, Briddon RW, Markham PG, Rybicki EP, Varsani A (2011) Reconstructing the History of Maize Streak Virus Strain A Dispersal To Reveal Diversification Hot Spots and Its Origin in Southern Africa. *J Virol* **85**: 9623-9636

Morales FJ, Anderson PK (2001b) The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology* **146**: 415-441

Morra MR, Petty ITD (2000) Tissue Specificity of Geminivirus Infection Is Genetically Determined. *The Plant Cell Online* **12**: 2259-2270

N'Guessan KP, Fargette D, Fauquet C, Thouvenel JC (1992) Aspects off the epidemiology of okra leaf curl virus in Côte d'Ivoire. *Tropical Pest Management* **38**: 122-126

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

Novaes QS, Freitas-Astua J, Yuki VA, Kitajima EW, Camargo LEA, Rezende JAM (2003) Partial characterization of a bipartite begomovirus infecting yellow passion flower in Brazil. *Plant Pathology* **52**: 648-654

Paprotka T, Boiteux LS, Fonseca MEN, Resende RO, Jeske H, Faria JC, Ribeiro SG (2010a) Genomic diversity of sweet potato geminiviruses in a Brazilian germplasm bank. *Virus Res* **149**: 224-233

Paprotka T, Metzler V, Jeske H (2010b) The complete nucleotide sequence of a new bipartite begomovirus from Brazil infecting Abutilon. *Archives of Virology* **155**: 813-816

Paprotka T, Metzler V, Jeske H (2010c) The first DNA 1-like α satellites in association with New World begomoviruses in natural infections. *Virology* **404**: 148-157

Picó B, Díez MJ, Nuez F (1996) Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The Tomato yellow leaf curl virus — a review. *Scientia Horticulturae* **67**: 151-196

Polston JE, Anderson PK (1997) The Emergence Of Whitefly-Transmitted Geminiviruses in Tomato in the Western Hemisphere. *Plant Disease* **81**: 1358-1369

Pooma W, Gillette WK, Jeffrey JL, Petty ITD (1996) Host and Viral Factors Determine the Dispensability of Coat Protein for Bipartite Geminivirus Systemic Movement. *Virology* **218**: 264-268

Quintela ED, Moraes MMd, Rosa AS. (2008) Controle de Adultos e Ninfas da Mosaca-Branca *Bemisia Tabaci* Biótipo B com Chlorantraniliprole + Thiamethoxan. Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, pp. 1-4.

Ribeiro SG, Ambrozevícius LP, Ávila AC, Bezerra IC, Calegario RF, Fernandes JJ, Lima MF, de Mello RN, Rocha H, Zerbini FM (2003) Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology* **148**: 281-295

Ribeiro SG, de Ávila AC, Bezerra IC, Fernandes JJ, Faria JC, Lima MF, Gilbertson RL, Maciel-Zambolim E, Zerbini FM (1998) Widespread Occurrence of Tomato Geminiviruses in Brazil, Associated with the New Biotype of the Whitefly Vector. *Plant Disease* **82**: 830-830

Ribeiro SG, Martin DP, Lacorte C, Simões IC, Orlandini DRS, Inoue-Nagata AK (2007) Molecular and Biological Characterization of Tomato chlorotic mottle virus Suggests that Recombination Underlies the Evolution and Diversity of Brazilian Tomato Begomoviruses. *Phytopathology* **97**: 702-711

Richetti A, Araújo AEd, Morello CdL, Silva CADd, Lazarotto C, Azevedo DMPd, Freire EC, Arantes EM, Lamas FM, Ramalho FdS, Andrade FP, Filho GAdM, Ferreira GB, Santana JCFd, Amaral JABd, Medeiros JdC, Bezerra JRC, Pereira JR, Silva KLd, Staut LA, Silva LC, Chitarra LG, Barros MAL, Carvalho MdCS, Luz MJdSe, Beltrão NEdM, Suassuna ND, Silva ORRFd, Ferreira PF, Santos RFd, Fonsêca RGd. (2003) Cultura do Algodão no Cerrado. Embrapa Algodão, Campina Grande, p. <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Algodao/AlgodaoCerrado/index.htm>.

Rojas MR, Gilbertson RL, Russell DR, Maxwell DP (1993) Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* **77**: 340-347

Sambrook J, Fritsh FE, Maniats 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, D'Ávila AC, Inoue-Nagata AK, Resende RO (2004) Espécies vegetais hospedeiras de begomovírus isolados de tomateiro em Goiás e no Distrito Federal. *Fitopatologia Brasileira* **29**: 450-455

Sanz AI, Fraile A, Garcia-Arenal F, Zhou XP, Robinson DJ, Khalid S, Butt T, Harrison BD (2000) Multiple infection, recombination and genome relationships among begomovirus isolates found in cotton and other plants in Pakistan. *Journal of General Virology* **81**: 1839-1849

Shannon EL. (2001) Curly Top Virus. New Mexico State University, Las Cruces, pp. 1-2.

Shimpale VB, Sutar SP, Yadav SR (2009) *Sidastrum* (Malvaceae): A New Genus Record for Asia. *Rheedea*: 50-52

Souza-Dias JAC, Sawazaki HE, Pernambuco-Fo PCA, Elias LM, Maluf H (2008) Tomato severe rugose virus: Another Begomovirus Causing Leaf Deformation and Mosaic Symptoms on Potato in Brazil. *Plant Disease* **92**: 487-487

Staden R (1996) The Staden Sequence Analyzes Package **5**: 233-241

Stanley J, Bisaro DM, Briddon RW, Brown JK, Fauquet CM, Harrison BD, Rybicki EP, Stenger DC (2005) Family Geminiviridae. In *Virus Taxonomy: VIIIth Report the*

Internacional Comitee on Taxonomy of Viruses, Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (eds), pp 301-326. London: Elsevier/Academic Press

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

Swanson MM, Harrison BD (1993) Serological relationships and epitope profiles of isolates of okra leaf curl geminivirus from Africa and the Middle East. *Biochimie* **75**: 707-711

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**: 2731-2739

Varsani A, Shepherd D, Dent K, Monjane A, Rybicki E, Martin D (2009) A highly divergent South African geminivirus species illuminates the ancient evolutionary history of this family. *Virology Journal* **6**: 36

Wright EA, Heckel T, Groenendijk J, Davies JW, Boulton MI (1997) Splicing features in maize streak virus virion- and complementary-sense gene expression. *Plant J* **12**: 1285-1297

Wyant P, Gotthardt D, Schäfer B, Krenz B, Jeske H (2011) The genomes of four novel begomoviruses and a new *Sida micrantha* mosaic virus strain from Bolivian weeds. *Archives of Virology* **156**: 347-352

Zhang W, Olson NH, Baker TS, Faulkner L, Agbandje-McKenna M, Boulton MI, Davies JW, McKenna R (2001) Structure of the Maize Streak Virus Geminiate Particle. *Virology* **279**: 471-477