



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

**CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO BEGOMOVÍRUS,  
EUPHORBIA YELLOW MOSAIC VIRUS, NO BRASIL**

**CRISTIANE LOPES DE OLIVEIRA**

**BRASÍLIA**

**2009**

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

**CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO BEGOMOVÍRUS,  
EUPHORBIA YELLOW MOSAIC VIRUS, NO BRASIL**

**Cristiane Lopes de Oliveira**

**Orientadora: Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata**

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

**BRASÍLIA**

**2009**

Dissertação de Mestrado realizada junto ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília sob orientação da professora e pesquisadora Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata. Apoio institucional da Embrapa Hortaliças e financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

**Banca examinadora:**

---

**Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata** (Orientadora)

Universidade de Brasília – UnB

Embrapa Hortaliças – CNPH

---

**Dr. Renato de Oliveira Resende**

Universidade de Brasília – UnB

---

**Dr. Paulo de Tarso de Oliveira Ferreira**

Universidade de Brasília - UnB

Aos meus pais, *Arismar e Francisca*, por todo o amor, incentivo e credibilidade dispensados sempre a mim, **dedico.**

## **Agradecimentos**

À Dra. Alice Nagata, por todos os ensinamentos, orientação, incentivo, amizade e por servir como exemplo profissional a todos que a conhecem.

Aos meus pais, Arismar Raimundo de Oliveira, por acreditar em mim e me incentivar a alcançar os meus objetivos e realizar meus sonhos, e Francisca Lopes Bezerra de Oliveira, por ser minha melhor amiga e por estar sempre ao meu lado. Agradeço por terem me dado ferramentas para ser quem sou. Amo vocês.

Ao meu namorado, Gildásio Pedrosa de Lima, por todo carinho e compreensão. Por me alegrar e confortar nos momentos difíceis, por me incentivar a ser uma pessoa melhor e por ter auxiliado o meu crescimento pessoal.

À minha amiga Paula Durante Tagliari, pelas conversas e conselhos, por permitir que eu faça parte da sua família, por ser a irmã que eu não tive.

Aos amigos Bruno Santos, Vivian Teodoro, Marcela Gomes, Leonardo Pedrosa, Sérgio Pinheiro e Camila Ximenes.

A todos os meus parentes, em especial Luiz, Alzira e Luiza, meus avós e exemplos de vida. À Michelle e Yasmin, por serem cada vez mais importantes na minha vida.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Fitopatologia, pelos ensinamentos, em especial aos professores Renato e Viviane. Aos funcionários e técnicos, especialmente Ribamar, Kamila e César.

Aos meus amigos de curso, Bruno Miranda, Leandro Nogueira, Rafael Brügger, Leonardo Lopes, Jaqueline Dutra, Paulo Góes, Magno Carvalho, Úellen Dutra, John Alexander, Patrícia Pereira, Maria do Desterro, Fabiane Castro, Roberta Pereira e Niday Nunes. Em especial à Ana Paula Castro, Keize Junqueira e Silvia Aranha. Obrigado por tornarem tudo mais prazeroso.

Aos meus amigos de laboratório de Virologia e Biologia Molecular, Anelise Orílio, Juliano Lopes, Ana Paula, Fabrício Magalhães, Sílvia Aranha, Thaís Lemos, Mariana Martins, Mariana Hallwass, Edmércia Chaves, Sarah Barreto, Pedro Lemos, Érico Dianese, Carolina Franco e Paulo de Tarso.

Ao meu amigo Leonardo Albuquerque, pela amizade e fundamental colaboração e ensinamentos transmitidos a mim durante todo o tempo de trabalho.

Aos meus amigos, técnicos de laboratório, Oneilson Medeiros e Hamilton. Em especial ao amigo Lúcio Flávio, por todos os momentos de descontração e conversas, por tornar o ambiente de trabalho mais agradável. Obrigada por tornar-se meu amigo.

Aos membros da banca examinadora, pela atenção dispensada.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro concedido.

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

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, minha sincera gratidão.

E acima de tudo, agradeço a Deus pelo dom da vida e oportunidade de crescimento.

## Índice

RESUMO.....	01
ABSTRACT.....	02
1. INTRODUÇÃO e OBJETIVOS.....	03
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
2.1 Amendoim-bravo .....	04
2.2 Vírus relatados em amendoim-bravo .....	07
2.3 Família <i>Geminiviridae</i> .....	08
2.3.1 Aspectos taxonômicos .....	07
2.3.2 Organização genômica dos geminivírus .....	10
2.3.3 Origem e diversidade dos geminivírus .....	13
2.3.4 Aspectos econômicos .....	15
2.3.5 Métodos de detecção de geminivírus .....	16
2.4 Gênero <i>Begomovirus</i> no Brasil .....	17
2.4.1 Importância econômica .....	17
3. OBJETIVOS .....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 Fonte do vírus e extração de DNA .....	21
4.2 Amplificação do DNA via RCA e digestão com enzimas de restrição .....	21
4.3 Clonagem e transformação .....	22
4.4 Sequenciamento e análise de sequências .....	23
4.5 Círculo de hospedeiras .....	24
5. RESULTADOS .....	25
5.1 Clonagem do genoma de begomovírus de amendoim-bravo .....	25
5.2 Análise da sequência genômica .....	27
5.3 Análise filogenética .....	33
5.4 Círculo de hospedeiras .....	33
5.5 Análise taxonômica .....	38
6. DISCUSSÃO.....	39
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44
ANEXOS.....	63

**Índice**  
**Figuras**

Figura 1 .....	11
Figura 2 .....	26
Figura 3 .....	27
Figura 4 .....	29
Figura 5 .....	31
Figura 6 .....	35
Figura 7 .....	36
Figura 8 .....	37

**Tabelas**

Tabela 1 .....	19
Tabela 2.....	21
Tabela 3.....	23
Tabela 4.....	27
Tabela 5.....	29
Tabela 6.....	34

## CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO BEGOMOVÍRUS, EUPHORBIA YELLOW MOSAIC VIRUS, NO BRASIL

**Resumo** – O amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*) é uma importante planta daninha em diversos países por interferir na produção de plantas cultiváveis e por servir como reservatório de vírus de plantas. O objetivo desse trabalho foi estudar a diversidade dos begomovírus coletados em amendoim-bravo e caracterizar molecular e biologicamente um isolado permitindo a sua completa identificação. Sete amostras de amendoim-bravo foram coletadas apresentando sintomas de mosaico amarelo em diferentes cidades do estado de Goiás e Distrito Federal. Elas foram avaliadas por PCR usando primers universais para begomovírus, que confirmou que todas as sete amostras estavam infectadas. As amostras de DNA foram utilizadas para a realização da amplificação via círculo rolante (RCA) utilizando a enzima *phi*-29 DNA polimerase. Cada produto amplificado foi digerido com uma enzima de restrição que cortou o DNA em apenas um único ponto e foi clonado no vetor pBluescript (Stratagene). As sequências completas de ambos os componentes (oito clones de DNA-A e três clones de DNA-B) foram obtidas usando primers para o vetor e primers internos em sequenciador automático. Para a caracterização biológica, clones infecciosos foram preparados e inoculados através de bombardeamento de partículas em plantas cultivadas e daninhas. A infecção foi confirmada por PCR em plantas de *Capsicum annuum*, *Datura stramonium*, *Nicotiana benthamiana* e *Euphorbia heterophylla*. Todas as oito sequências do DNA-A compartilham uma identidade 86,9% com o Euphorbia mosaic virus Peru (acesso AM886131; sequência de begomovírus mais próxima ao vírus), enquanto que o DNA-B compartilha uma identidade nucleotídica 61,6% com o *Tomato commom mosaic virus* (acesso NC\_010836). De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), um vírus é considerado como uma nova espécie quando a identidade de sequência do DNA-A com outro vírus é menor que 89%, sugerindo que esse vírus é distinto do Euphorbia mosaic virus Peru. Portanto, de acordo com os critérios estabelecidos pelo ICTV, o vírus caracterizado nesse trabalho pode ser considerado uma nova espécie do gênero *Begomovirus*, sendo o nome Euphorbia yellow mosaic virus proposto.

## CHARACTERIZATION OF BRAZILIAN BEGOMOVIRUS EUPHORBIA YELLOW MOSAIC VIRUS

**Abstract** – The “amendoim-bravo” (*Euphorbia heterophylla*; also known as painted euphorbia) is an important weed in several countries, interferes in the production of cultivated plants, and has a great potential as a reservoir of plant viruses. The objective of this study was to study the diversity of begomoviruses that infect “amendoim-bravo” plants, and characterize molecular and biologically one isolate enabling its complete identification. Seven samples were collected of “amendoim-bravo” showing yellow mosaic at distinct localities in Goiás State and Federal District/Brazil. They were tested by PCR using universal begomovirus primers and it was confirmed that all seven samples were positively infected. These DNA samples were used as template for rolling circle amplification (RCA) using the enzyme *phi-29* DNA polymerase. Each amplified product was digested with a single-cutting restriction enzyme and cloned into pBluescript vector (Statagene). The complete sequence of both components (eight DNA-A clones and three DNA-B clones) were obtained using internal and vector primers. For the biological characterization, infectious clones were prepared and inoculated by particle bombardment to cultivated plants and weeds. The infection was confirmed by PCR in plants of *Capsicum annuum*, *Datura stramonium*, *Nicotiana benthamiana* and *Euphorbia heterophylla*. All eight DNA-A sequences shared 86,9% nucleotide identity with Euphorbia mosaic virus Peru (accession AM886131, the most closely related begomovirus sequence), while DNA-B shared 61,6% nucleotide identity with *Tomato commom mosaic virus* (accession NC\_010836). According to the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) a virus is considered as a new species when the sequence identity with another virus is less than 89%, suggesting that it is distinct from Euphorbia mosaic virus Peru. Therefore, according to the criteria established by the ICTV, the viruses characterized in this work can be considered as a new species within the genus *Begomovirus*, and the name Euphorbia yellow mosaic virus is proposed.

## 1. Introdução e Objetivo

A espécie botânica *Euphorbia heterophylla*, comumente conhecida como amendoim-bravo ou leiteira, é originária das regiões tropicais e subtropicais das Américas (Cronquist, 1981). Importante membro da família Euphorbiaceae, possui grande variabilidade dentro da espécie. O amendoim-bravo, juntamente com outras plantas daninhas, apresenta grande importância como praga por interferir na produção de diversas culturas e também por poder servir como hospedeiro intermediário de patógenos de culturas importantes.

Infecções severas causadas por begomovírus em várias culturas importantes como tomate, feijão, pimentão, entre outros, têm sido descritas (Faria *et al.*, 2000). Assim como as plantas cultivadas, várias espécies de plantas daninhas vêm sendo relatadas como hospedeiras de begomovírus em diversos países, inclusive no Brasil. Alguns estudos demonstraram casos em que isolados de begomovírus provenientes de plantas invasoras podem ser transmitidos para espécies cultivadas (Frischmuth *et al.*, 1997; Faria *et al.*, 2000; Morales & Anderson, 2001).

Pouco se sabe sobre vírus que infectam amendoim-bravo, e que podem ser potenciais patógenos para importantes culturas no Brasil e no mundo. Devido à ampla distribuição geográfica desta planta em todo o Brasil e da sua constante associação com culturas de grande interesse agrícola como o tomateiro, plantas de soja e feijão, o presente trabalho teve como objetivo a realização de um estudo da diversidade de begomovírus que infectam naturalmente o amendoim-bravo e a caracterização biológica e molecular dos vírus.

A dissertação foi dividida em introdução, revisão bibliográfica, material e métodos, resultados, discussão e considerações finais.

## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1 Amendoim-bravo

O amendoim-bravo ou leiteira, como é popularmente conhecido a espécie *Euphorbia heterophylla*, tem origem na região tropical e subtropical das Américas (Cronquist, 1981). Importante membro da família Euphorbiaceae, possui grande variabilidade dentro da espécie. As diferentes formas da folha são facilmente notáveis tanto dentro de uma única população como entre diferentes populações, fazendo com que diferentes autoridades reconhecessem vários graus de variabilidade. Por esse motivo, vários são os sinônimos utilizados para se referir a *E. heterophylla*, como por exemplo *E. geniculata*, *E. prunifolia*, *Poinsettia heterophylla*, *P. geniculata*. É registrada como uma importante planta daninha em 22 países tropicais, incluindo o Brasil, e está presente em mais de 37 outros países (Wilson, 1981; Oliveira *et al.*, 2002).

Hutchinson & Dalziel (1958) descreveram *E. heterophylla* como sendo uma planta ereta, geralmente não ramificada, possuindo ciclo anual curto, com duas a três gerações em apenas um ano, com tamanho de 30 a 80 cm e produzindo um látex branco. As folhas são simples ou lobadas aglomeradas na parte superior do ramo, são alternadas e possuem grande variação no formato e no tamanho, causando grande confusão taxonômica (Wilson, 1981). Sua capacidade de multiplicação é consideravelmente grande e a planta cresce com muita rapidez, característica essa que permite a competição por radiação solar e nutrientes com plantas cultivadas. Cresce em quase todos os tipos de solo, porém, prefere os solos férteis e drenados (Kissmann & Groth, 1992). O fruto, à medida que amadurece, modifica sua coloração, e ao atingir a plena maturação, realiza deiscência explosiva lançando as sementes a uma distância relativamente grande da planta-mãe (Barroso, 1984).

As plantas daninhas possuem grande importância como agentes bióticos em sistemas agrícolas, condicionando uma série de fatores nesses sistemas, como a interferência no crescimento e produtividade, além de afetar no processo de produção no campo de algumas culturas (Amaral, 2006). Em 1948, *E. heterophylla* foi registrada em Poona, Índia, sendo suscetível ao herbicida 2,4-D. Depois desse período, foi registrada em diferentes partes do mundo, incluindo as Ilhas Maurício; Cuba, atuando como planta daninha de cana-de-açúcar; no Brasil, como planta daninha em café; em

Papua Nova Guiné como planta daninha de grande importância econômica na produção de amendoim; e na Tailândia em milho, sorgo e em algodão (Solomon & Rao, 1948; Rochecouste, 1958; Casamayor, 1967; Medcalf & deVita, 1960; Petty, 1969; Parker, 1969; Yongboonkird, 1971). O amendoim-bravo, juntamente com outras plantas daninhas, apresenta grande importância por interferir na produção de soja no Brasil, sendo considerada uma das espécies com maior capacidade de competição com essa cultura (Voll *et al.*, 2002). Essa importância teve um crescimento a partir da década de 70, devido a um aumento do uso contínuo dos herbicidas Metribuzin e Trifluralin na cultura de soja, sendo utilizados de forma combinada nas regiões do Paraná e Rio Grande do Sul, fazendo com que a planta daninha adquirisse resistência aos herbicidas (Pitelli, 1997). Ao contrário dos ataques de pragas e doenças, ocasionados normalmente por uma ou poucas espécies, a infestação de plantas daninhas é representada por muitas espécies, emergindo em épocas diferentes, dificultando o seu controle. A cultura do sorgo possui como um dos principais problemas o controle das plantas daninhas. Estudos mostraram que não havendo o controle das plantas daninhas nas quatro primeiras semanas após a emergência do sorgo, pode ocorrer uma redução de até 35% na produção de grãos, e não se realizando um manejo adequado, essa redução pode chegar a 71% (Silva *et al.*, 1986). Estudos realizados pelo *International Institute of Tropical Agriculture* na Nigéria (IITA, 1977) mostraram que a densidade de 10 plantas/m<sup>2</sup> de *E. heterophylla* reduziram o rendimento de feijão caupi em 25-53%, enquanto que 80 plantas/m<sup>2</sup> reduziram o rendimento em 68-75%. Vários estudos mostram a importância de controlar esta planta daninha nos estádios iniciais de desenvolvimento, antes que a planta daninha venha a ser realmente estabelecida (Wilson, 1981).

No cultivo do tomateiro é necessário manter as áreas livres da interferência de plantas daninhas, pelo menos durante o período crítico, ou seja, até que a cultura se desenvolva, cubra suficientemente a superfície do solo e não sofra mais a interferência negativa destas (Silva *et al.*, 2003). A rotação racional de cultivos é vantajosa para o manejo de plantas daninhas. Entretanto, os produtores não realizam adequadamente esse manejo, tornando o controle progressivamente problemático. Plantas agressivas proliferam, exercendo alta pressão de competição com a cultura. Numa comunidade mista de plantas existe sempre um balanço competitivo entre as espécies, predominando as mais agressivas e adaptadas ao ecossistema agrícola. A

população de plantas daninhas é dinâmica, ocorrendo mudanças de acordo com as práticas agrícolas utilizadas, havendo a cada ano uma nova relação de interferência entre as diferentes espécies (Pereira, 2000).

Geralmente, as plantas daninhas adaptam-se melhor ao meio ambiente que o tomateiro, crescendo, mais vigorosamente, principalmente nos primeiros estádios de crescimento. Observações sobre o Período Crítico de Interferência (PCI) das plantas daninhas na cultura do tomate para processamento no Brasil indicam que elas podem causar reduções de até 99% na produção das lavouras implantadas a partir de semeadura direta. O PCI, nesse caso, ocorre do 21º ao 97º dias após a emergência para lavouras implantadas com mudas a redução é cerca de 75%, situando-se o PCI do 17º ao 78º dias após o transplante (Pereira, 2000; Nascente, 2004). Em outros países, vários trabalhos indicam que o PCI para esta cultura situa-se entre o 20º e o 63º dias após a emergência e entre o 25º e o 43º dias para lavouras com mudas transplantadas (Qasem, 1992; Campeglia, 1991; Weaver & Tan, 1987; Weaver, 1984; Weaver & Tan, 1983; Friesen, 1979; Sajjapongse *et al.*, 1983).

Assim como as plantas cultivadas, várias espécies de plantas daninhas vêm sendo relatadas como hospedeiras de begomovirus em diversos países, inclusive no Brasil. Segundo Morales & Anderson (2001), as espécies relatadas geralmente pertencem a Malvaceae, Euphorbiaceae e Fabaceae. Alguns estudos demonstraram casos em que isolados de begomovirus provenientes de plantas invasoras podem ser transmitidos para espécies cultivadas através do inseto vetor ou mediante inoculação via extrato vegetal tamponado (Frischmuth *et al.*, 1997; Faria *et al.*, 2000; Morales & Anderson, 2001). Outros indicam que plantas invasoras podem funcionar como fontes de inóculo de begomovirus para plantas cultivadas, como os relatados por Costa & Carvalho (1960), onde *Abutilon mosaic virus* (AMV), que ocorria em malváceas, e o *Euphorbia mosaic virus* (EuMV), obtido de *Euphorbia prunifolia* podiam ser transmitidos para o tomateiro, através da mosca-branca. Assunção *et al.* (2006) constataram que pelo menos 10 espécies de plantas invasoras funcionam como hospedeiras de begomovirus no Brasil, e estão distribuídas em cinco famílias botânicas: Malvaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Capparaceae e Sterculiaceae. Cinco espécies ainda não haviam sido relatadas como hospedeiras desses vírus no Brasil e no mundo. Esse resultado amplia ainda mais a quantidade de plantas hospedeiras conhecidas para

os begomovírus, considerada atualmente como uma das maiores entre os vírus de plantas e que incluem mais de 120 espécies de plantas de diferentes famílias botânicas (van Regenmortel *et al.*, 2000).

## 2.2 Vírus relatados em amendoim-bravo

Em espécies pertencentes à família Euphorbiaceae, pelo menos quatro vírus já foram relatados: *Euphorbia mosaic virus* (descrita como EMV, mas considerada hoje com o acrônimo EuMV), descrita em 1950 infectando *Euphorbia prunifolia* no Brasil (Costa & Bennett, 1950); *Euphorbia ring spot virus* (EuRSV), descrito em 1976 na Alemanha infectando *Euphorbia milii* (Bode, 1976; Guaragna *et al.*, 2004); *Euphorbia leaf curl virus* (EuLCV), na China (Ma *et al.*, 2004) e o *Euphorbia crinkle mosaic virus* (EuCMV), descrito em 1988 por Nath & Mandahar na Índia, mas muito pouco se sabe sobre esse vírus. Os vírus EuLCV e EuCMV foram relatados infectando *Euphorbia pulcherrima*. EuMV e EuLCV são vírus pertencentes ao gênero *Begomovirus*, o EuRSV pertence ao gênero *Potyvirus*.

Plantas de *E. heterophylla* infectadas com EuMV apresentam mosaico dourado e ocasionalmente distorção foliar. Costa (1965) relatou que esse vírus foi responsável pela doença do enrugamento em *Phaseolus vulgaris* inoculadas artificialmente. Sintomas similares foram vistos em campo eventualmente, porém, não houve comprovação de que EuMV era o patógeno causal. Costa descreveu o EuMV apenas com informações visuais dos sintomas. EuLCV infecta naturalmente plantas de *E. pulcherrima*, que desenvolvem um encrespamento foliar acompanhado de espessamento e muitas vezes um aumento no tom esverdeado das nervuras. As plantas mais gravemente afetadas possuem o pecíolo encrespado e ficam atrofiadas (Ma *et al.*, 2004). EuCMV induz infecção sistêmica (Nath & Mandahar, 1988). EuRSV produz manchas em forma de anéis cloróticos, além da deformação em folhas e flores (Bode, 1976).

## 2.3 Família *Geminiviridae*

### 2.3.1 Aspectos taxonômicos

Os geminivírus são caracterizados por possuírem partículas geminadas e por terem o genoma circular mono ou bipartido de fita simples (ssDNA). Realizam sua replicação inteiramente no interior do núcleo da célula hospedeira e o tamanho do genoma varia de 2500 a 3000 nucleotídeos (Harrison, 1985). São divididos de acordo com sua organização genômica, inseto vetor (mosca-branca, cigarrinha ou membracídeo) e círculo de hospedeiros (mono ou dicotiledôneas) em quatro gêneros *Curtovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus* (Fauquet & Stanley, 2005).

Aqueles que possuem genoma monopartido, infectam monocotiledôneas e são transmitidos por cigarrinhas (Homoptera: Cicadellidae) estão inseridos no gênero *Mastrevirus*. Pelo menos dois vírus pertencentes a esse gênero infectam dicotiledôneas: *Tobacco yellow dwarf virus* (TobYDV) e o *Bean yellow dwarf virus* (BeYDV), que mesmo infectando dicotiledôneas foi inserido no gênero *Mastrevirus* devido à sua organização genômica. A espécie-tipo do gênero é o *Maize streak virus* (MSV).

O gênero *Curtovirus* é constituído por vírus que possuem apenas um componente genômico, infectam dicotiledôneas e são transmitidos por cigarrinhas (Homoptera: Cicadellidae). A espécie-tipo é o *Beet curly top virus* (BCTV). Acredita-se que esse gênero ocupe uma posição intermediária na escala filogenética, entre os *Begomovirus* e *Mastrevirus*, possuindo características semelhantes e sendo considerado um gênero recombinante entre os vírus pertencentes aos dois gêneros (Padidam *et al.*, 1995).

O gênero *Topocuvirus* possui apenas uma única espécie, *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV), que foi reconhecido pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Virus (ICTV) há quase dez anos (Pringle, 1999). Possui genoma monopartido, infecta dicotiledôneas e é transmitido por membracídeos (Homoptera: Auchenorrhyncha).

Mais de 80% dos geminivírus conhecidos pertencem ao gênero *Begomovirus*, que é constituído por vírus que possuem um ou dois componentes genômicos, DNA-A e DNA-B. Infectam dicotiledôneas e são transmitidos por mosca-

branca (*Bemisia tabaci*) (Hemiptera: Aleyrodidae). A espécie-tipo do gênero é o *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) (Rybicki *et al.*, 2000). Nos vírus que são bipartidos, os componentes genômicos são encapsidados separadamente, sendo necessárias as duas moléculas de DNA para que a infecção aconteça para a maioria dos vírus (Faria *et al.*, 2000).

A taxonomia da família *Geminiviridae* tem sofrido poucas modificações ao longo dos anos, com exceção da adição do gênero *Topocuvirus*. Esse gênero foi aceito por possuir vetor diferente e pelo fato de ser o único representante envolvido em recombinação inter-específica entre vírus desconhecidos de gêneros diferentes (Bridson *et al.*, 1996). Essa constante na classificação taxonômica é uma característica geral no grupo dos vírus, mostrando que os gêneros são baseados principalmente na organização genômica, que corresponde a um critério muito estável. Dentro de cada gênero, vários critérios podem ser utilizados para separação das espécies (Mayo & Pringle, 1998; Faria *et al.*, 2000).

Comparações nas sequências nucleotídicas desempenham um papel fundamental como ferramenta na determinação taxonômica das espécies. Como o DNA-B pode ser trocado entre algumas espécies de begomovírus, apenas o DNA-A é considerado, inicialmente, para uma análise taxonômica, já que alguns vírus possuem apenas esse componente genômico. O alto índice de recombinação entre espécies de begomovírus invalida a utilização de pequenos fragmentos de DNA para comparação, sendo utilizado o genoma completo (DNA-A) (Fauquet *et al.*, 2008). Várias análises indicaram que uma identidade genômica de 89% é suficiente para distinguir espécies de estirpes (Fauquet *et al.*, 2008). Acima de 89% de identidade, os isolados virais podem ser considerados da mesma espécie. Esse critério também é utilizado para as espécies pertencentes aos gêneros *Curtovirus* e *Topocuvirus*. Os *Mastrevirus* apresentam diferenças na organização do seu genoma e também nas características das suas hospedeiras, e por esses motivos foi estabelecida uma demarcação de identidade de 75% para esse grupo (Fauquet, 2003).

### 2.3.2 Organização genômica dos geminivírus

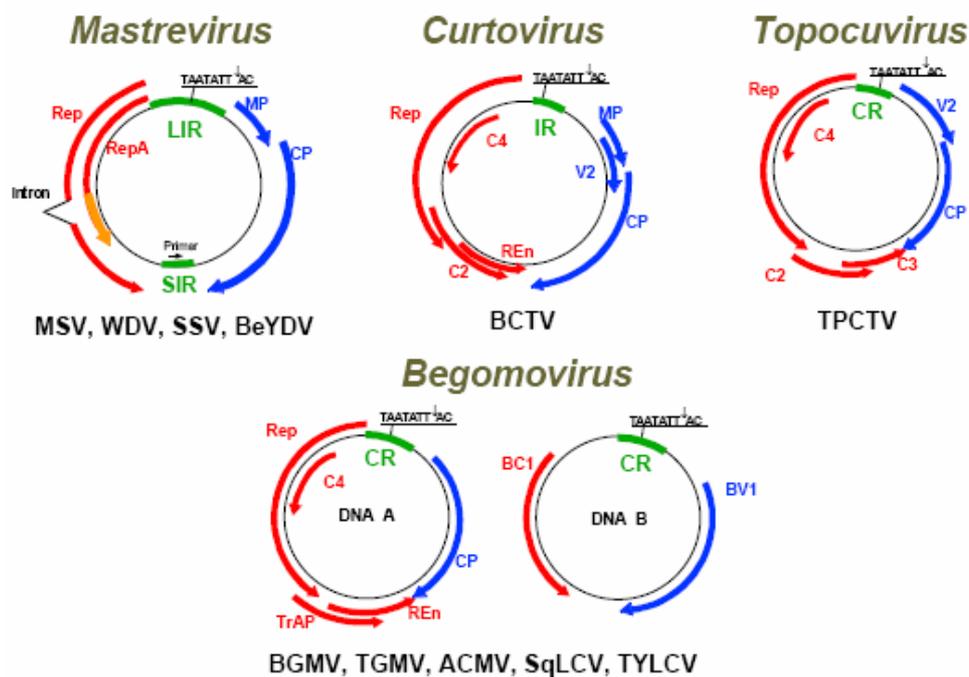
Diferenças na organização genética do genoma (mono ou bipartido) (Figura 1), assim como gama de hospedeiros (monocotiledôneas ou dicotiledôneas) e inseto vetor (cigarrinha, mosca-branca ou membracídeos) servem como critérios para reconhecimento dos quatro gêneros da família *Geminiviridae*. Eles são caracterizados estruturalmente por possuírem as partículas virais morfologicamente geminadas, e geneticamente por possuírem uma ou duas fitas simples de DNA (ssDNA) (Gutierrez, 2000).

Os *Mastrevirus* são compostos de genoma monopartido e possuem na sua organização genômica duas regiões intergênicas: a grande (large intergenic region – LIR) e a pequena (small intergenic region – SIR), localizadas em lados opostos no genoma viral. Quatro proteínas são codificadas pelos mastrevírus. No sentido complementar estão as proteínas Rep e RepA, esta última exclusiva neste gênero. No sentido viral estão as proteínas de movimento (MP) e a da capa protéica (CP) (Gutierrez *et al.*, 2004).

Os *Curtovirus* possuem genoma monopartido assim como os *Mastrevirus*, embora sua organização genômica possua algumas diferenças em relação a este último gênero. Além das proteínas CP e MP que estão no sentido viral, outra proteína codificada é a V2. No sentido complementar, quatro fases (ou grade) abertas de leitura (“open reading frames” - ORFs) existem: Rep, C2, REn (replication enhancer) e C4. O genoma da única espécie pertencente ao gênero *Topocuvirus*, (*Tomato pseudo-curly top virus*, TPCTV) é o menos caracterizado até o momento em relação aos membros pertencentes à família *Geminiviridae*. Eles possuem genoma monopartido e sua organização genômica é semelhante aos curtovírus (Gutierrez *et al.*, 2004).

Os *Begomovirus* possuem tanto genoma monopartido (apenas com o componente A) quanto genoma bipartido (com componente A e B), que não possuem similaridade na seqüência nucleotídica, com exceção da região comum (RC), presente na região intergênica (RI) existente em ambos os componentes, com aproximadamente 200 nucleotídeos acima de 90% de identidade entre eles (Harrison, 1985), porém, muito distinto entre diferentes begomovírus (Sunter & Bisaro, 1991). A origem de replicação dos geminivírus que está presente na RC, que inclui elementos de seqüência altamente

conservados entre as diferentes espécies do gênero, como o sítio de clivagem da proteína Rep, que está relacionado com a replicação viral (nonanucleotídeo TAATATT↓AC), o TATA “box”, envolvido na iniciação da transcrição dos genes da capa protéica – CP – e da Rep, e íterons que apesar das seqüências apresentarem certa especificidade para cada vírus, estão organizadas de forma a demonstrar alguma conservação entre grupos distintos de begomovírus (Argüello-Astorga *et al.*, 1994).



**Figura 1.** Organização genômica dos quatro gêneros pertencentes à família *Geminiviridae*. Alguns dos membros mais estudados de cada gênero são dados como exemplo. *Mastrevirus*: *Maize streak vírus* (MSV), *Wheat dwarf virus* (WDV), *Sugarcane streak virus* (SSV), *Bean yellow dwarf virus* (BeYDV). *Curtovirus*: *Beet curly top virus* (BCTV). *Topocuvirus*: *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV). *Begomovirus*: *Bean golden mosaic virus* (BGMV), *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), *African cassava mosaic virus* (ACMV), *Squash leaf curl virus* (SqLCV) e *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Fonte: Gutierrez *et al.*, 2004).

A transcrição do genoma viral nos begomovírus é bidirecional (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999; Lazarowitz & Beachy, 1999). No sentido viral, o DNA-A codifica a proteína CP (AV1), e outras quatro proteínas são codificadas no sentido complementar desse componente genômico: Rep (AC1), TrAP (transcriptional activator

– AC2), REn (AC3) e C4. O componente B codifica proteínas diretamente envolvidas no movimento do vírus e desenvolvimento de sintomas na planta: MP (BC1) e NSP (BV1), no sentido complementar e viral, respectivamente (Gutierrez *et al.*, 2004).

A codificação da proteína capsidial é realizada pelo gene CP. Essa proteína é responsável pela estruturação das partículas virais, além de ser essencial para a transmissão do vírus e pela especificidade do inseto vetor (Mullineaux *et al.*, 1984). Briddon *et al.* (1990) demonstraram que a troca do gene da CP altera sua especificidade em relação ao vetor. Essa demonstração foi realizada trocando o gene CP do *African cassava mosaic virus* (ACMV), um begomovírus transmitido por mosca branca, pelo gene CP do *Beet curly top virus* (BCTV), begomovírus transmitido por cigarrinha. Essa troca resultou na alteração da especificidade do inseto vetor, sendo assim, o ACMV (mutante) passou a ser transmitido por cigarrinha.

A proteína Rep é a única proteína viral essencial para a replicação (Hayes & Buck, 1989; Hanley-Bowdoin *et al.*, 1990), e é conservada em sequência, posição e função (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999; Faria & Zerbini, 2000; Fauquet *et al.*, 2008). A ligação da Rep a iterons (duas sequências idênticas repetidas) é considerada essencial para o início da replicação. Além da sua principal atividade na replicação, está envolvida na sua autoregulação (repressão de sua própria síntese em nível de transcrição) (Sunter *et al.*, 1993). O fato de muitas espécies de *Begomovirus* possuírem a capacidade de infectar células já totalmente diferenciadas é devido à proteína Rep atuar de maneira a induzir indiretamente a expressão de proteínas responsáveis pela síntese de DNA do hospedeiro nestas células, promovendo um ambiente celular favorável a síntese de DNA viral (Nagar *et al.*, 2002).

A proteína TrAP é responsável pela ativação da transcrição que atua “*in trans*” nos promotores dos genes CP e NS (Sunter & Bisaro, 1991; Gröning *et al.*, 1994). Também está envolvida na supressão de um mecanismo de silenciamento gênico do hospedeiro (Dong *et al.*, 2003).

A proteína REn tem a função de aumentar a eficiência da replicação de maneira inespecífica (Morris *et al.*, 1991). Mesmo não sendo essencial para que a replicação ocorra, há um maior acúmulo de DNA viral quando essa proteína está presente.

A proteína produzida pela ORF AC4 encontra-se inserida completamente dentro do gene Rep, mas é codificada em uma fase de leitura distinta. Esta proteína está envolvida na determinação da gama de hospedeiros, na severidade de sintomas e no movimento viral (Jupin *et al.*, 1994). A ORF AC4 nos begomovírus bipartidos é homóloga a ORF C4 nos begomovírus monopartidos.

No DNA-B são codificadas duas proteínas virais. O gene NSP produz uma proteína necessária para o movimento intracelular do DNA viral do núcleo para o citoplasma e o gene MP codifica uma proteína responsável pelo movimento célula-a-célula, via plasmodesmas (Noueiry *et al.*, 1994). O movimento célula-a-célula depende da interação dessas proteínas.

### **2.3.3 Origem e diversidade dos geminivírus**

A hipótese mais aceita para a origem dos geminivírus é a que propõe seu surgimento a partir de bacteriófagos, como o  $\Phi$ X174, e de plasmídeos compostos de DNA de fita simples (ssDNA). Essas hipóteses são baseadas no fato das sequências entre esses organismos possuírem grande similaridade, além de alguns processos, como o mecanismo de círculo rolante utilizado na replicação do genoma ser muito parecido (Koonin & Ilyina, 1992). Petty *et al.* (1986) demonstraram que o promotor da proteína capsidial dos geminivírus é funcional em *Escherichia coli* e Rigden *et al.* (1996) comprovaram que o *Tomato leaf curl virus* replica de forma eficiente em *Agrobacterium tumefaciens*.

Os geminivírus possuem três mecanismos de ação que proporcionam o surgimento de novas estirpes e até mesmo novas espécies: mutação, recombinação ou pseudo-recombinação (Padidam *et al.*, 1999). Esses processos proporcionam mudanças, permitindo a adaptação a novas hospedeiras e a possíveis mudanças nas condições ambientais (Monci *et al.*, 2002).

Mutações são modificações que ocorrem nos genes ou cromossomos acarretando modificações hereditárias. Esse mecanismo ocorre mais frequentemente durante a replicação dos vírus de RNA devido às altas taxas de erro ao longo do processo da síntese do RNA. Isso ocorre porque esses vírus não possuem a capacidade

de corrigir erros de leitura durante a replicação, conhecida como “proof-reading”, realizado pela DNA polimerase nos vírus de DNA (Rossinck, 1997).

Evidências de que a recombinação está envolvida na evolução do genoma dos begomovírus vem da identificação de sequências quiméricas, que são regiões contíguas da seqüência nucleotídica e, aparentemente, possuem origens distintas (Harrison & Robinson, 1999). Hou & Gilbertson (1996) demonstraram eventos de recombinação *in vivo*, sugerindo um mecanismo adicional para a evolução dos geminivírus. O relacionamento observado entre alguns vírus pertencentes a gêneros distintos dentro da família *Geminiviridae* indica que a evolução desses organismos pode ocorrer via recombinação entre vírus distintos. É o caso da espécie *Beet curl top virus* (BCTV), pertencente ao gênero *Curtovirus*. Aparentemente, esse vírus combina propriedades de espécies dos gêneros *Begomovirus* e *Mastrevirus*. A organização genômica do BCTV assemelha-se ao encontrado no DNA-A dos begomovírus e, em árvores filogenéticas a Rep do BCTV fica no grupo dos begomovírus, enquanto a CP fica no grupo dos mastrevírus (Rybicki, 1994). Essa comparação levanta a possibilidade de que o ancestral do BCTV e outros curtovírus estejam envolvidos em uma recombinação antiga que introduziu os genes da CP dos mastrevírus dentro do DNA-A dos begomovírus (Stanley, 1986; Rybicki, 1994). A primeira evidência convincente de recombinação natural é provavelmente a encontrada comparando-se sequências nucleotídicas (Antignus & Cohen, 1994) do DNA-A das estirpes leve e severa do *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) de Israel. A Rep e a região intergênica (RI) dessas sequências possuem apenas 87% e 78% de identidade, respectivamente, enquanto o restante das moléculas são 98% idênticas. Essa informação sugere que a Rep e RI dos dois genomas foram adquiridos de espécies diferentes, e o restante do genoma adquirido do mesmo indivíduo (Harrison & Robinson, 1999). Além de recombinação entre espécies distintas, há também entre estirpes de um mesmo vírus. Um exemplo de recombinação entre estirpes de um mesmo vírus foi demonstrado por Zhou *et al.* (1998), que realizaram comparações entre os isolados de begomovírus de algodão no Paquistão. Quatro tipos de DNA-A foram encontrados entre os isolados de *Cotton leaf curl virus* – Paquistão (CLCuV-PK). Nesses quatro isolados, foram encontrados em diferentes partes do genoma das estirpes de CLCuV-PK sequências do genoma de *Okra yellow vein mosaic virus* (OYVMV) (Harrison & Robinson, 1999).

A pseudo-recombinação, em geral, ocorre com a combinação dos componentes genômicos do DNA-A e DNA-B de isolados de um mesmo vírus (Stanley *et al.*, 1985), mas não entre diferentes espécies de begomovírus (Frischmuth *et al.*, 1993; Lazarowitz, 1992). A pseudo-recombinação claramente fornece uma maneira de recombinação de genes equivalentes de diferentes estirpes de begomovírus, embora essa frequência não seja conhecida em condições de campo (Harrison, 1999). Um exemplo envolvendo os pseudo-recombinantes *Tomato mottle virus* (ToMoV) e *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV) foi relatado por Gilbertson *et al.* (1993): ambos viáveis, porém induzindo sintomas mais brandos e produzindo uma quantidade consideravelmente pequena de DNA-B. No entanto, depois de diversas passagens com outros pseudo-recombinantes, de repente eles tornaram-se patogênicos e replicaram-se normalmente como resultado de uma segunda modificação genética (Hou & Gilbertson, 1996).

#### 2.3.4 Aspectos econômicos

Os geminivírus possuem considerável importância como patógenos de plantas, pois causam perdas econômicas em praticamente todo o mundo. Flores & Siberschmidt (1962) foram os primeiros a relatar uma doença causada por esse grupo de fitovírus em cultura de tomate no Brasil. Cerca de 30 a 40% da produção foi afetada naquele período com a doença que eles designaram inicialmente como “clorose infecciosa”. O vírus causador da “clorose infecciosa” foi identificado como *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) (Matys *et al.*, 1975). Pouco tempo depois do relato do TGMV, o *Tomato yellow mosaic virus* (TYMV) foi relatado na Venezuela, sendo visto como um fator limitante na produção de tomate em alguns estados desse país (Debrot & Dao, 1963). Costa (1976) verificou a transmissão de seis vírus por *B. tabaci*. Infecção por geminivírus em tomateiro chegaram a causar perdas estimadas em até 100% em algumas áreas no Submédio do Vale do São Francisco (Lima & Haji, 1998).

As doenças causadas pelos geminivírus são facilmente reconhecidas por causa dos seus sintomas distintos. Os sintomas variam de acordo com o vírus e a estirpe considerada, cultivar, idade da planta no momento da infecção e condições ambientais. De uma forma geral, os sintomas causados pelos geminivírus incluem as alterações morfológicas, sendo as mais comuns a paralisação do crescimento da planta, folíolos

pequenos, encarquilhados, coriáceos, com bordos voltados para cima e com mosaico (Lima & Haji, 1998). Os mastrevírus induzem o aparecimento de estrias amareladas nas hospedeiras monocotiledôneas, e geralmente amarelecimento e nanismo em dicotiledôneas. Os curtovírus causam o enrolamento das folhas superiores da planta. Vários sintomas são desenvolvidos em plantas infectadas por begomovírus, que são basicamente três tipos: amarelecimento das nervuras, mosaico amarelo e enrolamento foliar. Tem havido um considerável aumento no número de begomovírus que vem sendo relatados nos últimos anos. Por volta dos anos 60, apenas 27 vírus eram conhecidos (Varma, 1963), atualmente mais de 100 têm sido caracterizados (Fauquet, 2003).

### **2.3.5 Métodos de detecção de geminivírus**

Os procedimentos de identificação e caracterização de geminivírus não podem ser baseados apenas na sintomatologia, já que os sintomas podem sofrer modificações por serem influenciados pela idade da planta hospedeira, condições ambientais e ocorrência de infecções virais mistas (Paplomatas *et al.*, 1994) além de serem confundidos com aqueles causados por deficiência nutricional. A diagnose por meio de técnicas sorológicas é a menos utilizada, já que esses vírus não atingem altas concentrações nas plantas, dificultando a purificação das partículas virais para a produção de anti-soros. Existem duas técnicas eficientes que podem ser empregadas para a detecção de geminivírus: a reação de polimerase em cadeia (PCR), a hibridização de ácidos nucléicos utilizando sondas radioativas (Santana *et al.*, 2001; Nagata *et al.*, 2004) e sondas não radioativas (Sanchez-Campos *et al.*, 1999).

A PCR é o método que possui maior sensibilidade dentre os citados. Porém, pode apresentar alguns problemas se não tomado os devidos cuidados nos procedimentos de realização da técnica. A obtenção de resultados falso positivos, devido a contaminações, ou falso negativos, causados por inibidores contaminantes da reação ou pela extrema especificidade dos iniciadores pode ocorrer. A hibridização com é um método sensível e rápido, porém seu uso é limitado quando feito com sondas radioativas por ser necessário uma infra-estrutura e treinamento de pessoal especial,

além de oferecer risco a saúde do manipulador e constante necessidade de radioquímicos.

## **2.4 Gênero *Begomovirus* no Brasil**

### **2.4.1 Importância econômica**

Atualmente, os begomovírus são responsáveis pelos principais problemas fitossanitários de diversas culturas agrícolas em todo o mundo, dentre os quais, destacam-se plantas de tomate, feijão, mandioca, pimentão e algodão (Faria *et al.*, 2000; Morales & Anderson, 2001). Mais de 15 espécies virais já foram descritas no Brasil (Tabela 1), e nove espécies foram aceitas pelo ICTV. A intensificação agrícola é considerada como uma das principais causas de surtos epidêmicos de begomovírus (Varma & Malathi, 2003). Os problemas econômicos provocados pelos begomovírus começaram a surgir no Brasil a partir da década de 80, porém, desde a década de 30 esses patógenos vêm sendo relatados. Acredita-se que esse aumento foi ocasionado pela introdução e pela disseminação de um novo biótipo (biótipo B) da mosca-branca (Faria & Zerbini, 2000), que de maneira circulativa transmite o vírus para plantas dicotiledôneas (Jones, 2003). Esse novo biótipo possui ampla gama de hospedeiros, maior fecundidade, e possivelmente uma maior capacidade de dispersão que outras populações de *B. tabaci.*, particularmente de plantas daninhas para plantas cultivadas (Bedford *et al.*, 1994; Bethke *et al.*, 1991; Polston & Anderson, 1997; Faria, 2000).

No Brasil, o *Bean golden mosaic virus* (BGMV) foi o primeiro begomovírus relatado transmitido por mosca branca. Em 1961, foi observado pela primeira vez infectando feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) (Costa, 1965). Naquela época, o patógeno não possuía grande importância, porém, no início dos anos 70, as plantações de feijoeiro nos estados de São Paulo, Paraná e Minas Gerais foram severamente atingidos pela doença. Atualmente, é o principal fator limitante na produção de feijão em no mínimo 12 países na América Latina (Galvez & Morales, 1989; Faria *et al.*, 2000; Morales & Jones, 2004), provocando perdas econômicas que podem variar de 30% a 100%, dependendo da cultivar, estágio da planta, população do vetor, presença de hospedeiros alternativos e condições ambientais (Faria *et al.*, 1996),

sendo uma das culturas mais importantes do Brasil, ocupando o quarto lugar em área plantada e o sexto em valor de produção agrícola (Agrianual, 2004) com Minas Gerais destacando-se entre os maiores produtores dessa leguminosa, juntamente com Paraná, Bahia e São Paulo. Acredita-se que o avanço da cultura da soja e outras culturas hospedeiras da mosca branca tenham sido fatores determinantes para que essa disseminação ocorresse de forma tão eficiente (Costa, 1975).

Até o presente momento, foram descritas no Brasil nove espécies de begomovírus em tomateiro (Cotrim *et al.*, 2007). Os primeiros relatos de uma begomovirose infectando tomate foram feitos entre os anos 1960 e 1975 (Flores *et al.*, 1960; Costa, 1974; Costa, 1975; Matyis *et al.*, 1975). Matyis *et al.* (1975) purificou as partículas virais e o nomeou de *Tomato golden mosaic virus* (TGMV). A ocorrência, até alguns anos atrás, do TGMV em tomate foi sempre muito baixa, provavelmente por causa do inseto vetor, *Bemisia tabaci* biótipo A, que raramente coloniza plantas de tomate. De qualquer maneira, a presença do biótipo B, que foi observado pela primeira vez no Brasil em 1994 (França *et al.*, 1996), com uma gama de hospedeiros muito superior ao biótipo A, fez com que a ocorrência de begomovirose começasse a aumentar no Brasil. Ao contrário do BGMV, a importância econômica do TGMV foi sempre pequena. De fato, apenas após 20 anos esse vírus foi relatado novamente no estado do Rio de Janeiro (Alfenas *et al.*, 1998).

A incidência de doenças causadas por begomovírus em tomate tem aumentado consideravelmente nos últimos anos no Brasil. No final dos anos 80 e início dos anos 90 houve um aumento extremo na diversidade de begomovírus no país, o que coincidiu com a introdução do biótipo B da *B. tabaci* (Ambrozevícius *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2003). Atualmente, esse complexo abriga quatro espécies reconhecidas: TGMV, *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), e também abriga pelo menos oito espécies tentativas, que ainda não foram totalmente caracterizados (Inoue-Nagata *et al.*, 2006; Calegario *et al.*, 2007; Ambrozevícius *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2003; 2007; Andrade *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2006; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008). Esse complexo viral tem sido devastador em plantações de tomate, e tem se tornado progressivamente o maior problema nessa produção no Brasil (Albuquerque *et al.* 2006).

**Tabela 1.** Lista com begomovírus descritos no Brasil (Fauquet *et al.*, 2008). As nove primeiras espécies escritas em itálico são as aceitas pelo ICTV. As sete restantes são espécies tentativas. Os dados referentes ao ano referem-se a data em que os isolados foram obtidos.

<b><i>Vírus</i></b>	<b><i>Nº. Acesso</i></b>	<b><i>Acrônimo</i></b>	<b><i>Ano</i></b>
<i>Bean golden mosaic virus</i>	M88686	BGMV	1978
<i>Sida micrantha mosaic virus</i>	AJ557451	SiMMV	
<i>Sida mottle virus</i>	AY090555	SiMoV	1999
<i>Sida yellow mosaic virus</i>	AY090558	SiYMV	1999
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i>	AF490004	ToCMoV	1996
<i>Tomato golden mosaic virus</i>	K02029	TGMV	1984
<i>Tomato rugose mosaic virus</i>	AF291705	ToRMV	1996
<i>Tomato severe rugose virus</i>	DQ207749	ToSRV	2003
<i>Tomato yellow spot virus</i>	DQ336350	ToYSV	1999
Tomato chlorotic vein virus	AY049205	ToCIVV	1994
Tomato crinkle yellow leaf virus	AY090556	ToCYLC	1999
Tomato crinkle virus	AY049218	ToCrV	1998
Tomato golden vein virus	AY751742	ToGVV	2003
Tomato infectious yellows virus	AY049208	ToIYV	1999
Tomato mottle leaf curl virus	AY049227	ToMoLCV	1999
Tomato yellow vein streak virus	U79998	ToYVSV	1995

### **3. Objetivos**

O objetivo deste trabalho foi realizar o estudo da diversidade de begomovírus que infectam naturalmente o amendoim-bravo e realizar a caracterização molecular e biológica dos vírus encontrados nessas plantas daninhas.

## 4. Material e Métodos

### 4.1 Fonte do vírus e extração de DNA

Foram realizadas coletas nas cidades de Itaberaí, São Miguel de Passa Quatro, Morrinhos, Acreúna, pertencentes ao Estado de Goiás, e em Planaltina, no Distrito Federal. Os isolados obtidos encontram-se na Tabela 2. Todas as amostras são provenientes de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*), apresentando sintomas de mosaico amarelo. O DNA do vírus foi extraído de material foliar de acordo com o método CTAB (Doyle & Doyle, 1987). O DNA foi utilizado em PCR utilizando primers universais específicos para begomovírus (pAR1c496 e pAL1v1978; Rojas *et al.*, 1993).

**Tabela 2.** Isolados virais obtidos de plantas daninhas (*Euphorbia heterophylla*) apresentando sintomas de mosaico amarelo.

<i>Isolados</i>	<i>Local da coleta</i>	<i>Data da coleta</i>
403	São Miguel do Passa Quatro	18/09/2002
404	São Miguel do Passa Quatro	18/09/2002
405	Morrinhos	18/09/2002
3540	Acreúna	19/05/2005
5082	Itaberaí	07/02/2007
5093	Itaberaí	07/02/2007
<b>5818</b>	Planaltina	20/11/2007

### 4.2 Amplificação do DNA via RCA e digestão com enzimas de restrição

A amplificação do genoma completo, DNA-A e DNA-B, foi realizada via ciclo rolante (RCA, Inoue-Nagata *et al.*, 2004), utilizando o TempliPhi Amplification Kit (Amersham Bioscience) de acordo com as especificações do fabricante.

O DNA amplificado foi digerido com 11 diferentes enzimas de restrição: SacI, SacII, XbaI, SpeI, BamHI, PstI, EcoRI, HindIII, ClaI, Sal e XhoI. As reações foram feitas seguindo recomendações dos fabricantes das enzimas. Foram mantidas a 37°C por 20 horas. O resultado da digestão foi visualizado por meio de eletroforese em

gel de agarose 1% em TBE 0,5X, e corado em brometo de etídeo. A enzima SacI foi escolhida entre as 11 testadas por ser capaz de cortar ambos os componentes genômicos em apenas um único ponto.

### 4.3 Clonagem e Transformação

A clonagem do DNA foi iniciada com a digestão do plasmídeo pBluescript SK+ (Stratagene) com a enzima SacI seguido da desfosforilação. Antes de iniciar o processo de desfosforilação, a enzima foi inativada a uma temperatura de 65°C durante 15 minutos. A desfosforilação foi realizada utilizando a enzima fosfatase alcalina (CIAP) de acordo com os procedimentos descritos por Sambrook et al. (1989). Posteriormente, o DNA foi precipitado. A ligação foi realizada em vetor pBluescript SK+ (Stratagene) utilizando a enzima T4 DNA ligase da Invitrogen e mantida a 16°C por 20 horas. Para a transformação por eletroporação (eletroporador BIO-RAD), foram utilizadas células competentes de *Escherichia coli* XL-1 blue, conforme as recomendações do fabricante. As células competentes transformadas foram plaqueadas em meio de cultura LB com ampicilina, previamente preparado com X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-inilil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo) e IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopranosídeo). As placas foram incubadas por 16 horas aproximadamente a 37°C. Após o período de incubação, colônias brancas (recombinantes) foram selecionadas e transferidas para tubos de ensaio contendo meio de cultura LB líquido com ampicilina e mantidas a 37°C em agitação por 20 horas. O procedimento de purificação plasmidial foi realizada (Sambrook et al., 1989) e a confirmação da clonagem feita através da digestão dos clones com a enzima utilizada na clonagem para a verificação da presença do fragmento com tamanho desejado (2,6Kb para o DNA viral e 3,0Kb para o DNA plasmidial). O resultado foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5X e corado em brometo de etídeo. Hibridização com sondas não radioativas específicas para o DNA-A e DNA-B foram realizadas para se identificar o componente de cada clone de acordo com Santana *et al.* (2007).

#### 4.4 Sequenciamento e análise de seqüências

Doze clones foram selecionados e o DNA plasmidial purificados de acordo com o procedimento Perfectprep Plasmid Mini Kit (Eppendorf) para serem seqüenciados por uma empresa especializada na Coréia. Os primers utilizados para o sequenciamento completo dos clones encontram-se na Tabela 3. As seqüências foram montadas e analisadas utilizando o programa Staden 4 (Staden *et al.*, 2003) e o algoritmo Blast, disponível no endereço eletrônico <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. A comparação entre as seqüências foi feita utilizando o programa DNAMan (Lynon, Biosoft). As árvores filogenéticas foram cosntruídas no programa Mega 4 (Tamura *et al.*, 2007), após alinhamento obtido pelo Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), utilizando o método de Neighbour Joining em análise “bootstrap” com 1000 repetições.

**Tabela 3.** Primers utilizados para sequenciamento completo dos componentes genômicos (DNA-A e DNA-B) de todos os isolados trabalhados.

<i>Primers</i>	<i>Seqüência (5'→3')</i>
M13F	GTA AACGACGGCCAGT
M13R	GCGGATAACAATTTACACAGG
CaloA1600R	ATCGCTAACGCATATCGTCC
EuMA400F	GGAAGCCCAGGATCTATC
EuMA1650R	ATTGATGATGTCGCTCCGC
EuMA1800R	GTCATTTAACAATGTCCCGTCTG
EuMA1140F	GTCCAGACTTGGAAGTTC
CaloA840R	AGCCATTTAGATGCGGATTCAG
CaloA220R	ATGTGTGAAGGCATCCAG
EuMA1680F	CGGAGCAACATCATCAATGAC
EuMVA1752F	GGG CAT CTC GAT TTC AAT TC
ABBclone3540F	CCC TCA GTC GTT CAA TTT GGG GG
ABBclone3540R	GTC ATG GTA ATC TAA CCG TCA G
ABAclone5818R	GTC AAT TAT TCG CCC CGT GG
ABB1480R	CCGTCGATAACTTCAGTTTTCC
ABA1520F	CAACGTCGCATATACAGGAT
EuMVA261F	GTC AAT TAT TCG CCC CGT GGT GG
ToCMoVA1705R	GTC ATT GAT GAT GTC GCT CC
MaMPRVB895F	CGA GAA AGA CAC GAT GAT GG
BGYMVB1792F	CGA AAT GTG TCC TCT GAT GGA
BGYMVA1077R	CGC ATA TAC AGG ATT AGA GGC
TMYLCVA273F	CGT GGT GGT CCT AAA ATA GAC
PGMVA1644R	CTG GCA GTC CAA CTG TAA ATA
SMV3598F	CGC ATA TCG TCC TTC CAT AA
5082-712R	CCG TAA ACC TCA CTT GGG TCC
PGMVA1644R	CTGGCAGTCCAAGTGTAAATA
SMV3598F	CGCATATCGTCCTTCCATAA
5082-712R	CCGTAAACCTCACTTGGGTCC

#### 4.5 Círculo de hospedeiras

Para se determinar o círculo de hospedeiras do isolado 5082, os clones infecciosos de DNA-A e DNA-B foram inoculados através de bombardeamento segundo o método proposto por Rech & Aragão (1998). Foram utilizadas 11 espécies botânicas: *Datura stramonium*, *D. metel*, *Solanum lycopersicum*, *Euphorbia heterophylla*, *Nicotiana benthamiana*, *N. tabacum* TNN, *N. rustica*, *Physalis pubescens*, *Chenopodium quinoa*, *Capsicum annuum* Ikeda e *C. chinense*.

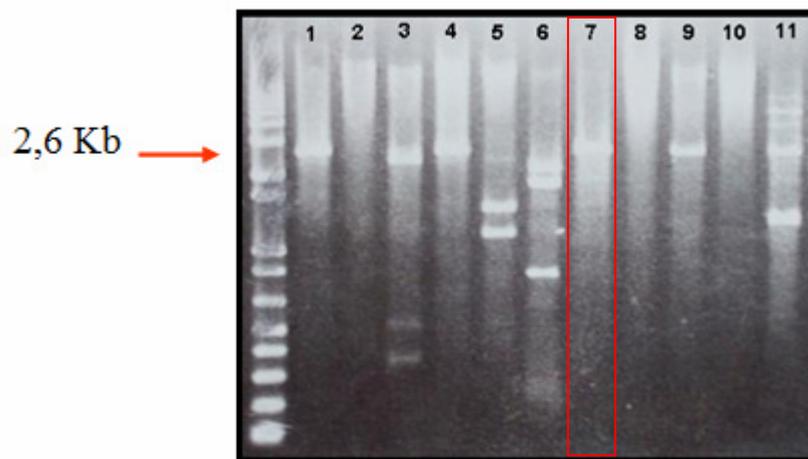
Para a preparação de clones infecciosos por bombardeamento, o segmento de DNA correspondente ao viral foi separado do vetor através da digestão do clone 5082 com a enzima de restrição SacI. O produto da digestão foi visualizado em gel de agarose 1% em TBE 0,5X corado com brometo de etídeo. Os fragmentos com o tamanho de 2,6 kb foram eluídos, utilizando o kit GFX (GE) e novamente ligados com a enzima T4 DNA ligase a 16°C por 20 horas. O DNA foi amplificado via RCA para obtenção de concentração suficiente para o bombardeamento. Duas semanas após o bombardeamento, a extração do DNA viral e PCR utilizando primers universais para begomovírus foram realizadas.

## **5. Resultados**

Entre os anos de 2002 e 2007 coletas de plantas de *Euphorbia heterophylla* com sintomas de infecção viral foram realizadas em alguns municípios do estado de Goiás e Distrito Federal. Essas amostras apresentavam sintomas de mosaico amarelo. As amostras foram submetidas a extração de DNA total e avaliadas em teste de detecção de begomovírus via PCR. Verificou-se que muitas encontravam-se infectadas por begomovírus e então sete amostras foram selecionadas ao acaso para o estudo de diversidade com a clonagem e determinação da sequência genômica do vírus: #403, #404, #405, #3540, #5082, #5093 e #5818.

### **5.1 Clonagem do genoma de begomovírus de amendoim-bravo**

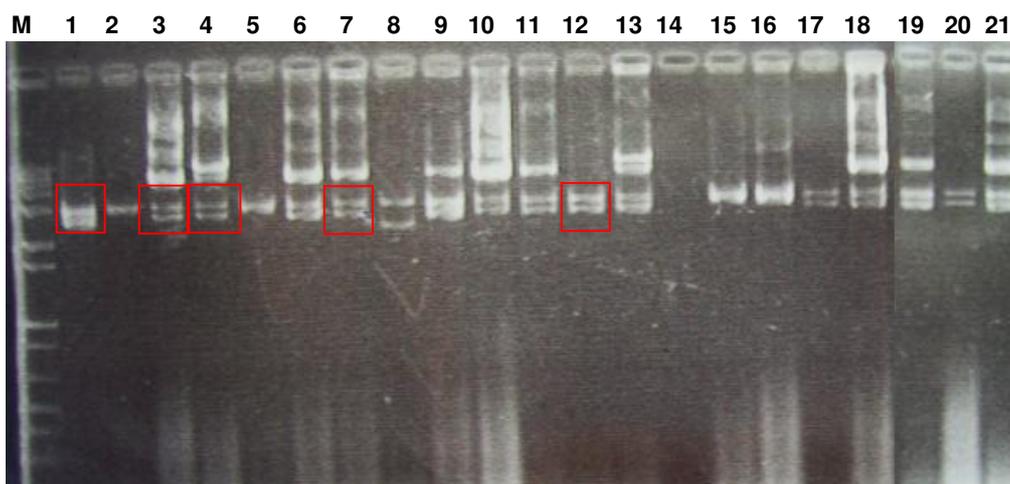
O procedimento de clonagem foi iniciado com a amostra #5082. O DNA viral do isolado 5082 amplificado via RCA foi digerido com 11 diferentes enzimas de restrição para a determinação de enzimas que cortam o genoma em apenas um único ponto (Figura 2). As enzimas ClaI, HindIII, SacI e BamHI digeririam o DNA em, aparentemente, apenas um sítio (Figura 1, linha 1, 4, 7 e 9, respectivamente), gerando um fragmento no tamanho esperado de 2,6 kb. Dentre as enzimas que clivaram o DNA no tamanho desejado, SacI foi selecionada ao acaso. Essa enzima foi capaz de clivar tanto o DNA-A quanto o DNA-B. As outras enzimas clivaram o DNA em mais de um ponto, gerando fragmentos com tamanhos diferentes do esperado. As enzimas XbaI, Sac II e Spe I (Figura 1, linhas 2, 8 e 10 respectivamente) aparentemente não digeriram o DNA.



**Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose a 1%. DNA corado em brometo de etídeo. As enzimas de restrição utilizadas na digestão do DNA da amostra #5082 amplificado foram: 1) ClaI, 2) XbaI, 3) PstI, 4) HindIII, 5) EcoRI, 6) SalI, 7) SacI, 8) SacII, 9) BamHI, 10) SpeI e 11) XhoI. Em destaque, a enzima de restrição escolhida para realização da digestão das demais amostras. O marcador utilizado foi o 1Kb Plus.

O DNA viral digerido com Sac I foi ligado ao plasmídeo pBluescript SK+ (Stratagene), anteriormente digerido com Sac I e desfosforilado, para realização da transformação. Vinte e uma colônias foram selecionadas e o DNA plasmidial purificado. Cada purificação foi digerida com a enzima de restrição selecionada (Sac I) (Figura 3). Seis clones foram descartados por não apresentarem os fragmentos com tamanho esperados de 2,6 Kb e 3,0 Kb (Figura 3, linhas 2, 5, 8, 14, 15 e 16). Os 15 clones restantes foram digeridos com a enzima de restrição MspI, para verificação do padrão dos fragmentos. Quatro padrões distintos foram observados, sendo que os clones 3 e 4 foram selecionados por apresentarem o padrão 1, o clone 4 o padrão 2, o clone 7 por possuir o padrão 3 e o clone 12 o padrão 4. Após a realização da purificação plasmidial, foi feita a hibridização (Dot blot) utilizando sonda para DNA-A e sonda para DNA-B. Esse procedimento foi realizado para identificação dos clones com DNA-A e os clones com DNA-B. Os clones 5082 1, 3 e 4 reagiram como DNA-A e 5082 7 e 12 como DNA-B. Esses clones foram purificados e o inserto seqüenciado com primers do vetor e primers internos.

A clonagem das amostras #403, #404, #405, #3540, #5093 e #5818 foi realizada após e de modo semelhante à amostra #5082. Todas as clonagens foram realizadas com a enzima SacI.



**Figura 3.** Análise do padrão de restrição para seleção dos clones recombinantes. Digestão de 21 clones com a enzima de restrição Sac I. Somente os clones 2, 5, 8, 14, 15 e 16 não apresentaram tamanho de fragmento de DNA esperado. Todos os outros clones apresentaram fragmentos com tamanho de 2,6kb (inserto) e 3kb (vetor). Os clones 1, 3, 5, 7 e 12 foram selecionados.

## 5.2 Análise da sequência genômica

O sequenciamento genômico mostrou que as amostras #403, #404, #405, #5093, #5818, e os clones 1, 3 e 4 da amostra #5082 eram compostas pelo componente genômico A. Os clones 3 e 4 da amostra #5082 apresentavam sequência idêntica. As amostras #3540 e os clones 7 e 12 da amostra #5082 eram compostas pelo componente B. A identidade entre as amostras com componente A variou de 96 a 99% (Tabela 4). Na comparação das sequências entre as amostras com DNA-B, a identidade foi de 97% entre as amostras #3540 com as amostras #5082-7 e #5082-12. Quando as amostras #5082-7 e #5082-12 foram comparadas, a identidade foi de 99%. Os clones 4 e 7 da amostra #5082 foram selecionadas para a realização de análises mais detalhadas

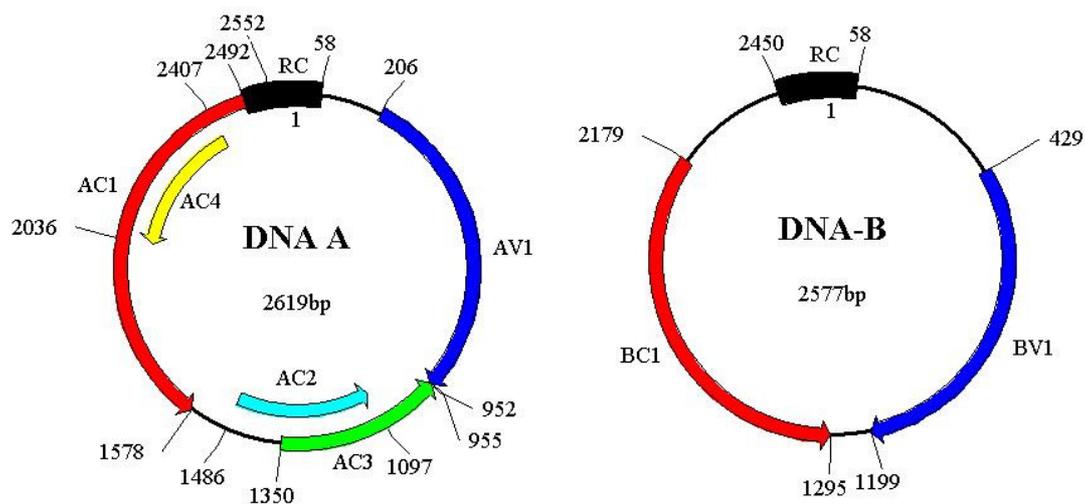
**Tabela 4.** Índices, em porcentagem, da identidade entre as amostras compostas de DNA-A.

	404	405	5082-1	5082-3/4	5093	5818
403	98	98	97	98	98	98
404	-	97	96	97	98	98
405	-	-	96	98	98	98
5082-1	-	-	-	98	98	96
5082 3/4	-	-	-	-	99	98
5093	-	-	-	-	-	98

Para o sequenciamento completo foram utilizados primers do vetor e primers internos (Tabela 3). Os clones 3 e 4 da amostra #5082 foram idênticos, apresentando o mesmo número de nucleotídeos e a mesma sequência genética. Todos os clones sequenciados apresentaram características típicas de begomovírus bipartidos do “novo mundo”. A região de origem de replicação viral (TAATATT↓AC), característica de todos os geminivírus está presente em todos os clones. O DNA-A possui uma ORF no sentido viral (AV1) e quatro no sentido complementar (AC1, AC2, AC3 e AC4), enquanto o DNA-B possui uma ORF no sentido viral (BV1) e uma no sentido complementar (BC1) (Figura 4). Tanto o DNA-A quanto o DNA-B possuem uma Região Intergênica (Região Comum – RC), com aproximadamente 185 nucleotídeos apresentando 91% de identidade. A sequência total do DNA-A dos clones apresentou um índice de <89% de identidade com outros *Begomovirus*.

As sequências nucleotídicas dos DNA-A e B foram comparadas com outras 22 sequências de begomovírus do Brasil (Tabela 5). Todas as sequências estão disponíveis online. O vírus que apresentou maior identidade quando comparado as sequências completas do DNA-A foi o EuMV Peru com 86,9%, e do DNA-B foi o TCoMV com apenas 61,6%. A sequência total do DNA-A dos clones apresentou identidade nucleotídica menor que 89% com todas as outras sequências de begomovírus disponíveis. De acordo com os critérios estabelecidos pelo ICTV para a família *Geminiviridae* e gênero *Begomovirus*, os vírus isolados de amendoim-bravo podem ser considerados como uma nova espécie.

Quando as ORF's do DNA-A foram comparadas individualmente, o EuMV Peru foi o que apresentou maior identidade com todas as ORF's, com 88,1%, 85,7%, 95,6%, 96% e 79,3% de identidade para as ORF's AV1, AC1, AC2, AC3 e AC4, respectivamente..



**Figura 4.** Organização genômica dos clones 5082-1 (DNA-A) e 5082-7 (DNA-B). A orientação das ORF's é indicada pelas setas que podem ser sentido viral (V) ou complementar (C). A numeração indica as posições onde o códon iniciador e o códon de parada estão em cada ORF. O nucleotídeo número 1 localizado na região intergênica representa o sítio de clivagem (↓) na sequência TAATATT↓AC.

**Tabela 5.** Comparação em porcentagem de identidade de nucleotídeos das sequências completas e ORF's do DNA-A e DNA-B do isolado 5082 com outros begomovírus. A identidade de nucleotídeos é dada em porcentagem.

Vírus-[isolado]*	DNA-A %	DNA-B %	ORF individual				
			AV1	AC1	AC2	AC3	AC4
EuMV Peru	86,9	-	88,1	85,7	95,6	96	79,3
EuMV YP	80,6	59,3	83	81,2	85,6	84,2	74,9
BGMV	69,3	60,9	79,9	58,5	74,1	77,1	ND
BYSV	65,6	57,7	79,6	52,2	70,7	71,3	28,6
OMoV	67,8	58,7	78,7	59,2	75,4	77,2	ND
SiCMV	66,5	61,4	80,5	52	72	77,4	25
SimMV-[A1]	68,2	60,1	80,7	58,5	74,3	78,2	31,7
SimMV-[A2]	67,2	55,7	80,1	56,1	70	75,4	29
SiMoV	67,9	ND	80,1	55,5	75,6	78,4	13,4
SiYLCV	72,7	ND	79,7	69,5	74,6	77,4	67,24
SiYMV	68	ND	79,9	58,3	75,8	77,1	34,9
TCoMV	73,5	61,6	79,6	70,3	72,8	74,9	45
TGMV	69,4	59,3	81,8	57,7	77,7	76,4	34,9
TMMV	67,9	57,3	80,8	60,5	77,9	79,2	34,4

<b>ToCMoV-[BA]</b>	70	61,4	80,3	59,1	75,9	76,2	39,8
<b>ToCMVCrumple</b>	68,9	ND	79,6	58,5	75,9	75,7	39,3
<b>ToLDV</b>	69,3	ND	80,8	60,3	77,9	78,8	33,9
<b>ToSRV-[MG]</b>	63,7	55,8	82,9	56,9	72,8	76,4	36,2
<b>ToSRV-[GO]</b>	69,1	61,4	82,9	57,03	74,1	77,4	35,6
<b>ToRMV</b>	69,3	61,3	80,3	57,2	76,1	76,2	20,6
<b>ToYSV</b>	67	53,7	80,5	58,3	74,3	76,9	ND
<b>ToYVSV-[G22]</b>	67,2	56,2	77,8	59,8	59,5	75,8	ND

\*Número de acesso no banco de dados: BGMV [*Bean golden mosaic virus* – NC\_001439 (DNA-A) e NC\_004043 (DNA-B)], BYSV [*Blainvillea yellow spot virus* – NC\_010837 (DNA-A) e NC\_010838 (DNA-B)], OMoV [*Okra mottle virus* - NC\_011181 (DNA-A)], SiCMV [*Sida common mosaic virus* - EU710751 (DNA-A)], SiMV-[A1] [*Sida micrantha mosaic virus* – AJ557450 (DNA-A) e AJ557454 (DNA-B)], SiMV-[A2] [AJ57451 (DNA-A) e AJ557453 (DNA-B)], SiMoV [*Sida mottle virus* – NC\_04637 (DNA-A)], SiYLCV [*Sida yellow leaf culr virus* – EU\_710750 (DNA-A)], SiYMV [*Sida yellow mosaic virus* – NC)004639 (DNA-A)], TCoMV [*Tomato commom mosaic virus* – NC\_010835 (DNA-A) e NC\_010836 (DNA-B)], TGMV [*Tomato golden mosaic virus* – NC\_001507 (DNA-A) e NC\_001508 (DNA-B)], TMMV [*Tomato mild mosaic virus* NC\_010833 (DNA-A)], ToCMoV [*Tomato chlorotic mottle virus* - AF490004 (DNA-A)], ToCMV-Crumple [*Tomato chlorotic mottle virus-Crumple* AY090557 (DNA-A)], ToLDV [*Tomato leaf distortion virus* - EU\_710749 (DNA-A)], ToSRV-[GO] [*Tomato severe rugose virus* – DQ207749 (DNA-A) e NC\_009612 (DNA-B)], ToSRV-[MG] [*Tomato severe rugose virus* – AY\_029750 (DNA-A)], ToRMV [*Tomato rugose mosaic virus* – NC\_002555 (DNA-A) e NC\_002556 (DNA-B)], ToYSV [*Tomato yellow spot virus* – NC\_007726 (DNA-A) e NC\_007727 (DNA-B)] e ToYVSV [*Tomato yellow vein streak virus* – EF459696 (DNA-A)]

A comparação das sequências da RC dos DNA's de begomovírus através da análise de múltiplos alinhamentos dessa região demonstrou que os isolados de euphorbia clonados aqui possuem, em ambos os componentes, repetições do íteron GGTGT (Figura 5), assim como espécies de begomovírus do clado do SLCV (Hérendez-Zepeda *et al.*, 2007). Todos os vírus possuem o TATA box e a sequência de nove nucleotídeos típica dos geminivírus (TAATAT↓AC).

SiCMV	ATTGGGGGAACTGGGGGAACT	TATATA	-TGAGAAGTT	2654
ToLV	ATTGGGGTAA-TGGGGTACAA	TATATA	AGTAAGGAGTT	2613
SimMVA1	A-TTGGAGTAT-GGAGTACAA	TATATA	TGA-GGAGTT	2630
SiMoV	AATTGGAGTAT-GGAGTACAA	TATATA	AGTA-GGAGTT	2640
OMV 6328	A-TTGGAGTAT-GGAGTACAA	TATATA	AGTA-ATAG--	2635
OMV 6319	A-TTGGAGTAT-GGAGTACAA	TATATA	AGTA-ATAG--	2635
ToYSV	ATTGGTGACATTGGTGTACAA	TATATA	ACTA-GAAGTT	2646
SiYMV	--CTGGGGTCT-TATTTATAGCAGACT	CCATATAAATT		2632
SimMVA2	A-TTGGGGTAA-TGGGGACAA	TATATA	AGTA-GAAGAT	2649
quiabo5157	A-TTGGGGTAA-AGGGGACAA	TATATA	AGTA-GAAGAT	2658
TmiMV	A-TCGGTGTAT-GGTGTACAA	TATATA	AGTAAGAAGTT	2678
EuMV_Yucatan1	--CTGGTGTCTTGGTGT	CCCATT	TATACTAAAAG-TC	2585
EuMV_Yucatan2	--CTGGTGTCTTGGTGT	CCCATT	TATACTAAAAG-TC	2585
EuMV_Jamaica1	--TTGGAGTCTTGGAGT	CCCATT	TATACATAAAAG-CC	2580
EuMV_Jamaica2	--TTGGAGTCTTGGAGT	CCCATT	TATACATAAAAG-TC	2580
EuMV_PR	--CTGGTGTCTTGGTGT	CCCATT	TATACTAAAAG-TC	2587
EuMV_Cuba	-----			
ToMYLCAV	--CTGGAGTCTTGGAGT	CCCATT	TATACTAAAAG-CC	2575
SLCV	--CTGGTGTCTTGGTGT	CCTA	TATATACTCAAGACA	2601
MCLCV	--GTGGTGTCTTGGTGT	CCTA	TATATACTACAAGGCT	2627
SMLCV	--CTGGTGTCTTGGTGT	CCCATT	TATACAAC----TC	2577
5082_3	--GTGGTGTCTTGGTGT	CCCATT	TATACTAAAAGCCT	2582
5082_4	--GTGGTGTCTTGGTGT	CCCATT	TATACTAAAAGCCT	2582
5082_1	--GTGGTGTCTTGGTGT	CCCATT	TATACTAAAAGCCT	2591
5093	--GTGGTGTCTTGGTGT	CCCATT	TATACTAAAAGCCT	2582
403	--GTGGTGTCTTGGTGT	CCCATT	TATACTAAAAGCCT	2583
ABA3	--GTGGTGTCTTGGTGT	CCCATT	TATACTAAAAGCCT	2582
5818	--GTGGTGTCTTGGTGT	CCCATT	TATACTAAAAGCCT	2582
405	--GTGGTGTCTTGGTGT	CCCATT	TATACTAAAAGCCT	2583
404	--GTGGTGTCTTGGTGT	CCCATT	TATACTAAAAGCCT	2582
EuMV_Peru	--CTGGTGTCTTGGTGT	CCCATT	TATACTAAAAGCCT	2578
ToCommonMV	--CTGGTGTCTTGGTGT	CCCATT	TATACTAGAACTCT	2533
SiYLCV	--CTGGTGTCTTGGTGT	CCAATT	TATACTAGAAAGCT	2637
BGMV	ATCGGTGTAATGGTGCCAA	TATATA	-GTAAGAAGTTC	2587
BLYSV	ATTGGAG-ATTGGGGACAA	TATATAT	TGCGAGAAGATA	2629
ToCMVCrumple	ATTGGGGACTGGGGT--CC	TATATATA	CTAGAACCCT	2590
TCMVIg1	ATTGGGGACTGGGGT--CC	TATATATA	CTAGAACCCT	2587
ToCMVBA	ATTGGGGACTGGGGT--CC	TATATATA	CTAGAACCCT	2587
ToRMV	ATTGGTAGTTATGGTAGCTCT	TATATA	CTAGAAGTTC	2589
ToSRVGO	ATTGGTAGTTATGGTAGCTCT	TATATA	AGTAGAAGTTC	2561
ToSRVMG	ATTGGTAGTAATGGTAGCTCT	TATATA	AGTAGAAGTTC	2556
ToYVSVG22	A-TTGGGGAATGGGTCTCAAT	-ATATA	AGTAGAGTCCA	2532
ToYVSVBa3	A-TTGGGGAAGGGTCTCAAT	-ATATA	AGTAGAGTCCA	2529
TGMV	A-TTGGTAGTAAGGTAGCTCT	TATATA	ATTAGAAGTTC	2562
EuLCV_Fujian	GGCAATT	TATA	TGGTCCCCCAAATGGCACAATCGT	2717
EuLCV	TACAA	TATATA	-GGTGTACACCAAATGGCATTATTGT	2711
EuLCV_Pusa	CCTTATT	TATA	GTAGAGGACCTAAATGGCATATTTGT	2727

SiCMV	--ATCTGCCACGTGGC	-GGCCATCCGC-TA	TAATATT	2687
ToLV	--TAGGGGCACGTGGC	-GGCCATCCG--TA	TAATATT	2645
SimMVA1	-----TGCATAAAGC	-GGCCATCCGT-TC	TAATATT	2659
SiMoV	-----GGCACGTGGC	-GGCCATCCGT--C	TAATATT	2668

OMV_6328	-----TTCCTAA----GGCCATCCGT--A	TAATATT	2660
OMV_6319	-----TTCCTAA----GGCCATCCGT--A	TAATATT	2660
ToYSV	-----GTCCTATAGC-GGCCATCCGT--A	TAATATT	2674
SiYMV	-----GACACGTGGC-GGCCATCCGC-TA	TAATATT	2661
SimMVA2	---TTTAA-----GC-GGCCATCCGC-AC	TAATATT	2675
quiabo5157	---TTTAA-----GC-GGCCATCCGC-AC	TAATATT	2684
TmiMV	---GGTAACACGTGGC-GGCCATCCGT---	TAATATT	2708
EuMV_Yucatan1	-----GGCA-AAAGC-GGCCATCCGC-AA	TAATATT	2613
EuMV_Yucatan2	-----GGCA-AAAGC-GGCCATCCGC-AA	TAATATT	2613
EuMV_Jamaica1	-----GGCACGTGGC-GGCCATCCGC-AA	TAATATT	2609
EuMV_Jamaica2	-----GGCACGTGGC-GGCCATCCGC-AA	TAATATT	2609
EuMV_PR	-----GGCA-AAAGC-GGCCATCCGC-AA	TAATATT	2615
EuMV_Cuba	-----		
ToMYLCAV	ACGT--GGTGCACATC-GGCCATCCGC-AA	TAATATT	2609
SLCV	ACCAAGGGGCAAATC-GGCCATCCGC-AA	TAATATT	2637
MCLCV	ACCA-GGGGTAAATTC-GGCCATCCGC-AA	TAATATT	2662
SMLCV	ACCA-GGGGCAAATC-GGCCATCCGC-AA	TAATATT	2612
5082_3	-----GGTACGTGGC-GGCCATCCGT--A	TAATATT	2610
5082_4	-----GGTACGTGGC-GGCCATCCGT--A	TAATATT	2610
5082_1	-----GGTACGTGGC-GGCCATCCGT--A	TAATATT	2619
5093	-----GGTACGTGGC-GGCCATCCGT--A	TAATATT	2610
403	-----GGTACGTGGC-GGCCATCCGT--A	TAATATT	2611
ABA3	-----GGTACGTGGC-GGCCATCCGT--A	TAATATT	2610
5818	-----GGTACGTGGC-GGCCATCCAT--A	TAATATT	2610
405	-----GGTACGTGGC-GGCCATCCGT--A	TAATATT	2611
404	-----GGTACGTGGC-GGCCATCCGT--A	TAATATT	2610
EuMV_Peru	-----A-----TCGC-GGCCATCCG---	TAATATT	2600
ToCommonMV	-----GGCAAAGC-GGCCATCCAT--A	TAATATT	2560
SiYLCV	-----GGCAAAGC-GGCCATCCAT--A	TAATATT	2664
BGMV	G-----ACACG-TGGC-GGCCATCCGC-TA	TAATATT	2617
BlySV	GTCCCTACACCCTTGC-GGCCCTCAGTATA	TAATATT	2666
ToCMVCrumple	GTTTACACACG-TGGC-GGCCATCCGA-TA	TAATATT	2625
TCMVi1	GTTTACACACG-TGGC-GGCCATCCGA-TA	TAATATT	2622
ToCMVBA	GTTTACACACG-TGGC-GGCCATCCGT-TA	TAATATT	2622
ToRMV	GCT---ACACG-TGGCCGGCCATCCGA-TA	TAATATT	2622
ToSRVGO	GCT---ACACG-TGGC-GGCCATCCGT-TA	TAATATT	2593
ToSRVMG	GCT---ACACG-TGGC-GGCCATCCGT-TA	TAATATT	2588
ToYVSVG22	---TTTGCCACGTGGC-GGCCATCCGT-TA	TAATATT	2564
ToYVSVBa3	---TTTGCCACGTGGC-GGCCATCCGT-TA	TAATATT	2561
TGMV	-----CACGTGGC-GGCCATCCGT-T-	TAATATT	2588
EuLCV_Fujian	TCAAAT-TGGTAAAGC-GGCCATCCGT--A	TAATATT	2751
EuLCV	ATACACGCTCCAAAGC-GGCCATCCGT--C	TAATATT	2746
EuLCV_Pusa	CTATACGCTCCAAAGC-GGCCATCCGT--C	TAATATT	2762

**Figura 5.** Alinhamento da sequência de parte da Região Comum do DNA dos isolados sequenciados com outros begomovírus. As sequências em azul correspondem a íterons. O TATA Box está destacado em amarelo, o G Box em cinza e a sequência de nove nucleotídeos (TAATATT↓) em verde.

### 5.3 Análise filogenética

A análise filogenética foi feita comparando-se as sequências completas dos nove clones de DNA-A dos isolados de amendoim-bravo com 39 sequências de diferentes vírus pertencentes ao gênero *Begomovirus* brasileiros e de outros países (Figura 6). O mesmo foi feito com os três clones de DNA-B, que foram comparados com 26 diferentes sequências de begomovírus do Brasil e de outros países (Figura 7).

A análise feita para o DNA-A mostrou uma separação em quatro grupos, sendo que um deles agrupou os vírus de *Euphorbia* das Américas, o *Tomato mild yellow leaf curl aragua virus* (ToMYLCAV) e os vírus de cucurbitáceas, *Squash mild leaf curl virus* (SMLCV), *Squash leaf curl virus* (SLCV) e *Melon chlorotic leaf curl virus* (MCLCV). O segundo grupo abriga os vírus de tomate, sida, quiabo, um vírus de feijão e um vírus de *Blainvillea*. O terceiro grupo abriga três vírus de tomate. O quarto e último grupo abriga os vírus de *Euphorbia* da Ásia.

A análise filogenética utilizando sequências completas do DNA-B dos três clones e de outros 26 begomovírus mostrou a formação de quatro grupos distintos. Os isolados 5082 7 e 12 agruparam-se com os clones 3540 e ABB, estando esses vírus mais próximos entre si (Figura 6).

### 5.4 Círculo de hospedeiras

Para a determinação do círculo de hospedeiras e verificação da infectividade do DNA viral, os clones foram bombardeados em 77 plantas de diferentes espécies botânicas (Tabela 6). Os clones 4 e 7 (DNA-A e DNA-B, respectivamente) do isolado 5082 foram digeridos com a enzima de restrição SacI. Os fragmentos do vetor e do inserto, com 3,0kb e 2,6 kb, respectivamente foram visualizados em gel de agarose. O fragmento de 2,6 kb foi eluído, recircularizado e amplificado via RCA. Para a confirmação da amplificação, o RCA foi digerido e visualizado em gel de agarose. Após esse procedimento, as plantas foram bombardeadas.

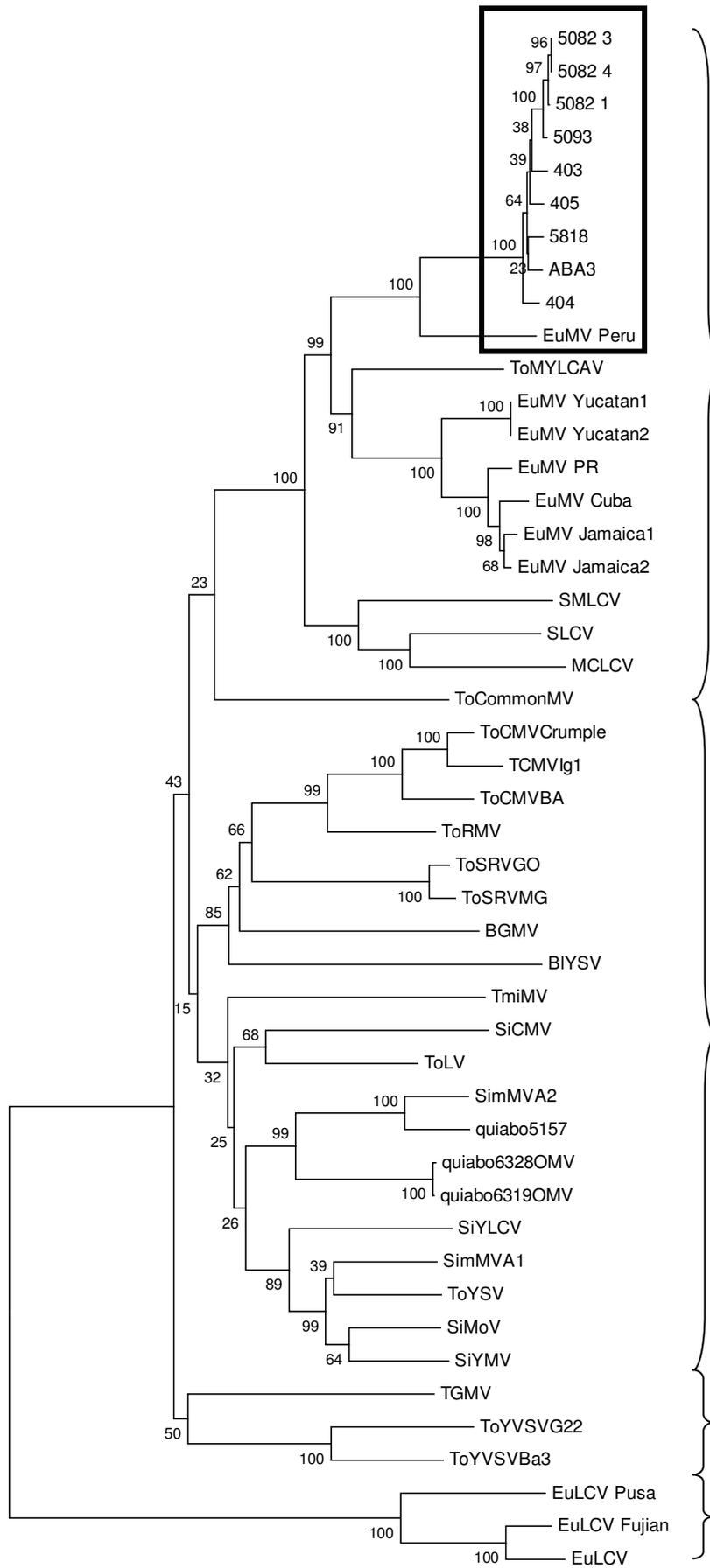
**Tabela 6.** Círculo de hospedeiras do clone 5082 4 e 7 inoculadas por biobalística.

<i>Planta hospedeira</i>	<i>Infectividade*</i>	<i>Sintomas**</i>
<i>Solanum lycopersicum</i>	0/8	-
<i>Datura stramonium</i>	2/6 (33,3%)	DF, MA, B
<i>Datura metel</i>	0/8	-
<i>Nicotiana benthamiana</i>	1/8 (12,5%)	ML, B
<i>Nicotiana tabacum TNN</i>	0/8	-
<i>Nicotiana rustica</i>	0/8	-
<i>Euphorbia heterophylla</i>	7/8 (87,5%)	DF, MA, CN, NF, N
<i>Physalis pubescens.</i>	0/8	-
<i>Capsicum annuum Ikeda</i>	1/4 (25%)	-
<i>Capsicum chinense</i> PI 159236	0/4	-
<i>Chenopodium quinoa</i>	0/7	-

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

\*\* Sintomas: DF: Deformação Foliar; MA: Mosaico Amarelo; B: Bolhosidades; CN: Clareamento de Nervura; NF: necrose foliar; ML: Mosaico Leve; Nanismo: N.

Os clones foram capazes de infectar plantas da família Solanaceae, incluindo *D. stramonium* e *N. benthamiana*, e da família Euphorbiaceae, incluindo *E. heterophylla* (Figura 8). Plantas de *Capsicum annuum* Ikeda apresentaram infecção assintomática, sendo confirmados por métodos moleculares. As plantas que apresentaram sintomas mais severos foram as de *D. stramonium*, que apresentaram além do mosaico amarelo, bolhosidade, nanismo e deformação foliar, os mesmos sintomas descritos por Jaramillo & Lastra (1986) para o vírus EuMV. Os sintomas em *N. benthamiana* foram mais brandos, porém evidentes. As folhas apresentaram mosaico amarelo e bolhosidades. Plantas de *E. heterophylla* apresentaram clareamento internerval, mosaico amarelo, pontos necróticos e nanismo.



**Grupo 1**

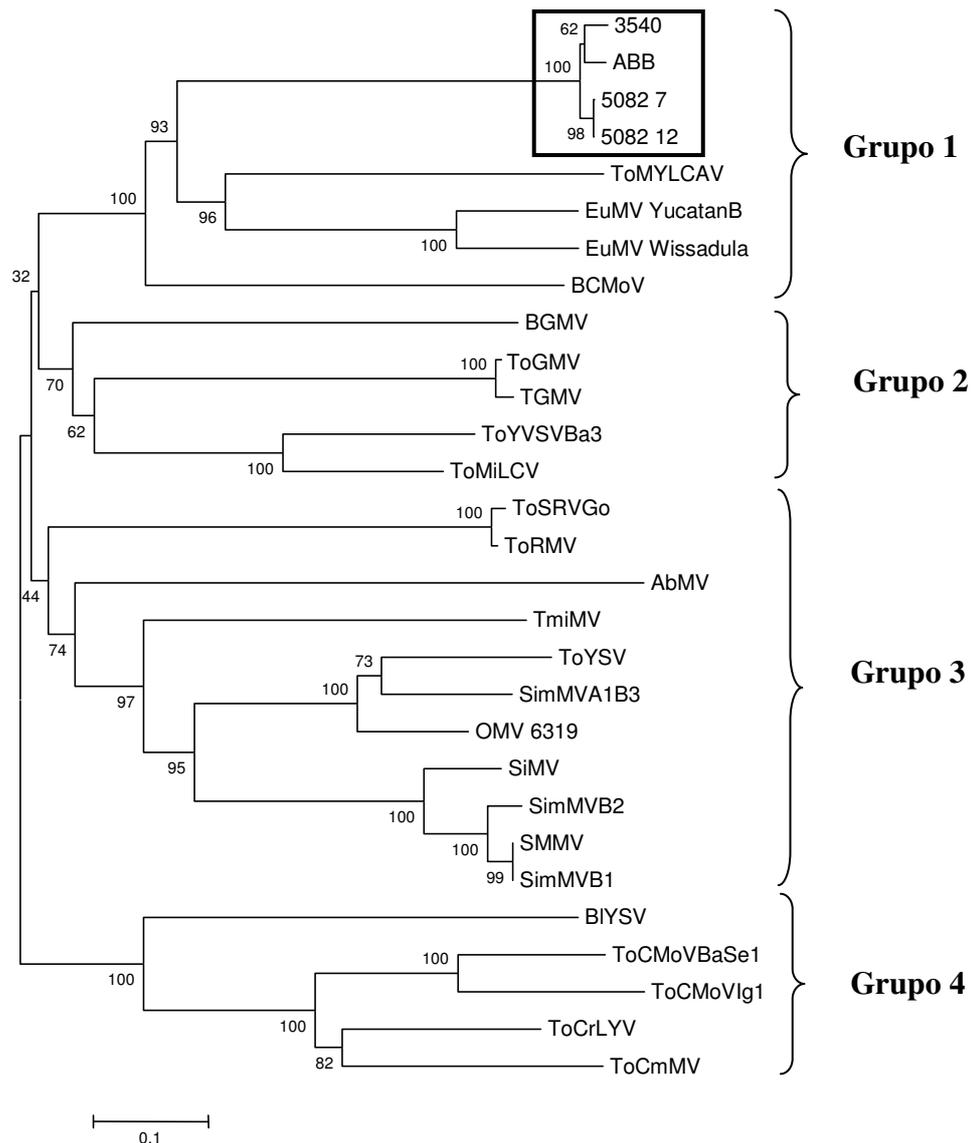
**Grupo 2**

**Grupo 3**

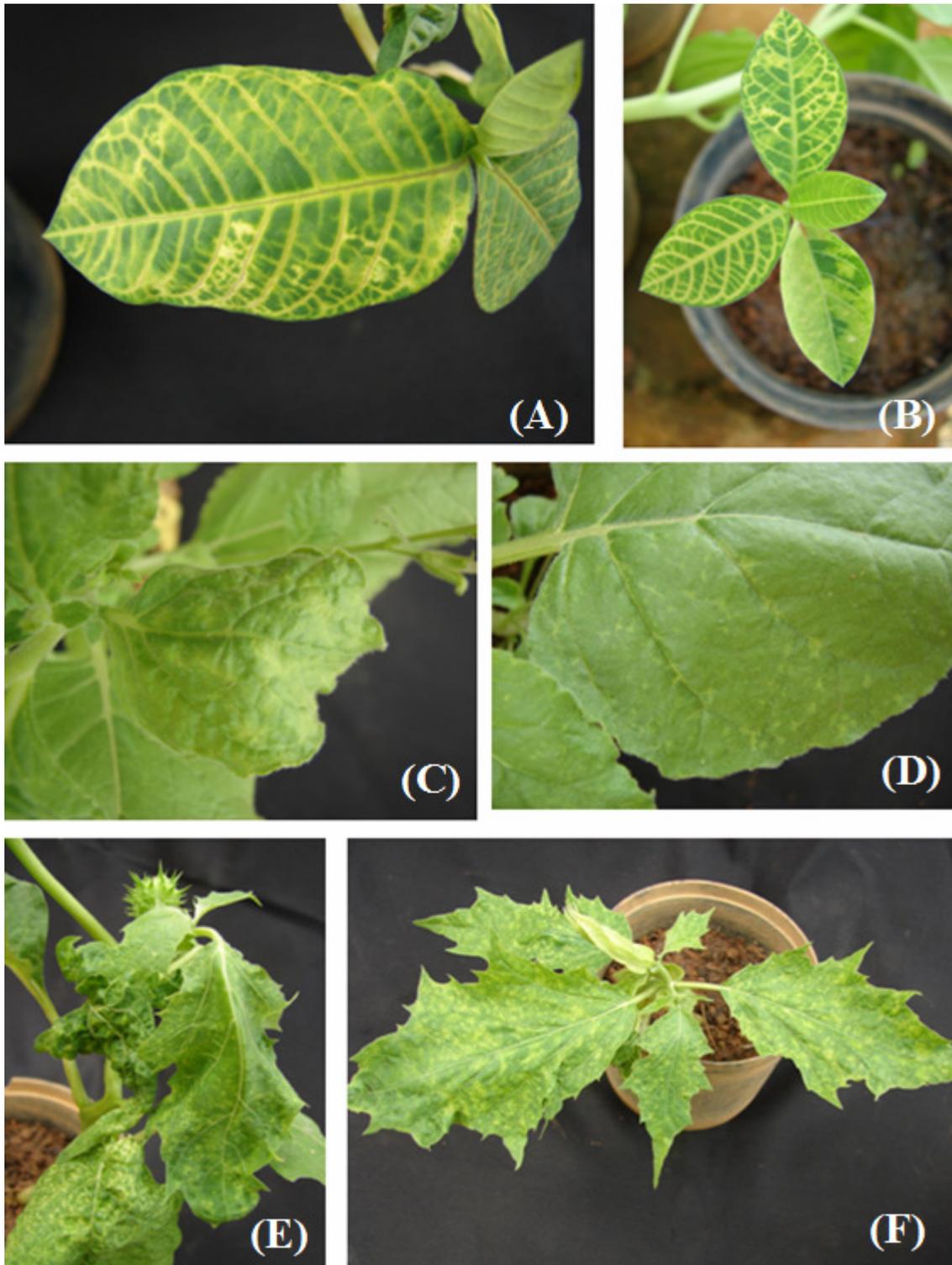
**Grupo 4**

0.05

**Figura 6.** Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento das sequências completas de nucleotídeos do DNA-A dos begomovírus com sequência completa disponíveis online. A árvore foi obtida pelo programa Mega 4 (Tamura *et al.*, 2007), alinhamento Clustal W, utilizando o método de Neighbour Joining em análise “bootstrap” com 1000 repetições. A barra horizontal indica o valor de substituições por sítio. ABA3: Alice Nagata, comunicação pessoal.



**Figura 7.** Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento das sequências completas de nucleotídeos do DNA-B dos begomovírus com sequência completa disponíveis online. A árvore foi obtida pelo programa Mega 4 (Tamura *et al.*, 2007), alinhamento Clustal W, utilizando o método de Neighbour Joining em análise “bootstrap” com 1000 repetições. A barra horizontal indica o valor de substituições por sítio. ABB: Alice Nagata, comunicação pessoal.



**Figura 8.** Plantas bombardeadas com clones infectivos do isolado 5082 do vírus caracterizado. A e B) Plantas de *E. heterophylla* apresentando clareamento nerval e mosaico amarelo; C e D) *N. benthamiana* apresentando mosaico e pontos cloróticos; E e F) *D. stramonium* apresentando mosaico amarelo, deformação foliar, bolhosidade e pontos necróticos.

## 5.5 Análise taxonômica

Em 1991, o ICTV concordou em adicionar espécies às categorias de gênero, subfamília, família e ordem na classificação universal dos vírus, e defendeu a seguinte definição para espécies de vírus: “Uma espécie de vírus é uma classe politética de vírus que constitui uma linhagem replicativa e ocupa um nicho ecológico particular” (Murphy *et al.*, 1995; van Regenmortel, 1990). Inerente a esta definição está a necessidade de que mais de uma característica de diferenciação deverá ser considerada para distinguir espécies, e isto tem sido estabelecido para os geminivírus (Rybick *et al.*, 2000).

Apesar do impacto de recombinações entre espécies, o que muitas vezes mascara o nível de diferença entre espécies e isolados, o melhor limiar de demarcação de espécies continua sendo a identidade de sequência <89% (Fauquet & Stanley, 2005). Em 2008, Fauquet *et al.* determinaram que uma nova espécie é aceita quando a análise de comparação de sua sequência apresentar um índice de <89%. Se a análise gerar identidade acima de 89%, definitivamente esse vírus pertence à mesma espécie.

De acordo com os critérios estabelecidos pelo ICTV, o isolado caracterizado neste trabalho é considerado uma espécie distinta e o nome Euphorbia yellow mosaic virus é proposto.

## 6. Discussão

Vírus que causam mosaico em euphorbia foram primeiramente descritos por Costa & Bennett, em 1950 no Brasil. Doenças similares foram relatadas em diversos países (Bird *et al.*, 1975; Kim & Flores, 1979) e alguns anos mais tarde, Debrot & Centeno (1983) relataram um isolado venezuelano do vírus causador do mosaico em euphorbia. O isolado *Euphorbia mosaic virus* Yúcatan Península (EuMV-YP) foi o primeiro a ser completamente seqüenciado e caracterizado (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007). Esse vírus ainda não foi relatado como sendo um problema para nenhuma cultura, apesar de infectar feijão (*Phaseolus vulgaris*) (Costa, 1965; Hernández-Zepeda *et al.*, 2007), tomate (*Lycopersicon esculentum* cv. Humaya) e pimentão (*Capsicum annuum*) (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007). As características expostas por Costa & Bennet (1950) para o EuMV relatado no Brasil nos levam a acreditar que esse vírus e o EuYMV são vírus distintos. Apesar de não ter sido seqüenciado, o que possibilitaria comparações mais seguras, o EuMV induz sintomas diferentes dos apresentados para o EuYMV em *D. stramonium*, além de infectar plantas de tomate, o que não foi observado para o EuYMV.

As características dos componentes A e B do DNA dos clones trabalhados demonstram que sua organização genômica é típica dos geminivírus do hemisfério ocidental, pertencentes ao gênero *Begomovirus* com genoma bipartido. A identidade da sequência foi de 86,9% em relação a qualquer outro vírus já caracterizado e com sequência registrada. Portanto, com base nos critérios taxonômicos atuais estabelecidos por Fauquet *et al.* (2003; 2008) esses clones podem ser considerados de uma nova espécie do gênero, nomeado como Euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV). A região comum (RC) do DNA-A e DNA-B possui uma identidade de 91%, apresentando 185 nucleotídeos cada um. Os componentes genômicos foram capazes de provocar infecção sistêmica, demonstrando, portanto, que eles são pares cognatos. Foi identificado o íteron GGTGT na RC dos dois componentes. Essa sequência é 100% idêntica ao encontrado em begomovírus do hemisfério ocidental pertencentes ao clado do *Squash leaf curl virus* (SLCV) (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007). Acredita-se que o EuYMV seja capaz de formar pseudo-recombinantes com os vírus *Tomato mild mosaic virus* (ToMIMV), *Squash leaf curl virus* (SLCV), *Melon chlorotic leaf curl virus* (MCLCV), *Squash mild leaf curl virus* (SMLCV), *Tomato common mosaic virus*

(ToCmMV) e *Sida yellow leaf curl virus* (SiYLCV), já que essas espécies possuem a mesma sequência de íterons. Porém, Andrade *et al.* (2006) já relatou casos de pseudo-recombinação entre espécies que possuem íterons diferentes.

A análise filogenética baseada nas sequências do DNA-A e DNA-B de begomovírus do “novo mundo” (Rojas *et al.*, 2005) indica que os begomovírus das Américas que infectam euphorbia formam um grupo monofilético. Nesse mesmo grupo, estão inseridos os vírus *Tomato mild yellow leaf curl Aragua virus* (ToMYLCAV), para o DNA-A e DNA-B, e os vírus SMLCV, SLCV e MCLCV, apenas para o DNA-A. Através da análise, podemos inferir que o EuYMV provavelmente possua o mesmo ancestral que o EuMV-Peru para o DNA-A. Para o DNA-B, possivelmente os vírus EuMV - Yucatan e Wissadula, além do ToMYLCAV, possuam o mesmo ancestral. Curiosamente, o *Euphorbia leaf curl virus* (EuLCV), que infecta *E. pulcherrima*, planta originária do México, mas que foi exportada para a China, é o vírus que mais se distancia dos vírus que infectam euphorbia nas Américas. Acredita-se que logo após sua chegada à China, *E. pulcherrima* foi infectada por vírus de culturas locais. Isso explicaria a distância filogenética existente entre esses vírus isolados de plantas pertencentes ao mesmo gênero (Ma *et al.*, 2004).

O estudo do círculo de hospedeiras foi feito com a realização da inoculação por bombardeamento em plantas cultiváveis e daninhas. O EuYMV foi capaz de infectar plantas das famílias Solanaceae e Euphorbiaceae e incapaz de infectar plantas da família Chenopodiaceae. Nas infecções, houve plantas assintomáticas ou com sintomas que variaram de mosaico leve, manchas necróticas, deformação foliar e nanismo. Apenas uma planta de *Capsicum annuum* mostrou-se infectada, sendo detectada por métodos moleculares, já que a infecção era assintomática. O índice de infecção do EuYMV foi baixa em todas as plantas infectadas, exceto em *E. heterophylla*, com índice de infecção de 87,5% (7/8). Com o alto índice de infecção apresentado, o *E. heterophylla* funciona como reservatório do vírus para plantas cultiváveis, tornando-se uma séria ameaça para a produção de diversas culturas. A baixa infectividade em plantas como *C. annuum*, *N. benthamiana* e *D. stramonium*, pode ser pela pouca adaptação que o EuYMV tem a essas cultivares. Segundo Brown (2001), alguns estudos fornecem evidências de que uma vez que o begomovírus esteja estabelecido em um hospedeiro cultivado, o vírus se adapta rapidamente, tornando-se

irreconhecível, isto é, provocando sintomas distintos do anteriormente observados para aquele vírus. Não há dados que permitam relacionar essa informação ao EuYMV. Porém, os resultados obtidos nesse trabalho indicam que esse vírus pode tornar-se uma séria ameaça a plantas de pimentão, e trabalhos como o de Hernández-Zepeda *et al.* (2007) realizados para o EuMV-YP, fornecem informações que nos levam a acreditar que o EuYMV pode ter a capacidade de infectar plantas de feijão e tomate.

Esse trabalho é o primeiro a apresentar a sequência completa de um vírus que infecta a planta daninha amendoim-bravo no Brasil, que foi capaz de induzir sintomas em plantas das famílias Solanaceae e Euphorbiaceae através da inoculação por bombardeamento de partículas. A caracterização está em fase final, e com os resultados já obtidos é possível concluir a existência de um novo vírus pertencente ao gênero *Begomovirus*.

## Considerações finais

O gênero *Begomovirus* contém a maioria das espécies de geminivírus identificados e são transmitidos exclusivamente pela mosca branca, *Bemisia tabaci*, a plantas dicotiledôneas. O Brasil é considerado o país neotropical com maior centro de diversidade de begomovírus bipartidos no mundo. Os begomovírus são importantes patógenos em diversas culturas economicamente importantes, a maioria nas regiões tropical e subtropical. Assim como as plantas cultivadas, várias espécies de plantas daninhas vêm sendo relatadas como hospedeiras de *Begomovirus* em diversos países, inclusive no Brasil.

O mosaico das euphorbiáceas foi relatado pela primeira vez em 1950, infectando *Euphorbia prunifolia*, e era causado pelo *Euphorbia mosaic virus*, contudo as informações sobre a doença foram baseadas apenas em observações de sintomas. Anos depois, o vírus foi relatado em alguns países da América Central e do Sul, e que tiveram sua caracterização biológica e molecular realizada. No Brasil, a busca de vírus que infectam plantas daninhas possibilitou a detecção de isolados de begomovírus em campos de produção de hortaliças em algumas regiões do estado do Goiás e Distrito Federal.

Esse trabalho permitiu a caracterização molecular e biológica dessas amostras, o que nos forneceu as sequências genômica de sete isolados. Através da inoculação via bombardeamento de partículas, foi possível verificar que *Capsicum annuum*, *Datura stramonium*, *Nicotiana benthamiana*, além de *Euphorbia heterophylla*, foram infectadas pelo vírus. Plantas de tomate, ao contrário do que foi relatado para o EuMV, não foram infectadas pelo vírus caracterizado. Entretanto, o número de plantas inoculadas é considerado pequeno, sendo necessários mais testes para a confirmação da capacidade dessa planta de servir como hospedeira para o EuYMV. Testes de resistência deverão ser feitos com um número maior de plantas e com uma diversidade superior a trabalhada até agora.

Os resultados obtidos sugerem que os sete isolados pertencem a uma espécie distinta, e o nome *Euphorbia yellow mosaic virus* é proposto. Este estudo é o primeiro a descrever um vírus que infecta *E. heterophylla* no Brasil, apresentando sintomas distintos em relação ao vírus do mosaico das euphorbiáceas descrito em 1950

por Costa e Bennett. O EuYMV foi capaz de infectar sistemicamente três plantas daninhas e assintomaticamente plantas de pimentão. Essas plantas daninhas funcionam como importantes reservatórios para o EuYMV, além de outros begomovírus em todo o mundo. Os dados mostraram a proximidade filogenética entre o EuYMV e outros vírus que infectam euphorbia, além dos vírus que infectam cucurbitáceas e tomate.

Pouca informação existe atualmente sobre begomovírus que infectam plantas daninhas e que são potenciais patógenos para plantas cultiváveis. Os resultados apresentados nessa dissertação sobre as características biológicas e moleculares do EuYMV fornecerão informações importantes para a ampliação do conhecimento sobre a interação dos begomovírus em relação às plantas daninhas.

## Referências Bibliográficas

- AGRIANUAL. (1999) Anuário da agricultura brasileira. São Paulo. FNP Consultoria e Comércio.
- ALBUQUERQUE, F.A., BORGES, L.M., BETIOLI JUNIOR, E. (2006) As faces do inimigo. Cultivar Hortaliças e Frutas, 7: 10-14.
- ALFENAS, P.C., GALVÃO, R.M., ANDRADE, E.C., MANDELLI, M.S., FERNANDES, A.V., ZERBINI, F.M. & FONTES, E.P.B. (1998) Detection and molecular characterization of novel geminiviruses infecting tomatoes. Fitopatologia Brasileira. 23: 311
- AMARAL, A. L. (2006) Estudos Genéticos e Morfológicos de Biótipos Resistentes e Susceptíveis de *Euphorbia heterophylla* L. (amendoim-bravo) Jaboticabal, Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista.
- AMBROZEVICIUS, L.P., CALEGARIO, R.F., FONTES, E.P.B., CARVALHO, M.G., & ZERBINI, F.M. (2002) Genetic diversity of begomovirus infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. Fitopatologia Brasileira, 27: 372-377.
- ANDRADE, E.C., MANHANI, G.G., ALFENAS, P.F., CALEGARIO, R.F., FONTES, E.P.B. & ZERBINI, F.M. (2006) Tomato yellow spot virus, a tomato-infecting begomovirus from Brazil with a closer relationship to viruses from *Sida* sp., forms pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from *Sida*. Journal of General Virology, 87: 3687–3696.
- ANTIGNUS, Y. & COHEN, S. (1994) Complete nucleotide sequence of an infectious clone of a mild isolate of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). Phytopathology, 84: 707-712.
- ARGÜELLO-ASTORGA, G.R., GUEVARA-CONZALES, R.G., HERRERA-ESTRELLA, L., RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. (1994) Geminivirus replication origin have a group specific organization of interactive elements: A model for replication. Virology, 203: 90-100.
- ASSUNÇÃO, I.P., LISTIK, A.F., BARROS, M.C.S., AMORIM, E.P.R., SILVA, S.J.C., IZABEL, O. SILVA, RAMALHO-NETO, C.E. e LIMA, G.S.A. (2006) Diversidade genética de begomovirus que infectam plantas invasoras na região nordeste. Planta Daninha, Viçosa-MG, v. 24, n. 2, p. 239-244.
- BARROSO, G. M. (1984) Sistemática de angiospermas do Brasil. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, v.2, 377p
- BEDFORD, I.D., BRIDDON, R.W., BROWN, J.K., ROSELL, R. C., e MARKHAM, P.G. (1994). Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. Ann. Appl. Biol. 125:311-325.

- BETHKE, J.A., PAINE, T.D., e NUSSLY, G.S. (1991). Comparative biology, morphometrics, and development of two populations of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on cotton and poinsettia. *Ann. Ent. Soc. Am.* 84:407-411.
- BIRD, J., SANCHEZ, J., RODRIGUEZ, R.L. e JULIÁ, F.J. (1975) Rugaceous (whitefly-transmitted) virus in Puerto Rico. In: JAMARILLO, S. e LASTRA, R. (1986) Purification and properties of the Geminivirus *Euphorbia mosaic virus*. *J. Phytopathology* 115:193-203.
- BODE, O & LESEMAN, D.E. (1976) *Euphorbia ringspot virus*, a new virus in *Euphorbia milii* x *lophogona*. *Acta Horticulturae*, 59: 160-165.
- BRIDDON, R.W., BEDFORD, I.D., TSAI JH, MARKHAM PG (1996) Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, tomato pseudo-curly top virus, suggests a recombinant origin. *Virology* 219: 387–394
- BRIDDON, R.W., PINNER, M.S., STANLEY, J. & MARKHAM, P.G. (1990) Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology*. 177: 85-94.
- BROWN J.K. (2001) The molecular epidemiology of begomoviruses. In: Khan JA, Dykstra J, eds. *Trends in Plant Virology*. Binghamton, NY, USA: Haworth Press, Inc., 279–316.
- CALEGARIO, R.F., FERREIRA, S.S., ANDRADRE, E.C. & ZERBINI, F.M. (2007) Characterization of Tomato yellow spot virus, a novel tomato-infecting begomovirus in Brazil. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 42: 1335-1343.
- CAMPEGLIA, O.G. (1991) Sanidad del cultivo: malezas. In: NASCENTE, A.S.; PEREIRA, W.; MEDEIROS, M.A. (2004) Interferência das plantas daninhas na cultura do tomate para processamento. *Horticultura Brasileira*, 22: 602-606.
- CASAMAYOR, G.R. (1967). Pre-emergence herbicides in sugarcane. In *Memoria annuals Centro de Investigaciones Agropecuarias, Universidad Central de las Villas, Cuba*, pp 54-64.
- CASTILLO-URQUIZA, G.P. , BESERRA Jr., J.E.A. , BRUCKNER, F.P., LIMA, A.T.M., VARSANI, A., ALFENAS-ZERBINI, P. & ZERBINI, F.M. (2008) Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Archives of Virology* 153: 1985-1989.
- COSTA, A.S. (1965) Three whitefly-transmitted virus disease of beans in São Paulo, Brazil. *FAO Plan Prot. Bull.* 13:121-30.
- COSTA, A.S. (1974) Moléstias do tomateiro transmitidos por mosca branca *Bemisia tabaci*. *Fitopatologia (Lima)* 9: 47.
- COSTA, A.S. (1975) Increase in the populational density of *Bemisia tabaci* , a threat to widespread virus infection of legume crops in Brazil. In: ZERBINI, F.M.,

- ANDRADE, E.C., BARROS, D.R., FERREIRA, S.S., LIMA, A.T.M., ALFENAS, P.F. & MELLO, R.N. (2005) Traditional and novel strategies for geminivirus management in Brazil. *Australasian Plant Pathology* 34: 475–480.
- COSTA, A.S. & BENNETT, C.W. (1950) Whitefly transmitted mosaic of *Euphorbia prunifolia*. *Phytopathology* 40, 266-283.
- COSTA, A. S. & CARVALHO, A. M. (1960) Comparative studies between Abution and Euphorbia mosaic viruses. *Phytopathol. Zeitsch.*, v. 38, n. 2, p. 129-152.
- COSTA, A.S. Whitefly-transmitted plant disease. (1976) *Annual Review of Phytopathology* 16:429-447.
- COTRIM, A.A., KRAUSE-SAKATE, R., NARITA, N., ZERBINI, F.M. & PAVAN, M.A. (2007) Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. *Summa Phytopathologica*, 33: 300-303.
- CRONQUIST, A. (1981) *An integrated system of classification of flowering plants*. New York, Columbia University Press, 1262p.
- DEBROT, E.A. & CENTENO, F. (1983) Ocurrencia del virus mosaico de las euforbiaceas infectando a *Euphorbia heterophylla* L. em Venezuela. *Agronomia Tropical* vol. 33
- DEBROT, E., & DAO, H.Y.F. (1963) Nota preliminar sobre un “mosaico amarillento del tomate” in Venezuela. *Agron. Trop.* 13:33-41.
- DONG, X., van WEZEL, R., STANLEY, J. & HONG, Y. (2003) Functional characterization of the nuclear localization signal for a suppressor of Post transcriptional gene silencing. *Journal of Virology*. 77: 7026-7033.
- DOYLE J.J. e DOYLE J.L. (1987) A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11–15.
- FARIA, J.C., ANJOS, J.R.N., COSTA, A. F., SPERÂNCIO, C.A., COSTA, C.L. (1996) Doenças causadas por vírus e seu controle. In: In: LEMOS, L.B., FILHO, D.F., SILVA, T.R.B. e SORATTO, R.P. (2003) Suscetibilidade de genótipos de feijão ao vírus-do-mosaico-dourado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38: 575-581.
- FARIA, J. C., BEZERRA, I.C., ZERBINI, F.M., RIBEIRO, S.G. & LIMA, M.F. (2000) Situação atual das geminiviroses no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, 25: 125-137.
- FARIA, J. C. & ZERBINI, F.M. (2000) Família *Geminiviridae*: taxonomia, replicação e movimento. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 8: 27-57.
- FAUQUET, C.M. (2003) Geminivirus classification and nomenclature; progress and problems. *Annals of Applied Biology*. 142:165-189.

- FAUQUET C.M. & STANLEY J. (2005) Revising the way we conceive and name viruses below the species level: a review of geminivirus taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. *Archives of Virology*, 150: 2151–2179.
- FAUQUET C.M., BRIDDON, R.W., BROWN, J.K., MORIONES, E., STANLEY, J., ZERBINI, M. & ZHO, X. (2008) Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology*. 153: 783-821.
- FERNANDES, J.J., CARVALHO, M.G., ANDRADE, E.C., BROMMONSCHENKEL, S.H., FONTES, E.P.B. & ZERBINI, F. M. (2006) Biological and molecular properties of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Plant Pathology*, 55: 513-522.
- FLORES, E. & SILBERSCHMIDT, K. (1962) Observations on a mosaic disease of *Leonurus sibiricus* occurring spontaneously in São Paulo. *Phytopathologish Z* 43:221-33.
- FLORES, E., SILBERSCHMIDT, K. & KRAMER, M. (1960) Observações de „clorese infecciosa“ das malváceas em tomateiro do campo. *O Biológico*, 26: 65-69.
- FRANÇA, F.H., VILLAS-BOAS, G.L. & BRANCO, M.C. (1996) Ocorrência de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homóptera: Aleyrodidae) no Distrito Federal. *Annal of the Society of Entomology of Brasil*, 25: 369-372.
- FRIENSEN, G.H. (1979) Weed interference in transplanted tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). *Weed Science*, 27: 11-13.
- FRISCHMUTH, T., ENGEL, M., LAUSTER, S. & JESKE, H. (1997) Nucleotide sequence evidence for the occurrence of three distinct whitefly-transmitted Sida-infecting bipartite geminiviruses in Central America. *J. General Virol.*, v. 78, n. 10, p. 2675-2682.
- FRISCHMUTH, S., FRISCHMUTH, T., LATHAM, J. R. & STANLEY, J. (1993) Transcriptional analysis of the virion-sense genes of the geminivirus beet curly top virus. *Virology*, 197: 312-319.
- GALVEZ, G. E. & MORALES, F. J. (1989) Whitefly transmitted viruses. In: LEMOS, L.B., FILHO, D.F., SILVA, T.R.B. e SORATTO, R.P. (2003) Suscetibilidade de genótipos de feijão ao vírus-do-mosaico-dourado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38: 575-581.
- GILBERTSON, R.L., FARIA, J.C., AHLQUIST, P. & MAXWELL, D.P. (1993) Genetic diversity in geminiviruses causing bean golden mosaic disease: the nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of a Brazilian isolate of bean golden mosaic geminivirus. *Phytopathology* 83, 709-715.
- GRÖNING, B.R., HAYES, R.J. & BUCK, W. (1994) Simultaneous regulation of tomato golden mosaic virus coat protein an AL1 gene expression: expression of the AL4 gene may contribute to suppression of the AL1 gene. *Journal of General Virology*. 75: 721-726.

- GUARAGNA, M.A., AMBROSE, J. & JORDAN, R.L. (2004). Detection and characterization of Euphorbia ringspot potyvirus. *Phytopathology* 94 (6), S36.
- GUTIERREZ, C. (2000) Geminiviruses and the plant cell cycle. *Plant Molecular Biology* 43:763-772.
- GUTIERREZ, C., RAMIREZ-PARRA, E., CASTELLANO, M.M., SANZ-BURGOS, A.P., LUQUE, A. & MISSICH, R. (2004) Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. *Veterinary Microbiology* 98: 111–119.
- HANLEY-BOWDOIN, L., ELMER, J.S. & ROGERS, S.G. (1990) Expression of functional replication protein from tomato golden mosaic virus in transgenic tobacco plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87: 1446-1450.
- HANLEY-BOWDOIN, L., SETTLAGE, S.B., OROZCO, B.M., NAGAR, S. & ROBERTSON, D. (1999) Geminivirus: models for plant DNA replication, transcription and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 18: 71-106.
- HARRISON, B.D. (1985) Advances in geminivirus research. *Annu. Ver. Phytopathol.* 23:83-96.
- HARRISON, B.D. & ROBINSON, D.J. (1999) Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted geminivirus (begomovirus). *Annual Review of Phytopathology*, 37: 369-398.
- HAYES, R.J. & BUCK, K.W. (1989) Replication of tomato golden mosaic virus DNA B in transgenic plants expressing open reading frames (ORFs) of DNA A: requirement of ORF AL2 for production of single-stranded DNA. *Nucleic Acids Research*. 17: 10213-10222.
- HERNÁNDEZ-ZEPEDA, C., IDRIS, A.M., CARNEVALI, G., BROWN, J.K. & MORENO-VENEZUELA, O.A. (2007) Molecular characterization and experimental host range of Euphorbia mosaic virus -Yucatan Peninsula, a begomovirus species in the *Squash leaf curl virus* clade. *Plant Pathology*. 56: 763–770.
- HOU, Y.M. & GILBERTSON, R.L. (1996) Increased pathogenicity in a pseudorecombinant bipartite geminivirus correlates with intermolecular recombination. *Journal of Virology*, 70: 5430-5436.
- HUTCHINSON, J. & DALZIEL, J.M. (1958) *Flora of west tropical Africa*, vol I (ii), 2<sup>a</sup> edição revisado por R.W.J. Keay (1973). Crown Agents for overseas governments and administrations, London, 297-828.
- INOUE-NAGATA, A.K., ALBUQUERQUER, L.C., ROCHA, W.B. E NAGATA, T. (2004) A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the

bacteriophage  $\phi$ 29 DNA polymerase. *Journal of Virological Methods*. 116: 209-211.

INOUE-NAGATA, A.K., MARTIN, D.P., BOITEUX, L.S., GIORDANO, L.D., BEZERRA, I.C.; DE AVILA, A.C. (2006) New species emergence via recombination among isolates of the Brazilian tomato infecting Begomovirus complex. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41: 1329-1332.

IITA (1977). Annual Report. International Institute and Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria. pp.98.

JONES DR, 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. *European Journal of Plant Pathology* 109, 195–219.

JUPIN, I., De KOUCHKOVSKY, F., JOUANNEAU, F. & GRONENBORB, B. (1994) Movement of tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV): Involvement of the protein encoded by ORF AC4. *Virology*. 204: 82-90.

KIM, K.S. & FLORES, E.M. (1979) Nuclear changes associated with Euphorbia mosaic virus transmitted by the whitefly. *Phytopathology*, 69: 980-984.

KISSMANN, K.G. & GROTH, D. (1992) *Plantas infestantes e nocivas*. São Paulo, Basf Brasileira, v.2, 798p.

KOONIN, E.V. & ILYINA, T.V. (1992) Geminivirus replication proteins are related to prokariotic plasmid rolling circle DNA replication initiator proteins. *Journal of General Virology*, 73: 2763-2766.

LAZAROWITZ, S.G. (1992) Geminiviruses: genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 11: 327-349.

LAZAROWITZ, S.G. & BEACHY, R.N. (1999) Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *Plant Cell*. 11: 535-548.

LIMA, M.F. & HAJI, F.N.P. (1998) Mosca branca x geminivírus na cultura do tomate no Submédio do Vale do São Francisco. *Horticultura Brasileira*. 15: contracapa.

MA, X.Y., CAI, J.H., LI, G.X, QIN, B.X. & ZHOU, X.P. (2004) Molecular Characterization of a Distinct Begomovirus Infecting Euphorbia pulcherrima in China. *J. Phytopathology* 152, 215–218.

MATYS, J. C., SILVA, D. M., OLIVEIRA, A. R. & COSTA, A. S. (1975) Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. *Summa Phytopathol.* 1:267-74.

MAYO, M.A & PRINGLE, C.R. (1998) Virus taxonomy - 1997. *Journal of General Virology*, 79: 649–657.

MEDCALF, J.C. & deVITA, R. (1960) The use of pre-emergence herbicides for weed control during coffee harvest. *IBEC Research Bulletin* 19:24.

- MONCI, F., SÁNCHEZ-CAMPOS, S., NAVAS-CASTILLO, J., & MORIONES E. (2002) A Natural Recombinant between the Geminiviruses Tomato yellow leaf curl Sardinia virus and Tomato yellow leaf curl virus Exhibits a Novel Pathogenic Phenotype and Is Becoming Prevalent in Spanish Populations. *Virology* 303, 317–326.
- MORALES, F. J. & ANDERSON, P. K. (2001) The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Arch. Virol.*, 146: 415-441.
- MORALES, F.J. & JONES, P.G. (2004) The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. *Virus Research*, 100: 57-65.
- MORRIS, B., RICHARDSON, K., EDDY, P., ZHAN, X.C., HALEY, A. & GARDNER, R. (1991) Mutagenesis of the AC3 open reading frame of African cassava mosaic virus DNA A reduces DNA B replication and ameliorates disease symptoms. *Journal of General Virology*. 72: 1205-1213.
- MULLINEAUX, P.M., DONSON, J., MORRIS-KRSINICH, B.A.M., BOUTON, M.I. & DAVIES, J.W. (1984) The nucleotide sequence of maize streak virus DNA. *The EMBO journal*. 3: 3063-3068.
- MURPHY, F.A., FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., GHABRIAL, S.A., JARVIS, A.W., MARTELLI, G.P., MAYO, M.A. & SUMMERS, M.D. (1995) *Virus Taxonomy – The Classification and Nomenclature of Viruses: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. SpringerWien New York.
- NAGAR, S., HANLEY-BOWDOIN, L. & ROBERTSON, D. (2002) Host DNA replicatin is induced by geminivirus infection of differentiated plant cells. *Plant Cell*. 14: 2995-3007.
- NAGATA, T., INOENAGATA, A.K., ÁVILA, A.C. & GIORDANO, L.B . (2004) Print capture PCR for detection of tomato geminiviruses from plants and whiteflies. *Fitopatologia brasileira*. 29: 91-93.
- NASCENTE, A.S.; PEREIRA, W. & MEDEIROS, M.A. (2004) Interferência das plantas daninhas na cultura do tomate para processamento. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 22: 602-606.
- NATH, S. & MANDAHAR, C.L. (1988) Involvement of gibberellins in breaking bud dormancy in euphorbia crinkle mosaic virus-infected stem cuttings of *Euphorbia pulcherrima* willd. *Biologia Plantarum*. Volume 30, Number 4.
- NOUEIRY, A.O., LUCAS, W.J. & GILBERTSON, R.L. (1994) Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell*. 76: 925-932.
- OLIVEIRA, M.F., PRATES, H.T., BRIGHENTI, A.M., GAZZIERO, D.L.P., VIDAL, R.A., VARGAS, L., OLIVEIRA JR., R.S. & PURCINO, A.A.C. (2002) Atividade da acetolactato sintase de plantas de milho e de amendoim-bravo (*euphorbia heterophylla*) resistentes e suscetíveis ao imazaquin. *Revista Planta Daninha* vol. 20 1: 77-82.

- PADIDAM, M., BEACHY, R.N. & FAUQUET, C.M. (1995) Classification and identification geminivirus using sequence comparisons. *Journal of Genral Virology*, v.76, p. 249-263.
- PADIDAM, M., SAWYER, S. & FAUQUET, C.M. (1999) Possible Emergence of New Geminiviruses by Frequent Recombination. *Virology* 265, 218–225.
- PAPLOMATAS, E.J., PATEL, V.P., HOU, Y.M., NOUEIRY, A.O. & GILBERTSON, R.L. (1994) Molecular characterization of a new sap-transmissible bipartite genome geminivirus infecting tomatoes in Mexico. *Phytopathology*. 84: 1215-1224.
- PARKER, C. (1969) Weed Control. Report SEATO Regional Agriculture Research Project Vol. 2. Reports of consultants, Bangkok, Annex B3, pp 20.
- PEREIRA, W. (2000) Tomate sem plantas daninhas. *Cultivar Hortaliças e Frutas*. n.3
- PETTY, D.R. (1969). Weed problems of Papua and New Guinea. Weed control basic to agriculture development. pp. 136-137. In *Proceedings 1<sup>st</sup> Asina Pacific Weed Control Interchange*, Hawaii, 1967.
- PETTY, I.T., COUTTS, R.H. & BUCK, K.W. (1986) Geminivirus coat protein gene promoter sequences can function in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, 14: 5113.
- PITELLI, R.A. Weed-soybean interference studies in Brazil. In: COOPING, L.G.; POLSTON, J.E., & ANDERSON, P.L. (1997). The emergence of whitefly transmitted geminiviruses in tomato in he Western Hemisphere. *Plant Disease*. 81: 1358-1369.
- PRINGLE, C.R. (1999) Virus taxonomy – 1999 – The universal system of virus taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses during 1998. *Arch Virol* 144: 421–429
- QASEM, J.R. (1992) Pigweed (*Amaranthus* spp.) interference in transplanted tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of Horticultural Science*, 67: 421-427.
- RECH, E.L. & ARAGÃO, F.J.L.A. (1998) Biobalística. In: Brasileiro, A.C.M., Carneiro, V.T.C. (eds) *Manual de transformação genética de plantas*. Embrapa, Brasília, pp. 51-64.
- RIBEIRO, S.G., AMBROZEVICIUS, L.P., ÁVILA, A.C., BEZERRA, I.C., CALEGARIO, R.F., FERNANDES, J.J., LIMA, M.F., MELLO, R.N., ROCHA, H. & ZERBINI, F.M. (2003) Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology*, 148: 281-295.
- RIBEIRO, S.G., MARTIN, D.P., LACORTE, C., SIMÕES, I.C., ORLANDINI, D.R.S., INOUE-NAGATA A.K. (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.

- RIGDEN, J.E., DRY, I.B., KRAKE, L.R. & REZAIAN, M.A. (1996) Plant virus DNA replication processes in *Agrobacterium*: insight into the origins of geminiviruses? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 19: 10280–10284.
- ROCHECOUSTE, E. (1958) Observations on chemical weed control in Maritius. *Bulletin Mauritius Sugar Industries Research Institute* 10:62.
- ROJAS, M.R., GILBERTSON, R.L., RUSSEL D.R. & MAXWELL, D.P. (1993) Use of degenerate primers in polymerase chain reaction to detect whitefly transmitted geminiviruses. *Plant Disease*. 77: 340-347.
- ROOSSINK, M.J. (1997) Mechanisms of plant virus evolution. *Annual Review of Phytopathology*, 35: 191-209.
- RYBICKI, E.P. (1994) A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of *Geminiviridae*. *Archives of Virology*, 134: 49-77.
- RYBICKI EP, BRIDDON RW, BROWN JE, FAUQUET CM, MAXWELL DP, HARRISON BD, MARKHAM PG, STANLEY J (2000) *Geminiviridae*. In: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens E, Estes MK, Lemon S, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch D, Pringle CR, Wickner RB (eds) *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, New York, pp 285–297
- SAJJAPONGSE, A., SELLECK, G.W. & ROAN, Y.C. (1983) Weed control for transplanted tomato. *Acta Horticulturae*, 136: 65-72.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> edn. Cold Spring, Harbor Laboratory Press.
- SÁNCHEZ-CAMPOS, S., NAVAS-CASTILLO, J., CAMERO, R., SORIA, C., DÍAZ, J.A. & MORIONES, E. (1999) Displacement of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)-Sr by TYLCV-Is in tomato epidemics in Spain. *Phytopathology*. 89:1038-1043.
- SANTANA, F.M., INOUE-NAGATA, A.K., NAGATA, T., RIBEIRO, S.G., ÁVIA, A.C. & GIORDANO, L.B. (2007) Detecção de begomovírus em amostras foliares de tomateiro com sondas não radioativas. *Ciência Rural*, 37: 269-272.
- SANTANA, F.M., RIBEIRO, S.G., MOITA, A.W., MOREIRA, D.J. & GIORDANO, L.B. (2001) Sources of resistance in *Lycopersicon* ssp. To a bipartite whitefly-transmitted geminivirus in Brazil. *Euphytica*. 122: 45-51.
- SILVA, J.B. da; PASSINI, T.; VIANA, A.C. (1986) Controle de plantas daninhas na cultura do sorgo. *Informe Agropecuário, Belo Horizonte*, 12: 43-45.

- SILVA, A.C.; FERREIRA, L.R.; FERREIRA, F.A. (2003). Manejo integrado de plantas daninhas. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.24, n.219, p.93-97.
- SOLOMON, S. & RAO, V.V. (1948) New methods of weed control. Poona Agricultural College Magazine 40:4.
- STADEN R, JUDGE DP & BONFIELD JK (2003). Managing sequencing projects in the GAP4 environment. In: Krawetz SA, Womble DD. Introduction to Bioinformatics. A Theoretical and practical approach. Human Press Inc, Totawa.
- STANLEY, J., TOWNSEND, R. & CURSON, S.J. (1985) Pseudorecombinants between cloned DNAs of two isolates of cassava latent virus. Journal General Virology, 66: 1055-1061.
- SUNTER, G. & BISARO, D.M. (1991) Transactivation in a geminivirus: AL2 gene product is needed for a coat protein expression. Virology, 180: 416-419.
- SUNTER, G., HARTITZ, M.D. & BISARO, D.M. (1993) Tomato golden mosaic virus leftward gene expression: autoregulation of geminivirus replication protein. Virology. 195:275-280.
- TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M. & KUMAR, S. (2007) MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24:1596-1599.
- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G. & GIBSON, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22: 4673-4680.
- van REGENMORTEL, M.H.V. (1990) Virus species, a much overlooked but essential concept in virus classification. Intervirology. 31: 241-254
- van REGENMORTEL, M. H. V. et al. (Eds.). (2000) Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. *In: Diversidade genética de Begomovirus que infectam plantas invasoras na região nordeste. Planta Daninha, Viçosa-MG, v. 24, n. 2, p. 239-244, 2006.*
- VARMA, A. E MALATHI, V.G. 2003. Emerging geminivirus problems. A serious threat to crop production. Ann. Appl. Biol. 142: 145-164.
- VARMA, P.M. 1963. Transmission of plant viruses by whiteflies. Bulletin NISI, National Institute of Science in India. pp. 11-33. *In: VARMA, A. E MALATHI, V.G. 2003. Emerging geminivirus problems. A serious threat to crop production. Ann. Appl. Biol. 142: 145-164.*
- VOLL, E. et al. (2002) Competição relativa de espécies de plantas daninhas com a cultura da soja. Planta Daninha, 20: 17-24.

- WEAVER, S.E. (1984) Critical period of weed interference in three vegetable crops in relation to management practices. *Weed Research*, 24: 317-325.
- WEAVER, S.E. & TAN, C.S. (1987) Critical period of weed interference in field-seeded tomatoes and its relation to water stress and shading. *Canadian Journal of Plant Science*, 67: 575-583.
- WEAVER, S.E. & TAN, C.S. (1983) Critical period of weed interference in transplanted tomatoes (*Lycopersicon esculentum*): growth analysis. *Weed Science*, 31: 476-481.
- WILSON, A. K. (1981) *Euphorbia heterophylla*: a review of distribution, importance and control. *Tropical Pest Management*, London, 27: 32-38.
- YONGBOONKIRD, U. (1971) Some weeds in cotton fields. Technical Bulletin, Plant Industry Division, Department of Agriculture, Thailand. n° 12 pp. 56.
- ZHOU, X., LIU, Y., ROBINSON, D.J. & HARRISON, B.D. (1998) Four DNA-A variants among Pakistani isolates of cotton leaf curl virus and their affinities to DNA-A of geminivirus isolates from okra. *Journal of General Virology*, 79: 915-923.

Sequência genômica DNA-A amostra #403

accggatggccgcgatttttttgggtgcctctatccccggcccaggcccaaacgcattta  
gtttgatccgggaccacacacatcaactaaagctgaccaatcacatcaatgctgacgag  
gcaatataactttgagcctacttggccgataagttgtgggtccctatatatttaacgtaa  
ttgacattattcgatatctttaatttgaaatgtctaagcgagatgccccatggcgatta  
atggcggggacctccaaggtcagtcgtaatgtcaattattcgccccgtgggtggcctaa  
aatagacaaggcctcttcatgggtgaacaggcccatgtacaggaagccaggatctatc  
gcatgatatagaggcccagatgttccgaagggatgtgaagggccttghtaaggtccagtc  
atacgagtctcgtcatgacgtttcccatgttgggaaagtgatatgtgtatccgacgtga  
cacggggcaatgggtattacgcatcgtgtgggcaagcgattctgcgtcaagtccgtatac  
attctaggggaagatctggatggatgagaccatcaagttgaagaaccacacgaatagcgt  
catgttctgggtgggtgcgagatcgtcgaccatattggcactcctatggattttggccaag  
tgttcaacatgttcgacaacgaaccagtacagctaccgtgaagaacgatctccgcgat  
cgcttccaagtgatgcacaagttttacgcgaaggctactgggtggacaatatgcgagcaa  
cgagcaggcgatcgtcaagcgtttttggaagggtcaacaactatgcggtgtataaccacc  
aagaggcagggaataacgagaatcatacgggaaacgcggtactattgtacatggcatgt  
actcatgcctctaactcctgtatatgcgacgttgaaaattcggatctatttttatgattc  
gataacaattaataaaaaattgaattttatctcatgattctcgagtacatcatttacat  
atgagcgatcagttgcgaaacgaacagccctaattacatgattaagaccgacgacacc  
aattgatctaaatacattaaaactaaatgcctgaatctacttaataagtcatccaga  
agctcgaatcgatgtcgtccagacttggaaagttcaggaaagctttgcgtagattcagtg  
ccctcctgaggttghtaattgaaccggatctggatgtggatattcgggagcgacgtgtaa  
atcgggtcctccaccccgatgatcttgaatatagaggggatgttggaaacctccaaataaa  
aacggaactctctgcctgagacacagtgatgaactccccgggtgcttaaatccataatct  
gcacagtcgatatggataaatatggaacagccgcagttcaagtcaatccgtcgtcgacg  
tatagctctcctcttggctactctgtgctgtgctttgatagagggggcggtggaggaag  
atgaatttagcattcttgcgtgtccaagctctcaaagatgcattctcctctttgttgag  
gaagtctttatagctagccccctcgctggattgcacagcacgattgatggatccccgc  
ctttaatttgaaccggctttccatatttacagttggactgccagtcctttgggccccca  
atcaactctttccagtgctttaactttagataatgcgagcaacatcatcaatgacggtt  
gtactccacgccattttagtaaacctagaattgaaatcgagatgccactaagataat  
tatgtgggcctaaagctctagcccacatggcttaccgcttcgactatccccctcgact  
acgataactaataggtctatctggccgcgcagcggcacccttccaaaataatcatcagc  
ccactcttgcaaatcagacgggacattgttaaatgacgacagctgaaatgggggaacc  
aaggaaggggtggcttaataaagaggcgctcgacgcttagctttgacattatgataattc  
acgatgaacgtcttcggatcaccagcccttattatgtcgagagcctctcctgcagttgc  
tgcattgacagcgttgtggtagacgtcatctttatggacttggaaacccccagacacct  
tatatttgcgggattcacaataatcacctctttgggtgatgtaatttttgacggcggtg  
gcgtccttggccgattgcgcatttgggtgaaattcggtagaccgtctgggggtgagtgag  
gttgaaaaacctagcatccttgatgttggacttgcgggagagttgaataagacagtgga  
gatgggggaaccatcggcgtggagctcTcgagcgactcggatgtacgtcggcctgacg  
acagtcctatggcaagtcggaagcaactgcagaacttcatctttcggaatatcgcaccg  
gggataagtgaggaatatatttttggcgttaggcgaaatgaaactaggggttccgtggca  
taattgaaaataaagccaggacaccagggggagtcctctcaaaaacctattttctggtg  
gtgtcctgggtgcccatttataactaaaagcctctaggacaccaggggggtacgtggcgg  
ccatccgtaataatatt

Sequência genômica DNA-A amostra #404

accggatggccgcgatttttttgggtgcctctatcccggcccaggcccaaacgcatttag  
ttttatccgggaccacacacatcaactaaaactgaccaatcacatcaatgctgacgagt  
ctatataactttgagcctacttggccgataagttgtggccctatataatttaaataat  
tgacattattcgatatctttaatttgaaatgcctaagcgagatgccccatggcgattaa  
tgacggggacctctaaggtcagtcgtaatgtcaattattcgccccgtggtggctctaag  
atagacaaggcctcttcatgggtgaacaggcccatgtacaggaagcccaggatctatcg  
catgtatagaggcccagatgttccgaagggatgtgaagggccttgtaaagtccagtcac  
acgagtcctcgtcatgacgtttcccatggtgggaaagtgatatgtgtatccgatgtgaca  
cggggcaatggtattacgcatcgtgtgggcaagcgtttctgcgtcaagtctgtgtacat  
tctaggaagatctggatggatgagaccatcaagttgaagaaccacacgaatagcgtca  
tgttctggttgggtgcgagatcgtcgaccatattggcactcctatggattttggccagggt  
ttcaacatggttcgacaacgaacccagtacagctaccgtgaagaacgatctccgcgatcg  
cttccaagtgatgcacaagttttacgcgaaggctactggtggacaatatgcgagcaacg  
agcaggcgatcgtcaagcgtttttggaaggccaataactatgtggtgtataaccaccaa  
gaggcagggaaatacgagaatcatacggagaacgcgttactattgtatatggcatgtac  
tcatgcctctaactcctgtatatgcgacggtgaaaattcggatctatttttatgattcga  
taacaaattaataaaaaattgaattttatctcatgattctcgagtacatcattacatat  
gagcgatcagttgcgaaacgaacagccctaattacatgattaagacctacgacacccaa  
ttgatctaaatacattaaaactaaatgcctgaatctacttaataagtcatcccagaag  
ctcgaatcgatgctcgtccagacttggaaagtcaggaaagctttgcgtagattcagtgcc  
ctcctgaggttgaattgaaccggatctggatgtggatataccggagtgacgtgtatat  
cgggtcctccaccocgatgatcttgaaatagaggggatttggaaacctccaaataaaaa  
cggaaattctctgcctgagacacagtgatgaactccccgggtgcttaaatccataatctgc  
acagtcgatatggagaaatatggaacagccgcagttcaagtcfaatccgtcgtcgacgta  
tagctctcctcttggcagctcgggtgctgtgctttgatagaggggggcgtggaggaagat  
gaatttagcattcttgcgtgtccaagctctcaacgatgcattctcctctttggtgagga  
agtctttatagctagccccctcgctggattgcacagcagattgatggatcccgcct  
ttaatttgaaccggctttccatatttacagttggactgccagtcctttgggcccacat  
caactctttccaatgctttaactttagataatgcgagcgacatcatcaatgacgttat  
actccacgtcattttgagtaaacctagaattgaaatcgagatgccactaagataatta  
tgtgggcctaaagctctagcccacatggcttaccggttcgactatccccctcgactac  
aataactaataggtctatctggccgcgcagcggcacccttccaaaataatcatcagccc  
actcttgcaaatcagacgggacattggtaaatgacgacagctgaaaaggaggaacccaa  
ggaaggggtggcttaatgaagaggcgtcgcagcttagctttgacgcttatgataattcac  
gatgaacgtcttcggatcaccagcccttattatgtcgagagcctctcctgcagttgctg  
cattgacagcgttgtggtagacgtcatctttattggacttggaaacccccagacacctta  
tattggccggattcacaataatcaccctctttgggtgatgtaatttttgacggcgttggc  
gtccttggccgattgcgcatttgggtgaaattcggcagaccgtctgggggtgagtgagg  
tgaaaaacttagcatccttgatggtggacttgccggagagttgaataagacagtgagga  
tgggggaacccatcggcgtggagctctcgagcgactcggatgtacgtcggcttgacgac  
agcccatggcaagtcccgaagcaactgcagaacttcatctttcggaatatcgcaccggg  
gataagtgaggaatatatttttggccggttagggcaaatgaattagagttccgtggcata  
attgaaaataaagccaggacaccagggggagtcctctcaaaaacctattttctggtgt  
gtcctggtgtcccatttataactaaaagcctctaggacaccaggggggtacgtggcggcc  
atccgtaaatatt

Sequência genômica DNA-A amostra #405

accggatggccgcgatTTTTTGGTgTcctctatcccaggcccaggcccaaacgcattta  
gttttaactgggaccacatacaacaactaaagctgaccaatcacatcaatgctgacgag  
gctatataactttgagcctacttggccgataagttgtggTccctatatattgaaagtaa  
ttgacattaattgatatctttaatttgaaatgcctaagcgagatgccccatggcgatta  
atggcggggacctccaaggtcagtcntaatgtcaattattcnccccgtggTggnccTaa  
aatanacaaggcctcttcatgggtgaacaggcccatgtacaggaagcccaggatctatc  
gcatgtatagaggccagatgttccgaagggatgtgaagggccttTgaaggtccagTca  
tacgagTctcgtcatgacgttTcccatgttgggaaagTgatatgtgtatccgacgtgac  
acggggcaatggTattacgcatcgtgtgggcaagcgttTctgCgtcaagTccgtgtaca  
ttctagggaaagatctggatggatgaaaccatcaagttgaagaaccacagaaTtagcgtc  
atgttctggTtggTgCgagatcgtcgaccatTggcactcctatggatTTTggccaagT  
gttcaacatgttCgacaacgaaccCagTacagccactgtgaagaacgatctccgCgatc  
gcttccaagTgatgcacaagTTTTacgCgaaggtcactggTggacaatTgCgagcaac  
gagcaggcgatcgtcaagcggTTTTggaaggtcaacaactatgtggTgtataaccacca  
agaggcagggaatacGagaatcatacagagaacgcgttactattgtacatggcatgta  
ctcatgcctctaattcctgtatTgCgacgtTgaaaattcggatctatTTTTatgattcG  
ataacaaatTaaTaaaaatTgaattttatttcatgattctcGagTacatcatTTacata  
tgagcGatcagttgCgaaacgaacagccctaattacatgattaagaccgacaacacca  
attgatctaaatacattaaaactaaatgcctgaatctactTaaataagTcatcccagaa  
gctcgaatcGatgtcgtccaaactTggaagttcaggaaagctTTgCgtagattcagTgc  
cctcctgaggtTgtaattgaaccggatctggatgtggTatatccggagcGacgtgtata  
tcgggtcctcGaccctgatgatctTgaaatagaggggattTggaacctcccaaataaaa  
acggaactctctgCctgagacgcagTgatgaaactcccggTgctTaaatccataatctg  
cacagTcGatTgggagaaatTggaacagccgcagTtcaagTcaatccgtcgtcGacgt  
atagctctcctctTggctactctgtgctgtgctTTgatagaggggggCgtggaggaaga  
TgaatttagcattctTgCgtgtccaagctctcagagatgcattctcctctTgtTgagg  
aagTctTataactagccccctcGcctggattgCacagcagattgatggTatcccgc  
TTaaattTgaaccggctTTccatattTacagTtggactgccagTccctTgggccccaa  
TcaactctTccaatgctTTaactTTagataatgCggagcGacatcatcaatgacgtTg  
TactccagTcattTgagTaaaccctagaattgaaatcGagatgcccactaagataatt  
atgtgggcctaaagctctagcccacatggTctTaccCGTtcGactatccccctcGacta  
cGatactaataggtctatctggccgCgcagcggcaccctTccaaaataatcatcagcc  
cactctTgcaaatcagacgggacattgtTaaatgacgacagctgaaatgggggaacca  
aggaaggggtggctTaaTaaagaggcGctcGacgttagctTTgacattatgataattca  
cGatgaacgtTTTcggatcaccagccctTattatgtcGagagcctctcctcGagTtGct  
gcatTaaacagcgtTgtggTgacgtcatctTattggactTggaaccCCCagacacctT  
atattTgCcgattcacaataatcaccctctTggTgatgTaatTTTgacggcgtTgg  
cgtcctTggccgattgCgcattTgggtgaaatTcggcagaccgtctggggTgagTgagg  
TgaaaaacctagcatcctTgatgtTggactTgccggagagTtgaataagancagTgga  
gatgggggaaccatcggcgtggagctccagctTTTgtTccctTtagTgagggTaaTT  
gCgCgtgTcGagcGactcggatgtacgtcggctTgacgacagaccatggcaagTcccG  
aagcaactgcagaactTcatctTcggaaatTcgcaccggggataagTgaggaatataT  
TTTTggcCgtgaggcGaaatgaattagggTccgtggcataattgaaaataaagccag  
gacaccagggggagTcctctTaaaacctatTTTTcgtggTgtcctggTgtccattTta  
TactaaaagcctctaggacaccagggggTacgtggcggccatccgTaaatatt

Sequência genômica DNA-A amostra #5093

accggatggccgcgatttttttgggtgcctctatcccggcccaggcccaaacgcatttag  
ttttatccgggaccacacacagcaaccaaagctgaccaatcacatcactgctgacgagg  
ctatataactttgggectacttggctgataagttgtggccctatatatttaaagtaat  
tgacattattcgatatctttaatttgaaatgcctaagcgagatgccccatggcgattaa  
tggcggggacctccaaggtcagtcgtaatgtcaattattcnccccgtgggtggctctaaa  
atanacaaggcctcttcatgggtgaacaggcccatgtacaggaagcccaggatctatcg  
catgtatagaggcccagatgttccgaagggatgtgaagggccttgaagggtccagtcac  
acgagtcctcgccatgacgtttcccatggtgggaaagtgatatgtgtatccgacgtgaca  
cggggcaatggtattacgcatcgtgtgggcaagcgtttttgcgtaagtctgtgtacat  
tctaggaagatctggatggatgagaccatcaagttgaagaaccacacgaatagcgtca  
tgttctggttgggtgagatcgtcgaccatatagctctcctatggattttggccaagtg  
ttcaacatggttcgacaacgaacccagtacagctaccgtgaagaacgatctccgagatcg  
cttccaagtgatgcacaagttttacgcgaaggctactgggtggacaatatgcgagcaacg  
agcaggcgatcgtcaagcgtttttggaagggtcaacaactatgtgggtgtataaccacaa  
gaggcagggaaatacgagaatcatacagagaacgcggttattattgtacatggcatgtac  
tcatgcctctaactcctgtatatgcgacggtgaaaattcggatctatttttatgattcga  
taacaaattaataaaaaattgaattttatttcatgattctcgagtacatcattacatat  
gagcgatcagttgcgaaacgaacagccctaattacatgattaagaccgacgacacccaa  
ttgatctaaatacattaaaactaaatgcctgaatctacttaataagtcatcccagaag  
ctcgaatcgatgctcgtccagacttggaaagtcaggaaagctttgcgtagattcagtgcc  
ctcctgaggttgaattgaacctgatttggatgtggatataccggagcgacgtgtatat  
cgggtcctcgaccctgatgatcttgaaatagaggggatttggaaacctccaaataaaaa  
cggaaattctctgcctgagacacagtgatgaactccccgggtgcttaaatccataatctgc  
acagtcaatatggagaaatatggaacagccgcagttcaagtcaatccgtcgtcgacgta  
tagctctcctcttggctattctgtgctgtgctttgatagaggggggctggaggaagat  
gaatttagcattcttgcgtgtccaagctctcaaagatgcattctcctctttggtgagga  
agtctttatagctagccccctcgctggattgcacagcagattgatggatcccgcct  
ttaatttgaaccggctttccatatttacagttggactgccagtcctttgggcccacat  
caactctttccagtgctttaactttagataatgcgagcgacatcatcaatgacgttgt  
actccacgtcattttgagtaaacctagaattgaaatcgagatgccactaagataatta  
tgtgggectaaagctctagcccacatgggtcttaccggttcgactatccccctcgactac  
gataactaataggtctatctggccgcgcagcggcacccttccaaaataatcatcagtc  
actcttgcaaatcagacgggacattgttaaatgacgacagctgaaatgggggaacccaa  
ggaaggggtggtttaataaagaggcgtcgcagcttagctttgacattatgataattcac  
gacgaacgtcttcggatcaccagcccttattatgtcgagagcctctcctgcagttgctg  
cattgacagcgttgtggtagacgtcatctttattggacttggaaacccccagacacttta  
tatttgccgattcacaataatcaccctctttgggtgatgtaatttttgacggcgtttgc  
gtccttggccgattgcgcatttgggtgaaattcggcagaccgtctgggggtgagtgagg  
tgaaaaacctagcatccttgatggtggacttgcggagagttgaataagancagtgagg  
atgggggaacccatcggcgtggagctctcgagcgactcggatgtacgtcggcttgacga  
cagccatggcaagtcccgaagcaactgcagaacttcatctttgggaatatcgacccgg  
ggataagtgaggaatataattttggccgttaggcgaaatgaattagagttccgtggcat  
aattgaaaatataagccaggacaccagggggagtcctctcaaaaacctatttttcgtgg  
tgtcctgggtgccatttataactaaaagcctctaggacaccaggggggtacgtggcggc  
catccgta

taatat

Sequência genômica DNA-A amostra #5082 clone 1

accggatggccgcgcttttttgggtgctcctctatcccggcccaggcccaaacgcatttag  
ttttatccgggaccacacacatcaactactgctgaccaatcacatcactgctgacgagg  
ctatataactttgggectacttggctgataagttgtggccctatatatttaaagtaat  
tgacattattcgatatctttaatttgaaatgcctaagcgagatgccccatggcgattaa  
tggcggggacctccaaggtcagtcgtaatgtcaattattcgccccgtggtggctctaaa  
atagacaaggcctcttcatgggtgaacaggcccatgtacaggaagcccaggatctatcg  
catgtatagaggcccagatgttccgaagggatgtgaagggccttgtaAggtccagtcac  
acgagtcctcgccatgacgtttcccatggtgggaaagtgatatgtgtatccgacgtgaca  
cggggcaatggtattacgcatcgtgtgggcaagcgtttctgcgtcaaatctgtgtacat  
tctaggaagatctggatggatgagaccatcaagttgaagaaccacacgaatagcgtaa  
tgttctggttgggtgagatcgtcgaccatatagctctcctatggattttggccaagtg  
ttcaacatggttcgacaacgaacccagtacagctaccgtgaagaacgatctccgagatcg  
cttccaagtgatgcacaagttttacgcgaaggtcactggtggacaatatgcgagcaacg  
agcagtcgatcgtcaagcgtttttggaaggtcaacaactatgtggtgtataaccaccaa  
gaggcagggaaatacgagaatcatacagagaacgcgttattattgtacatggcatgtac  
tcatgcctctaactcctgtatatgcgacggtgaaaattcggatctatttttatgattcga  
taacaaattaataaaaaattgaattttatctcatgattctcgagtacatcattacatat  
gagcgatcagttgcgaaacgaacagccctaattacatgattaagaccgactacacccaa  
ttgatctaaatacattaaaactaaatgcctgaatctacttaataagtcatcccagaag  
ctcgaatcgatgctcgtccagacttggaggtcaggaaagctttgcgtagattcagtgcc  
ctcctgaggttgaattgaaccggatctggatgtggtatatccggagcgacgtgtatat  
cgggtcctcgaccctgatgatcttgaaatagaggggatttggaacctcccaataaaaa  
cggaaattctctgcctgagacacagtgatgaactccccggtgcttaaatccataatctgc  
acagtcaatatggagaaatatggaacagccgcagttcaagtcaatccgtcgtcgacgta  
tagctctcctcttggctattctgtgctgtgctttgatagagggggcggtggaggaagat  
gaatttagcattcttgcgtgtccaagctctcaaagatgcattctcctcttggttgagga  
agtctttatagctagccccctcgctggattgcacagcagattgatggtatcccgcct  
ttaatttgaaccggctttccatatttacagttggactgccagtcctttgggcccacat  
caactctttccagtgctttaactttagataatgcgagcgacatcatcaatgacgttgt  
actccacgtcattttgagtaaacctagaattgaaatcgagatgccactaagataatta  
tgtgggectaaagctctagccacatggtcttaccggttcgactatccccctcgactac  
gatacctaataaggtctatctggcgcgcagcggcacccttccaaaataatcatcagtc  
actcttgcaaatcagacgggacattgttaaatgacgacagctgaaatgggggaacccaa  
ggaaggggtggtttaataaagaggcgtcgcagcttagctttgacattatgataattcac  
gatgaacgtcttcggatcaccagcccttattatgtcgagagcctctcctgcagttgctg  
cattgacagcgttgtggtagacgtcatctttattggacttggaaacccccagacacttta  
tatttgccgattcacaataatcacctctttgggtgatgtaatttttgacggcgttggc  
gtccttggccgattgcacatttgggtgaaattcggcagaccgtctgggggtgagtgagg  
tgaaaaacctagcatccttgaagttctgcagttgcttcgggacttgccatgggctgtcg  
tcaagccgacgtacatccgagtcgctcgagagctcTcgagcgactcggatgtacgtcgg  
cttgacgacagccatggcaagtcccgaagcaactgcagaacttcatctttgggaatat  
cgcaccggggataagtgaggaatatatttttggccgttaggcgaaatgaattagaattc  
cgtggcataaattgaaaatataagccaggacaccagggggagtcctctcaaaaacctatt  
tttcgtgggtgctcctggtgtccatttataactaaaagcctctaggacaccaggggggtac  
gtggcggccatccgtaTaatatt

Sequência genômica DNA-A amostra #5082 clone 3

accggatggccgcgcttttttgggtgctcctctatcccggcccaggcccaaacgcatttag  
ttttatccgggaccacacacatcaactactgctgaccaatcacatcactgctgacgagg  
ctatataactttgggectacttggctgataagttgtggccctatataatttaaagtaat  
tgacattattcgatatctttaatttgaaatgcctaagcgagatgccccatggcgattaa  
tggcggggacctcccagggtcagtcgtaatgtcaattattcgccccgtggtggctctaaa  
atagacaaggcctcttcatgggtgaacaggcccatgtacaggaagcccaggatctatcg  
catgtatagaggcccagatgttccgaaggggtgtgaagggccttgaagggtccagtcac  
acgagtcctcgccatgacgtttcccatggtgggaaagtgatatgtgtatccgacgtgaca  
cggggcaatggtattacgcatcgtgtgggcaagcgtttctgcgtcaaatctgtgtacat  
tctaggaagatctggatggatgagaccatcaagttgaagaaccacacgaatagcgtaa  
tgttctggttgggtgagatcgtcgaccatatagctctcctatggattttggccaagtg  
ttcaacatggttcgacaacgaacccagtcacagctaccgtgaagaacgatctccgcatcg  
cttccaagtgatgcacaagttttacgcgaaggtcactggtggacaatatgagagcaacg  
agcagtcgatcgtcaagcgtttttggaaggtcaacaactatgtggtgtataaccaccaa  
gaggcagggaaatacgagaatcatacagagaacgcgttattattgtacatggcatgtac  
tcatgcctctaactcctgtatatgcgacggtgaaaattcggatctatttttatgattcga  
taacaaattaataaaaaattgaattttatctcatgattctcgagtacatcattacatat  
gagcgatcagttgcgaaacgaacagccctaattacatgattaagaccgacgacacccaa  
ttgatctaaatacattaaaactaaatgcctgaatctacttaataagtcatcccagaag  
ctcgaatcgatgctcgtccagacttggaggtcaggaaagctttgcgtagattcagtgcc  
ctcctgaggttgaattgaaccggatctggatgtggtatatccggagcgacgtgtatat  
cgggtcctcgaccctgatgatcttgaaatagaggggatttggaacctcccaataaaaa  
cggaaattctctgcctgagacacagtgatgaactccccgggtgcttaaatccataatctgc  
acagtcfaatatggagaaatatggaacagccgcagttcaagtcfaatccgctcgtcgacgta  
tagctctcctcttggctattctgtgctgtgctttgatagagggggcggtggaggaagat  
gaatttagcattcttgcgtgtccaagctctcaaagatgcattctcctcttggttgagga  
agtctttatagctagccccctcgctggattgcacagcagatttatggtatcccgcct  
ttaatttgaaccggctttccatatttacagttggactgccagtcctttgggcccacat  
caactctttccagtgctttaactttagataatgaggagcgacatcatcaatgacgttgt  
actccacgtcattttgagtaaacctagaattgaaatcgagatgccactaagataatta  
tgtgggctaaagctctagcccacatggtcttaccggttcgactatccccctcgactac  
gataactaataggtctatctggccgcgcagcggcacccttccaaaataatcatcagtc  
actcttgcaaatcagacgggacattgttaaatgacgacagctgaaatgggggaacccaa  
ggaaggggtggtttaataaagaggcgtcgcagcttagctttgacattatgataattcac  
gatgaacgtcttcggatcaccagcccttattatgtcgagagcctctcctgcagttgctg  
cattgacagcgttgtggtagacgtcatctttattggacttggaaacccccagacacttta  
tatttgccgattcacataatcaccctcttgggtgatgtaatttttgacggcgttggc  
gtccttggccgattgcacatttgggtgaaattcggcagaccgtctgggggtgagtgagg  
tgaaaaacctagcatccttgatggtgacttgcggagagttgaataagacagtgagaga  
tgggggaacccatcggcgtggagctctcgagcgactcggatgtacgtcggcttgacgac  
agcccatggcaagtcccgaagcaactgcagaacttcatcttgggaatatcgcaccggg  
gataagtgaggaatatattttggccggttagggcaaatgaattagaattccgtggcata  
attgaaaataaagccaggacaccagggggagtcctctcaaaaacctatcttctggtggt  
gtcctggtgtccatttataactaaaagcctctaggacaccaggggggtacgtggcggcc  
atccgta**taaatatt**

Sequência genômica DNA-A amostra #5082 clone 4

accggatggccgcgcttttttgggtgctcctctatcccggcccaggcccaaacgcatttag  
ttttatccgggaccacacacatcaactactgctgaccaatcacatcactgctgacgagg  
ctatataactttgggectacttggctgataagttgtggccctatataatttaaagtaat  
tgacattattcgatatctttaatttgaaatgcctaagcgagatgccccatggcgattaa  
tggcggggacctccaaggtcagtcgtaatgtcaattattcgccccgtggtggctctaaa  
atagacaaggcctcttcatgggtgaacaggcccatgtacaggaagcccaggatctatcg  
catgtatagaggcccagatgttccgaagggAtgtgAagggccttgaaggtccagtcac  
acgagtcctcgccatgacgtttcccatggtgggaaagtgatatgtgtatccgacgtgaca  
cggggcaatggtattacgcatcgtgtgggcaagcgtttctgcgtcaaatctgtgtacat  
tctaggaagatctggatggatgagaccatcaagttgaagaaccacacgaatagcgtaa  
tgttctggttgggtgagatcgtcgaccatatagctctcctatggattttggccaagtg  
ttcaacatggttcgacaacgaacccagtacagctaccgtgaagaacgatctccgcgatcg  
cttccaagtgatgcacaagttttacgcgaaggtcactggtggacaatatgcgagcaacg  
agcagtcgatcgtcaagcgtttttggaaggtcaacaactatgtggtgtataaccaccaa  
gaggcagggaaatacgagaatcatacagagaacgcgttattattgtacatggcatgtac  
tcatgcctctaactcctgtatatgcgacggtgaaaattcggatctatttttatgattcga  
taacaaattaataaaaaattgaattttatctcatgattctcgagtacatcattacatat  
gagcgatcagttgcgaaacgaacagccctaattacatgattaagaccgacgacacccaa  
ttgatctaaatacattaaaactaaatgcctgaatctacttaataagtcatcccagaag  
ctcgaatcgatgctcgtccagacttggaggtcaggaaagctttgcgtagattcagtgcc  
ctcctgaggttgaattgaaccggatctggatgtggtatatccggagcgacgtgtatat  
cgggtcctcgaccctgatgatcttgaaatagaggggatttggaacctcccaataaaaa  
cggaaattctctgcctgagacacagtgatgaactccccggtgcttaaatccataatctgc  
acagtcaatatggagaaatatggaacagccgcagttcaagtcaatccgtcgtcgacgta  
tagctctcctcttggctattctgtgctgtgctttgatagaggggggctggaggaagat  
gaatttagcattcttgcgtgtccaagctctcaaagatgcattctcctcttggttgagga  
agtctttatagctagccccctcgctggattgcacagcagatttatggtatcccgcct  
ttaatttgaaccggctttccatatttacagttggactgccagtcctttgggcccacat  
caactctttccagtgctttaactttagataatgcgagcgacatcatcaatgacgttgt  
actccacgtcattttgagtaaacctagaattgaaatcgagatgccactaagataatta  
tgtgggectaaagctctagcccacatggtcttaccggttcgactatccccctcgactac  
gataactaataggtctatctggccgcgagcggcacccttccaaaataatcatcagtc  
actcttgcaaatcagacgggacattgttaaatgacgacagctgaaatgggggaacccaa  
ggaaggggtggtttaataaagaggcgtcgcagcttagctttgacattatgataattcac  
gatgaacgtcttcggatcaccagcccttattatgtcgagagcctctcctgcagttgctg  
cattgacagcgttgtggtagacgtcatctttattggacttggaaacccccagacacttta  
tatttgccgattcacataatcaccctcttgggtgatgtaatttttgacggcgttggc  
gtccttggccgattgcacatttgggtgaaattcggcagaccgtctgggggtgagtgagg  
tgaaaaacctagcatccttgatggtgacttgccggagagttgaataagacagtgagga  
tgggggaacccatcggcgtggagctcTcgagcgactcggatgtacgtcggcttgacgac  
agcccatggcaagtcccgaagcaactgcagaacttcatcttgggaatatcgcaccggg  
gataagtgaggaatatattttggccggttagggcaaatgaattagaattccgtggcata  
attgaaaataaagccaggacaccagggggagtcctctcaaaaacctattttctggtggt  
gtcctggtgtcccatttataactaaaagcctctaggacaccaggggggtacgtggcggcc  
atccgtaTaatatt

Sequência genômica DNA-A amostra #5818

accggatggccgcgatttttttgggtgtcctctatcccggcccaggcccaaacgcatttag  
ttttatctgggaccacacacagcaactaaagctgaccaataacatcactgctgacgagg  
ctatataactttgagcctacttggccgataagttgtggccctatataatttaaagtaat  
tgacattattcgatatctttaatttgaaatgcctaagcgagatgccccatggcgattaa  
tggcggggacctccaaggtcagtcgtaatgtcaattattcgccccgtggtggctctaaa  
atagacaaggcctcttcatgggtgaacaggcccatgtacaggaagcccaggatctatcg  
catgtatagaggcccagatgttccgaagggatgtgaagggccttgaagggtccagtcac  
acgagtcctcgtcatgacgtttctcatggtgggaaagtgatatgtgtatctgacgtgaca  
cggggcaatggtattacgcatcgtgtgggcaagcgattctgcgtcaagtctgtgtacat  
tctaggaagatctggatggatgagaccatcaagttgaagaaccacacgaatagcgtca  
tgttctggttgggtgagatcgtcgaccatatagctctcctatggattttgggtcaagtg  
ttcaacatggttcgacaacgaacccagtcacagccactgtgaagaacgatctccgcgatcg  
cttccaagtgatgcacaagttttacgcgaaggctcactgggtggacaatatgcgagcaatg  
agcaggcgatcgtcaagcgtttttggaagggtcaacaactatgtgggtgtataaccaccaa  
gaggcagggaaatacgagaatcatacggagaacgcgttactattgtacatggcatgtac  
tcatgcctctaactcctgtgtatgcgacggtgaaaattcggatataatttttatgattcga  
taacaaattaataaaaaattgaattttatctcatgattctcgagtacatcattacatat  
gagcgatcagttgcgaaacgaacagccctaattacatgattaagaccgacgacacccaa  
ttgatctaaatacattaaaactaaatgcctgaatctacttaataagtcatcccagaag  
ctcgaatcgatgtcgtccagacttggaggtcaggaaagctttgcgtagattcagtgcc  
ctcctgaggttgaattgaaccggatctggatgtggatataccggagcgacgtgtatat  
cgggtcctcgaccctgatgatcttgaaatagaggggatttggaacctcccaataaaaa  
cggaaattctctgcctgagacacagtgatgaactccccgggtgcttaaatccataatctgc  
acagtcgatatggagaaatatggaacagccgcagttcaagtcaatccgtcgtcgacgta  
tagctctcctcttggcagctcgggtgctgtgctttgatagaggggggctggaggaagat  
gaatttagcattcttgcgtgtccaagctctcaaagatgcattctcctcttggttgagga  
agtctttatagctagccccctcacctggattgcacagcagattgatggatcccgcct  
ttaatttgaaccggctttccatatttacagttggactgccagtcctttgggcccacat  
caactctttccaatgctttaactttagataatgcggagcgacatcatcaatgacgttgt  
actccacgtcattttgagtaaacctagaattgaaatcgagatgccactaagataatta  
tgtgggcctaaagctctagcccacatgggtcttaccggttcgactatccccctcgactac  
gataactaataggtctatctggccgcgcagcggcacccttccaaaataatcatcagccc  
actcttgcaaatcagacgggacattggtaaatgacgacagctgaaatggaggaacccaa  
ggaaggggtggcttaataaagaggcgtcgcagcttagctttgacattatgataattcac  
gatgaacgtcttcggatcaccagcccttattatgtcgagagcctctcctgcagttgctg  
cattgacagcgttgtggtagacgtcatctttattggacttggaaacccccagacacctta  
tatttgccggattcacaataatcacctctttgggtgatgtaatttttgacggcgttgggt  
gtccttggccgattgcgcatttgggtgaaattcggcagaccgtctgggggtgagtgagg  
tgaaaaacctagcatccttgatgttggacttgcggagagttgaataagacagtgagaga  
tgggggaacccatcggcgtgGagctctcgagcgactcggatgtacgtcggcttgacgac  
agtcctatggcaagtcgcaagcaactgcagaacttcatctttcggaatatcgcatcggg  
gataagtgaggaatatatttttggccggttagggcgaatgaattaggggtccggtggcata  
attgaaaataaagccaggacaccaggggtagtcctctcaaaaacctatttttcgtgggt  
gtcctggtgtcccatttataactaaaagcctctaggacaccaggggggtacgtggcggcc  
atccataTaatatt

Sequência genômica DNA-B amostra #3540

accggatggccgcgatttttttgggtgctcctctatccccggcccaggcccaaacgcattag  
ttttatccgggaccacacacagcaacaaaagctgaccaatcagactacgcgtgacgtgt  
ctatttaatacaacttacttgacaagttgtgggccctataaatgtagatgacaacgac  
agcacatcaactctttaatttgaattaagcccactttgtatggcgggagccttcagtcg  
ttgtggtcctcaaccacaaatcgaaataagctgtcgtcaagccgacgtacatccgagtc  
gctcgagagctccacgggtccaatcataaacgtggtacatagtctcgtaacccaaccga  
atgtgtggactgggttatttaaggacgatatggattggacctcatatcacatcatctcga  
taaccattgtatgaaatgtatacgactaagtatagacgtgggtgggtcatcctctaagcg  
acgagggattcacgacatccagcgtttaagcgtatgcagaatggaaaacggtccgact  
ggagacgtcgaccagcagtccttgtaaggcccatgacgatattaagtgagcggccca  
tgtatacatgaagatcaattcggcccagaatttgtattgggccataatatagctacgtc  
gacctatattagctaccctagtatgagtaagactgaaccgaaccgatcccgatcgtata  
tcaagttgagggcgtctacgctttaagggcactctgaaggtcgagcgtgtacacgtcgat  
gtcaacatgatcgggttcgaatccgaagatagaaggcgtattctctatggtcgttattgt  
cgaccgtaaacctcacttgggtccaactggatgccttcacacatttgatgaggtccttg  
gcgccaggatccatagtcatggtaatctaaccgtcagtccttctttgaaggatcggtac  
tacatccgccacgtattcagcgcgtcatatctgtcgagaaagacacgatgatggggat  
atagaagggtcgacgtgtttatctactaggcgttcttcttgctgggctacttttaagga  
tacggaacgagagtcatgtaatgggtgtatatgccaatataagcaagaacgccatattag  
tgtattattgctggatgtcggatcatatgtccaaggcatctacatttgtatcatttgac  
ctcgattatgtcggatgaccaataagaacatatttaacatgatataatcaaatagctac  
agcgtacatgcaaatgataaccacctcagtaattgaattaaataacttattatthaatc  
aagcgttttatttctgggaggaatacaattagtgttatacattcctgaacggttgacc  
taactatctcgttcagctgactcattgacatcgatatggtcgaatgtgttctctgagca  
gctattacggaagctgaatctcccgggtctaatacgggagtcacctagcctatttaactc  
ccgatatggataagcggcgtctcttatatctgaatccgcatctaattgggcctagtccta  
tactagatctgggtggcccatgattcaccaggctcttatttctattgggcctcgtagccca  
agtctcgatgatgatgcggatctaatacttctctcccatttgccgtagccacatg  
actgaagtcgatatccttatctgagaactgtttggacaggatcttgacagttggcgctc  
tgaacgggatatcaacggaatgttttgccgctcgataacttcagtttacccttgaacttc  
gcgaaatgcgtcctctgatggacgttcgagtcgcaaaccttataatataatttccaagg  
aattgggtccttgagtgagaagaatgaagatgaaaagtagtgagatctatggtacatc  
gtatggggaatgtccatgacgcctgcaaggactcattgtccgtcattctcttgctcgtga  
atctccactactaccgagcccagcattaattggcacttgttgccatactctattac  
gcaatggtcgatcttcatgcagctgcgtgagagtcgggctcctaattgagacgcgcttg  
aggggaactgtaagactatctcagttaggtcatgcatagctgatactcgtcacgatgt  
gactctatgtaattgaaagcgtcggcggatttactaactgagaccctccattatatt  
atggaaatttgcccgcgcagcggcacccttccccaaattgaacgactgagggaaatt  
gataggtgccaaccttatggaaggacgatatgcggtagcgataagaatttggggaaatt  
tcgaagatacgataagcctatgtgcagattatgatttaacggctgttaatctgagatg  
agaagtggaatttggccgatatgttcaactgaaggtctatataataggcagtcagat  
gcgatatgctacaggctgatggcaatttggtaaatataagccaggacaccagagggag  
cctctcaaaaacctattttctggtgtcctgggtgcccatttataactaaaagcctcag  
ggggacaccagggggcaaaagcggccatcctaLaatatt

Sequência genômica DNA-B amostra #5082 clone 7

accggatggccgcgattttttggtgtcctctatcccggcccaggcccaaacgcatttaa  
ttttgtccgggaccacacacagcaactaaagctgaccaatcagactgcgcgtagcgtgt  
ctatttaatacaacttacttgacaagttgtggccctataaatgtagatgacaacgac  
agcacatcagctctttaatttgaatttagccactttgtatggcgggagccttcagtcg  
ttgtggtcctcaaccacaattcgaataaagctgtcgtcaagccgacgtacatccgagtc  
gctcgagagctccacgggtccaatcataaacgtggtacatagtctcgtaacccaaccga  
atztatggactggttatttaaggacgatatggattggacctcatatcacatcatctcga  
taaccattttatgaaatgtatacgactaagtatagacgtggtgggtcatcttctaagcg  
acgaggttattcacgatatccagcgtttaagcgaatgcagaatggaaaacggtccgatt  
ggagacgtcgaccagcagtccttgtaaggcccacgacgatattaagtggacggccca  
tgtatacatgaagatcaattcggcccagaatttgtattgggccataatatagctacgtc  
gacctatattagctaccctagtatgtgtaagactgaaccgaaccgatctcgatcgtata  
ttaagttgagggcgtctacgctttaagggcactttgaaggtcgagcgtgtacacgtcgat  
gtcaacatgatcggttcgaatccaaagatagaaggcgtattctctatggcgttattgt  
cgaccgtaaacctcacttgggtccaactggatgccttcacacatttgatgagggtctttg  
gcgaggtaccacagtcattgtaaatctaaccgttagtccttctttgaaggatcggact  
acatccgcatgtattcaagcgcgtaatatctgtcgagaaagacacgatgatggtggat  
atagaagggtcgacgtgtttatctactaggcgttcttcttgctgggctacttttaagga  
tacggaacgagactcatgtaatgggtgtatatgccaataaagcaagaacgcatattag  
tgtattattgctggatgtcggatcacatgtctaaggcatctacatttgatcatttgac  
ctcgattatgtcggatgaccaataagaacatatttcacatgatattaatcaaatagcta  
cagcgtacatgcaaatgataacaacctcaataattgaattaataacgtattattta  
caagcgtttttatctgggaggaatacaattagtgtgatacattcctgaacggttgac  
ctaactatctcgttcagctgactcattgacatcgatatgttcgaatgtgttctctgagc  
agctattacggaagctgaatctcccgggtctaatacgggagttcctagtctatttaact  
cccgatatggataagcggcgtctctcacatctgaatccgcatctaaatggcccagtcct  
atgctggatctggtggcccatgattcaccaggccttatttcaattgggccttgtagccc  
aagtctcgatgatgatgcggatctaatacttctctcccatttgccgtagccacat  
gactgaagtcgatattcttctgaaaactgtttggacatgatcttgacagttggcgtc  
ctgaacgggatatacaacggaatgttttgccgtcgataacttcagtttacccttgaattt  
cgcgaaatgcgtcctctgatggacgttcgagtcgcaaaccttataatataattccaag  
gaattgggtctttgagtgagaagaatgaagatgaaaagtagtgagatctatgttacat  
cttatggggaatgtccatgacgcctgcaaggactcattgtccgtcattctcttgctcgtg  
aatctccactactaccgagcccagcattaattggcacttgttgccctgactctatta  
cgcaatggtcgatcttcatgcagctgcgtgagagtcgggctcctaattgagacgccgtt  
gatggaaattgtaagactatctcagttaggcgtgcgatagctgataactcgtcacgatg  
tgactctatgtaattgaaagcgtcggcggatcttaactaactgagaccctccattatat  
tatggttacttgcccgcgcagcggcacccttcccccaaatgaacgactgagggaaatt  
gataggtgccaattttatggaaggacgatatgcgttagcgataagaattggggaaatt  
tcgaagatacgataagtcctatgtgcagaatacgatataatctgccggtagtctgagatg  
agaagtggaatttgccgatatgttagctattgaaggtctatataataggcagtcagat  
gcgatatgctacaggatgatggcaattttgtaaatataagccaggacaccagggggagtc  
cctctctaaaacctattttctggtgtcctgggtgccatttataactaaaagcctcag  
ggggacaccagggggcaaaagcggccatcctaLaatatt

Sequência genômica DNA-B amostra #5082 clone 12

accggatggccgcgattttttggtgtcctctatcccggcccaggcccaaacgcatttaa  
ttttgtccgggaccacacacagcaactaaagctgaccaatcagactgcgcgtagcgtgt  
ctatttaatacaacttacttgacaagttgtggccctataaatgtagatgacaacgac  
agcacatcagctctttaatttgaatttagccactttgtatggcgggagccttcagtcg  
ttgtggcctcaaccacaattcgaataaagctgtcgtcaagccgacgtacatccgagtc  
gctcgagagctccacgggtccaatcataaacgtggtacatagtctcgtaaccaaccga  
atztatggactggttatttaaggacgatatggattggacctcatatcacatcatctcga  
taaccattttatgaaatgtatacgactaagtatagacgtgggtgggtcatcttctaagcg  
acgaggttattcacgatatccagcgtttaagcgaatgcagaatggaaaacggtccgatt  
ggagacgtcgaccagcagtccttgtaaggcccacgacgatattaagtggacggcccaa  
tgtatacatgaagatcaattcggcccagaatttgtattgggccataatatagctacgtc  
gacctatattagctaccctagtatgtgtaagactgaaccgaaccgatctcgatcgtata  
ttaagttgagggcgtctacgctttaagggcactctgaaggtcgagcgtgtacacgtcgat  
gtcaacatgatcggttcgaatccaaagatagaaggcgtattctctatggtcgttattgt  
cgaccgtaaacctcacttgggtccaactggatgccttcacacatttgatgaggtccttg  
gcgcaaggatccacagtcattgtaataaccggttagtccttcttgaaggatcggtac  
tacatccgccatgtattcaagcgcgtaatatctgtcgagaaagacacgatgatgggtgga  
tatagaagggtcgacgtgtttatctactaggcgttcttcttgctgggctacttttaagg  
atacggaacgagactcatgtaatgggtgtatatgcgaatataagcaagaacgccatatta  
gtgtattattgctggatgtcggatcacatgtctaaggcatctacatttgtatcatttga  
cctcgattatgtcggatgaccaataagaacatatttcacatgatattaatcaaatagct  
acagcgtacatgcaaatgataacaacctcaataattgaattaaataacgtattatttaa  
tcaagcgttttatttctgggaggaatacaattagtgctgatacattcctgaacggttga  
cctaactatctcgttcagctgactcattgacatcgatatgttcgaatgtgttctctgag  
cagctattacggaagctgaatctcccgggtctaatacgggagttcctagtctatttaac  
tcccgatatggataagcggcgtctctcacatctgaatccgcatctaaatggcccagtc  
tatgctggatctgggtggcccatgattcaccaggccttatttcaattgggccttgtagcc  
caagtctcgatgatgatgcggatctaatacttctctcccatttggcgtagcccaca  
tgactgaagtcgatatccttatctgaaaactggttggacaggatcttgacagttggcgc  
tctgaacgggatatacaacggaatgttttgccgtcgataacttcagtttacccttgaatt  
tcgcaaatgcgtcctctgatggacgttcgagtcgcaaaccttataatataatttccaa  
ggaattgggtctttgagtgagaagaatgaagatgaaaagtagtgagatctatgttaca  
tcttatggggaatgtccatgacgcctgcaaggactcattgtccgtcattctcttgcgt  
gaatctccactactaccgagcccgacgcattaattggcacttgttgectgactctatt  
acgcaatgggtcgatcttcatgcagctgcgtgagagtcgggctcctaattgagacgcctg  
tgatggaaattgtaagactatctcagttaggctcgtgcgatagctgatactcgtcacgat  
gtgactctatgtaattgaaagcgtcggcggatttactaactgagaccctccattata  
ttatggttacttgcccgcgcagcggcacccttccccaaatgaacgactgagggaaat  
tgataggtgccaattttatggaaggacgatatgcgttagcgataagaatttggggaaat  
ttcgaagatcgataagtctatgtgcagaatacgatataatctgccggtagtctgagat  
gaagaagtggaaatttgccgatatgtttagctattgaaggtctatatatagggcagtcaga  
tgcgatagctacaggatgatggcaatttgtaaatataagccaggacaccagggggag  
tcctctctaaaacctattttctgtggtgtcctgggtgctccatttataactaaaagcctca  
gggggacaccagggggcaaaagcggccatcctaataatatt