

JOSIANE GONÇALVES AMARAL

ESTUDO DA TRANSMISSÃO DE BEGOMOVÍRUS VIA SEMENTE EM *Sida spp*

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Genética e Melhoramento, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2016

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

A485e
2016
Amaral, Josiane Gonçalves, 1989-
Estudos da transmissão de begomovírus via semente em *Sida* spp /
Josiane Gonçalves Amaral. - Viçosa, MG, 2016.
ix, 39f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Francisco Murilo Zerbini Júnior.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.30-39.

1. Vírus em planta. 2. Sementes. 3. *Begomovirus*. 4. *Sida acuta*.
5. *Sida rhombifolia*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Fitopatologia. Programa de Pós-graduação em Genética e
Melhoramento. II. Título.

CDD 22. ed. 571.92

JOSIANE GONÇALVES AMARAL

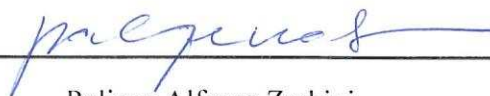
ESTUDO DA TRANSMISSÃO DE BEGOMOVÍRUS VIA SEMENTE EM *Sida spp*

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Genética e Melhoramento, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 22 de março de 2016.



Claudine Márcia Carvalho



Poliane Alfenas Zerbini



Francisco Murilo Zerbini Júnior
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar em meu caminho, iluminando e permitindo a conquista em tudo que me proponho a fazer com carinho e afeição;

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade de realização deste curso;

Ao Professor Francisco Murilo Zerbini, pelo suporte profissional, orientação, dedicação e amizade durante a realização deste trabalho;

Ao funcionário Sr. Paulo pela simpatia e gentileza durante este tempo;

À técnica de laboratório Patrícia pela positividade, ternura e presteza;

Aos eternos amigos do Laboratório de Virologia Vegetal Molecular, Angélica, Camila, Carol, César, Glória, Hermano, Igor, João Paulo, Laíse, Márcio, Marcos, Rafaela, Adriana, Diogo, Gabriela, Murilo, Roberta, Sarah, Silvia, Tarsiane, Ana Paula, André, Fernanda, Fernandinha, Flávia, Rafael e em especialmente as queridas Talita e Larissa pela amizade, companheirismo e aconchego por sempre fazerem o bem a todos que as rodeiam, por fazerem essa jornada ser tão mais doce e serena,

Aos amigos de longa data Aline, Dalton, Danielle, Franklin, Guilherme e Gustavo pelos anos de amizade, momentos de descontração, incentivo, pelas muitas histórias vividas em Viçosa, sem vocês o caminho seria muito mais árduo;

Aos queridos Fernanda, Santiago, Daniele e Aline pela amizade e companheirismo durante esses anos;

Aos meus tios e tias, Cibele, Cláudio, Paulo, Ana, Luiz, Cidinha, Fernando e meus respectivos primos e primas por serem essa minha família maravilhosa;

Aos meus avós, Angelina (in memorian), Belostre (in memorian), João (in memorian) e Efigênia pelo carinho, amor e por me acolher sempre que precisei;

Ao meu namorado Alan, por acreditar em mim, pelo amor, amizade e ser meu companheiro em todos os momentos, tanto bons quanto ruins, estando sempre ao meu lado me passando tranquilidade;

Às minhas irmãs, Daniela e Mariana, por acreditarem em mim e estarem serem presentes ao longo de minha vida;

Ao meu sobrinho e afilhado Miguel, por trazer muita felicidade e pureza para nossa família;

Aos meus pais, Evilásio e Ana, por acreditarem em mim, pelo suporte em todos os momentos, pelo incentivo constante, pelo amor, compreensão, atenção e por me ensinarem seus valores que me guiam durante toda minha vida;

À Capes pelo incentivo financeiro possibilitando a realização desse projeto;

A todos que ajudaram e apoiaram durante esses anos e contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Josiane Gonçalves Amaral, filha de Ana Aparecida Gonçalves Amaral e Evilásio Silvestre do Amaral, nasceu em 26 de fevereiro de 1989, em Tocantins, Minas Gerais.

Em 2009, ingressou no curso de graduação em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), campus Viçosa-MG, vindo a graduar-se em março de 2014. Neste mesmo mês, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da UFV, defendendo sua dissertação em março de 2016.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Família <i>Geminiviridae</i>	5
2.2. Gênero <i>Begomovirus</i>	6
2.3. Aspectos gerais da transmissão dos begomovírus	8
2.4. Aspectos gerais da transmissão de vírus de plantas via semente	11
2.5. Transmissão de begomovírus via semente.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Coleta de amostras	19
3.2. Clonagem e sequenciamento dos genomas virais	19
3.3. Identificação viral	20
3.4. Extração de DNA a partir de tecidos da semente.....	20
3.5. Extração de DNA a partir de tecidos florais	20
3.6. Detecção viral em plântulas	21
4. RESULTADOS.....	21
4.1. Detecção, clonagem e identificação viral a partir de plantas de <i>Sida acuta</i> e <i>Sida rhombifolia</i>	21
4.2. Teste de inibição da <i>Taq</i> DNA polimerase por compostos presentes nas sementes de <i>Sida</i> spp.....	22
4.3. Detecção de SiYLCV e SiYMV em sementes de <i>Sida</i> spp.	233
4.4. Detecção de SiYLCV e SiYMV em tecidos florais de <i>Sida</i> spp.....	26
4.5. Detecção de SiYLCV e SiYMV em plântulas de <i>Sida</i> spp.....	27
5. DISCUSSÃO	27
6. LITERATURA CITADA	30

RESUMO

AMARAL, Josiane Gonçalves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2016. **Estudo da transmissão de begomovírus via semente em *Sida* spp.** Orientador: Francisco Murilo Zerbini Júnior.

A família *Geminiviridae* é composta por vírus com genoma de DNA circular de fita simples, encapsidado por uma única proteína estrutural em partículas icosaédricas geminadas. A família é dividida em sete gêneros com base no tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros, organização genômica e relacionamento filogenético. Os vírus pertencentes ao gênero *Begomovirus* possuem um ou dois componentes genômicos e são transmitidos pela mosca-branca *Bemisia tabaci* a plantas dicotiledôneas. Os begomovírus infectam naturalmente diversas espécies de plantas não-cultivadas, como *Sida* spp. e *Macroptilium* spp. Estes hospedeiros não-cultivados podem abrigar populações virais com uma maior diversidade genética. Entretanto, algumas populações virais parecem estar confinadas em determinadas espécies de plantas não-cultivadas. Com base na observação de plantas não-cultivadas emergindo no campo com sintomas de infecção por begomovírus, aparentemente na ausência do inseto vetor, e em relatos recentes de transmissão de begomovírus via semente em batata-doce, feijoeiro e tomateiro, este estudo teve como objetivo analisar a presença de begomovírus em sementes de *Sida acuta* e *Sida rhombifolia*, bem como a transmissão desses vírus via semente. Um total de 39 plantas dessas duas espécies, apresentando sintomas típicos da infecção por begomovírus, foram coletadas em Viçosa, MG, em dezembro de 2013, e transferidas para casa-de-vegetação. A infecção viral foi confirmada em 38 plantas por meio de extração de DNA total de tecido foliar seguido de amplificação por círculo rolante (*rolling-circle amplification*, RCA). Os produtos da amplificação foram clonados e sequenciados, confirmando-se

a infecção pelo *Sida yellow mosaic virus* (SiYMV) nas plantas de *S. rhombifolia* e pelo *Sida yellow leaf curl virus* (SiYLCV) nas plantas de *S. acuta*. Aproximadamente 320 mil sementes foram coletadas das 38 plantas infectadas. As sementes foram tratadas superficialmente com hipoclorito de sódio ou com ácido sulfúrico e foram maceradas em grupos de 20, 30 ou 200 sementes. O DNA total extraído de aproximadamente 80 mil sementes foi utilizado para detecção viral via RCA, com resultados negativos. DNA total foi extraído também de flores inteiras e de tecidos florais (sépalas, pétalas, estames, estiletos e ovários) das plantas infectadas, e utilizado para detecção viral com resultados positivos em todos os casos. Sementes proveniente das plantas infectadas foram tratadas com ácido sulfúrico, germinadas e 269 plântulas provenientes dessas sementes foram avaliadas para a presença dos vírus via RCA e PCR, com resultados negativos. Em conjunto, os resultados indicam que o SiYMV e o SiYLCV são capazes de infectar os tecidos florais de *Sida rhombifolia* e de *Sida acuta*, respectivamente, entretanto não são transmitidos pelas sementes desses hospedeiros.

ABSTRACT

AMARAL, Josiane Gonçalves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2016. **Studies on begomovirus transmission via seed in *Sida* spp.** Advisor: Francisco Murilo Zerbini Júnior.

The family *Geminiviridae* is comprised of viruses with a circular, single-stranded DNA genome encapsidated by a single structural protein in geminate, icosahedral particles. The family is divided into seven genera based on the type of insect vector, host range, genomic organization and phylogeny. Viruses classified in the genus *Begomovirus* have one or two genomic components and are transmitted in nature by the whitefly *Bemisia tabaci* to dicot plants. Begomoviruses naturally infect several non-cultivated hosts, such as *Sida* spp. and *Macroptilium* spp. These non-cultivated hosts may harbor viral populations with a high degree of genetic diversity. Nevertheless, some viral populations seem to be confined to certain species of non-cultivated plants. Based on the observation of non-cultivated plants newly emerged in the field already showing symptoms of begomovirus infection, apparently in the absence of the insect vector, and on recent reports of seed transmission of begomoviruses in sweet potato, bean and tomato, the objective of this study was to analyze the presence of begomoviruses in seeds of *Sida acuta* and *Sida rhombifolia*, as well as the transmission of these viruses by seed. A total of 39 plants of these two species, displaying typical symptoms of infection by begomoviruses, were collected in Viçosa, MG, on December 2013, and transferred to a greenhouse. Viral infection was confirmed in 38 of these plants by total DNA extraction followed by rolling-circle amplification (RCA) of complete viral genomes. Amplification products were cloned and sequenced, confirming infection of *S. rhombifolia* by *Sida yellow mosaic virus* (SiYMV) and of *S. acuta* by *Sida yellow leaf curl virus* (SiYLCV).

Approximately 320,000 seeds were collected from the 38 infected plants. The seeds were surface-sterilized with sodium hypochloride or sulphuric acid, and were ground in groups of 20, 30 or 200 seeds. Total DNA extracted from approximately 80,000 seeds was used for viral detection by RCA, with negative results. Total DNA was also extracted from whole flowers and from flower tissues (sepals, petals, stamens, styles and ovaries) from infected plants and used for viral detection, with positive results in all cases. Seeds from infected plants were treated with sulphuric acid, germinated and 269 plantlets from these seeds were evaluated for the presence of virus by RCA and PCR, with negative results. Together, these results indicate that SiYMV and SiYLCV are capable of infecting the flower tissues of *Sida rhombifolia* and *Sida acuta*, respectively, however they are not transmitted by seeds in these hosts.

1. INTRODUÇÃO

A família *Geminiviridae* é composta por vírus com genoma de DNA de fita simples circular, envolto por um único tipo de proteína capsidial que confere à partícula uma morfologia icosaédrica geminada (Brown *et al.*, 2012; Kothandaraman *et al.*, 2015). A família é dividida em sete gêneros (*Begomovirus*, *Becurtovirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus*), definidos com base no tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros, relacionamento filogenético e organização genômica (Brown *et al.*, 2012; Varsani *et al.*, 2014).

O gênero *Begomovirus* inclui vírus de plantas de grande relevância para a agricultura, devido à severidade das doenças por eles causadas em diversas culturas de grande importância econômica, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Were *et al.*, 2004; Morales, 2006; Sattar *et al.*, 2013; Leke *et al.*, 2015). Esses vírus possuem um ou dois componentes genômicos e infectam plantas dicotiledôneas. Com base em estudos filogenéticos e características do genoma, os begomovírus podem ser divididos em dois grupos: Velho Mundo (Europa, África e Ásia) e Novo Mundo (Américas) (Rybicki, 1994; Padidam *et al.*, 1999; Paximadis *et al.*, 1999; Briddon *et al.*, 2010). A maioria dos begomovírus do Velho Mundo são monossegmentados e estão normalmente associados a DNAs satélites (alfa- e betassatélites) (Mansoor *et al.*, 2003). Os begomovírus encontrados no Novo Mundo são bissegmentados, com exceção do *Tomato leaf deformation virus* (ToLDeV), relatado no Peru e no Equador (Melgarejo *et al.*, 2013; Sanchez-Campos *et al.*, 2013). Os dois componentes genômicos dos begomovírus bissegmentados são denominados DNA-A (que contém genes envolvidos na replicação, supressão de respostas de defesa da planta e encapsidação do genoma viral) e DNA-B (que contém

genes envolvidos no movimento viral intra- e intercelular e na supressão de respostas de defesa da planta) (Rojas *et al.*, 2005; Zorzatto *et al.*, 2015).

Relatos recentes da detecção e caracterização de novas espécies de begomovírus em plantas não-cultivadas (Castillo-Urquiza *et al.*, 2008; Fiallo-Olivé *et al.*, 2010; Fiallo-Olivé *et al.*, 2012; Tavares *et al.*, 2012; Fiallo-Olivé *et al.*, 2015; Pinto *et al.*, 2015) sugerem que a diversidade genética dos begomovírus são muito maiores do que se acreditava, e ressaltam a necessidade de se investigar plantas não-cultivadas como um reservatório de diversidade viral e como uma fonte de novos vírus que podem causar doenças em plantas cultivadas.

Uma análise comparativa de populações de begomovírus encontradas em plantas cultivadas e não-cultivadas indicou que as populações virais infectando plantas não-cultivadas apresentam um grau de variabilidade genética mais elevado em comparação àquelas presentes em plantas cultivadas (Lima *et al.*, 2013; Rocha *et al.*, 2013; Ramos-Sobrinho *et al.*, 2014). Rocha *et al.* (2013) também observaram que as populações brasileiras de begomovírus são altamente recombinantes, possuem uma elevada taxa de evolução molecular e são estruturadas com base em localização geográfica. Os resultados destes estudos apoiam a hipótese de que os begomovírus encontrados em plantas cultivadas como o tomateiro e o feijoeiro são originados de vírus nativos presentes em plantas não-cultivadas, e que após a transferência para plantas cultivadas as populações virais evoluem rapidamente, originando novas espécies mais adaptadas ao novo hospedeiro (Rocha *et al.*, 2013).

Lima *et al.* (2013) compararam populações dos begomovírus *Macrotidium yellow spot virus* (MaYSV) e *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), provenientes de plantas não-cultivadas e cultivadas, respectivamente, e sugeriram que a recombinação, e não a seleção adaptativa, explica a maior variabilidade de

begomovírus em hospedeiros não-cultivados. A presença de diversas espécies no campo, todas transmitidas pelo mesmo inseto vetor, torna comum a ocorrência de infecções mistas, com dois ou mais vírus presentes simultaneamente na mesma planta, aumentando a probabilidade da ocorrência de eventos de recombinação que podem levar ao surgimento de novas espécies melhor adaptadas ao hospedeiro (Pita *et al.*, 2001; Monci *et al.*, 2002; Andrade *et al.*, 2006; Inoue-Nagata *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007).

Espécies de plantas invasoras das famílias Asteraceae (*Blainvillea rhomboidea*), Caparaceae (*Cleome affinis*), Euphorbiaceae (*Cnidoscolus urens*, *Euphorbia heterophylla*), Fabaceae (*Crotalaria* sp., *Macroptilium lathyroides*, *Desmodium* sp.), Labiatae (*Leonurus sibiricus*), Malvaceae (*Herissantia crispa*, *Melochia* sp., *Pavonia* sp., *Sida rhombifolia*, *S. acuta*, *S. micrantha*, *S. spinosa*, *S. urens*), Solanaceae (*Nicandra physaloides*, *Solanum nigrum*) e Sterculiaceae (*Waltheria indica* e *Triumfetta semitriloba*) já foram relatadas como hospedeiras de begomovírus no Brasil (Faria e Maxwell, 1999; Assunção *et al.*, 2006; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008; Tavares *et al.*, 2012; Barreto *et al.*, 2013; Fiallo-Olivé *et al.*, 2015; Pinto *et al.*, 2015). Os estudos realizados no Brasil e em outros países indicam uma elevada diversidade de espécies de begomovírus em plantas não-cultivadas, principalmente em espécies de *Sida* e *Macroptilium* (Frischmuth *et al.*, 1997; Roye *et al.*, 1997; Idris *et al.*, 2003; Jovel *et al.*, 2004; Amarakoon *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2012; Tavares *et al.*, 2012). Algumas dessas espécies virais também infectam plantas cultivadas como o feijoeiro e o tomateiro (Barreto *et al.*, 2013; Rocha *et al.*, 2013). Begomovírus originalmente descritos em plantas de *Sida* sp., como o *Sida mottle virus* (SiMoV) (Fernandes *et al.*, 1999) e o *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV) (Jovel *et al.*, 2004), por exemplo, já foram encontrados infectando naturalmente o

tomateiro (Calegario, 2004; Castillo-Urquiza *et al.*, 2007; Cotrim *et al.*, 2007). Estes relatos reforçam o papel de plantas não-cultivadas como reservatórios de vírus e a importância de se caracterizar os begomovírus infectando estes hospedeiros.

Os begomovírus são transmitidos naturalmente pela mosca-branca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) de modo persistente circulativo (Ghanim *et al.*, 2007; Gilbertson *et al.*, 2015). Até recentemente, sempre foi suposto que esses vírus não são transmitidos via semente (Rojas *et al.*, 2005; Gilbertson *et al.*, 2015). Entretanto, relatos publicados nos últimos 12 meses demonstram que a transmissão de begomovírus pode ocorrer via semente nas culturas da batata-doce (Kim *et al.*, 2015), feijoeiro (Kothandaraman *et al.*, 2015) e tomateiro (Kil *et al.*, 2016).

A transmissão de vírus pela semente, mesmo a taxas muito baixas, é importante para a propagação e disseminação do vírus a longa distância. A transmissão via semente de um vírus proporciona uma fonte de inóculo primário e pode ter um considerável impacto sobre o rendimento da cultura (Ali e Kobayashi, 2010).

Em viagens ao campo para coleta de amostras, nosso grupo de pesquisa frequentemente observa plantas não-cultivadas emergindo já infectadas por begomovírus, aparentemente sem a presença do inseto vetor. Somado aos relatos recentes de transmissão via semente de begomovírus em plantas cultivadas (Kim *et al.*, 2015; Kothandaraman *et al.*, 2015; Kil *et al.*, 2016), essas observações de campo sugerem a possibilidade de transmissão via semente também em plantas não-cultivadas. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a transmissão de begomovírus pelas sementes de *Sida acuta* e *Sida rhombifolia* (família Malvaceae).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Família *Geminiviridae*

Os vírus classificados na família *Geminiviridae* causam doenças relevantes para a produção agrícola nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, afetando severamente culturas como o algodoeiro, as cucurbitáceas, o feijoeiro, a mandioca, o milho, o pimentão e o tomateiro (Legg e Fauquet, 2004; Morales, 2006; Martin e Shepherd, 2009; Rocha *et al.*, 2013; Sattar *et al.*, 2013). O aumento global da população e distribuição dos insetos vetores, a expansão do cultivo em monocultura e a ocorrência de um maior trânsito global de plantas são considerados os principais fatores que facilitaram a emergência dos geminivírus (Rojas *et al.*, 2005; Navas-Castillo *et al.*, 2011; Gilbertson *et al.*, 2015). O rápido progresso obtido nos estudos com esses vírus foi devido a três atributos principais: (i) possuem genoma pequeno (2,5-5,0 kb); (ii) se replicam por meio de um intermediário de fita dupla de DNA (dsDNA), facilmente manipulado por métodos padrão de clonagem; (iii) serem transmissíveis por métodos de inoculação independentes do inseto vetor (Rojas *et al.*, 2005).

A família é composta pelos gêneros *Begomovirus*, *Becurtovirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus*, definidos com base no tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros, relacionamento filogenético e organização genômica (Brown *et al.*, 2012; Varsani *et al.*, 2014). Os geminivírus possuem genoma composto de DNA fita simples circular envolto por um único tipo de proteína capsidial, e a partícula possui morfologia icosaédrica geminada (Brown *et al.*, 2012). A proteína capsidial é conservada em sua capacidade para formar os vírions, porém é divergente quanto à especificidade pelo inseto vetor (cigarrinhas ou mosca-branca) (Rojas *et al.*, 2005). A replicação ocorre pelo mecanismo de círculo

rolante (Stenger *et al.*, 1991). Todos os geminivírus possuem uma região intergênica que contém diversos elementos de sequência altamente conservados, incluindo uma estrutura em forma de grampo contendo uma sequência de nove nucleotídeos (5'-TAATATTAC-3') que constitui a origem de replicação, e repetições diretas e invertidas de quatro ou cinco nucleotídeos, denominadas iterons, essenciais para que a origem seja reconhecida pela proteína viral associada à replicação (Rojas *et al.*, 2005; Rizvi *et al.*, 2015).

2.2. Gênero *Begomovirus*

O gênero *Begomovirus* é o que possui o maior número de espécies dentro da família *Geminiviridae*, incluindo vírus de grande relevância para a agricultura devido à severidade das doenças por eles causadas em diversas culturas de grande importância econômica (Brown *et al.*, 2015). A espécie-tipo é o *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) (Brown *et al.*, 2012).

Com base em estudos filogenéticos e características do genoma, os begomovírus podem ser divididos em dois grupos: Velho Mundo (Europa, África e Ásia) e Novo Mundo (as Américas) (Rybicki, 1994; Padidam *et al.*, 1999; Paximadis *et al.*, 1999; Briddon *et al.*, 2010).

A maioria dos begomovírus do Velho Mundo são monossegmentados e estão associados a DNAs satélites (alfa- e betassatélites) (Mansoor *et al.*, 2003; Zhou, 2013). Os begomovírus nativos do Novo Mundo são bissegmentados (Figura 1), com exceção do *Tomato leaf deformation virus* (ToLDeV), descrito recentemente no Peru e Equador (Melgarejo *et al.*, 2013). O *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), um vírus monossegmentado nativo do Velho Mundo, foi introduzido na República Dominicana no início da década de 1990 e atualmente encontra-se presente em toda

América Central, Caribe e em diversos estados do sul e sudoeste dos Estados Unidos (Nahkla *et al.*, 1994; Duffy e Holmes, 2007).

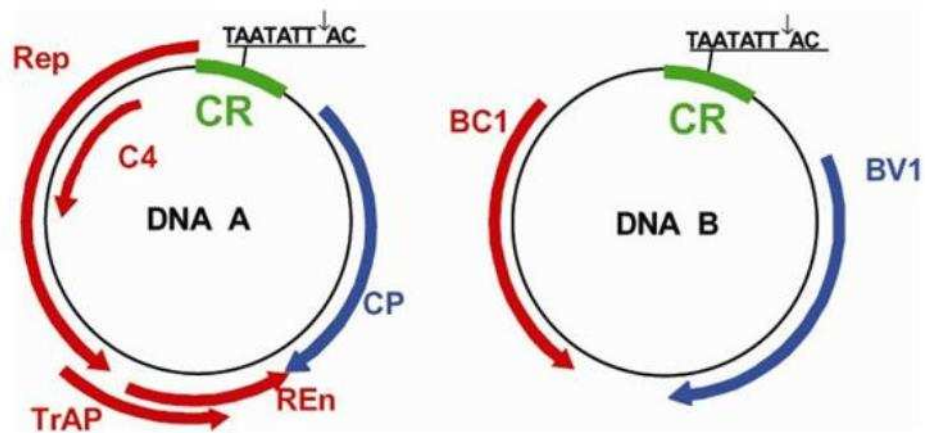


Figura 1. Representação esquemática do genoma do *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV), espécie-tipo do gênero *Begomovirus*. Os círculos representam o genoma viral, com dois componentes (DNA-A e DNA-B) de aproximadamente 2.600 nucleotídeos cada. Uma sequência de aproximadamente 200 nucleotídeos, denominada região comum (CR), contém a origem de replicação viral, com uma estrutura em forma de grampo e uma sequência invariável de nove nucleotídeos (TAATATT↓AC), conservada em todos os membros da família *Geminiviridae* (a seta indica o sítio de início da replicação do DNA viral por círculo rolante). As setas azuis e vermelhas indicam os genes virais e a direção em que ocorre a transcrição (viral e complementar, respectivamente). Reproduzido de Gutierrez *et al.* (2004).

O DNA-A dos begomovírus do Novo Mundo contém cinco genes: *Rep*, que codifica a única proteína essencial à replicação, iniciadora do mecanismo de replicação por círculo rolante (Fontes *et al.*, 1992; Orozco *et al.*, 1997); *Trap*, que codifica um fator transcricional dos genes *CP* e *NSP*, e que também atua como supressora do silenciamento gênico (Voinnet *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2005); *Ren*, que codifica um fator acessório (não essencial) da replicação viral (Sunter *et al.*, 1990; Pedersen e Hanley-Bowdoin, 1994); *AC4*, que codifica uma proteína também

envolvida na supressão de silenciamento gênico (Vanitharani *et al.*, 2004); e *CP*, que codifica a proteína capsidial, essencial para a transmissão do vírus pelo inseto vetor (Bridson *et al.*, 1990; Hofer *et al.*, 1997). O DNA-B contém dois genes: *NSP*, que codifica a proteína responsável pelo transporte do DNA através do envelope nuclear (Noueiry *et al.*, 1994; Sanderfoot e Lazarowitz, 1996), e *MP*, que codifica a proteína envolvida no movimento célula-a-célula do vírus por meio do aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas (Noueiry *et al.*, 1994).

2.3. Aspectos gerais da transmissão dos begomovírus

Os vírus de plantas podem ser disseminados de forma vertical (multiplicação vegetativa ou reprodução sexual) ou horizontal (mediada por vetores).

A mosca-branca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) é um inseto que causa enormes danos a plantios agrícolas e em culturas ornamentais, devido ao seu hábito alimentício polífago e pelo fato de transmitir diversas espécies de vírus, incluindo os begomovírus (Stansly e Naranjo, 2010; Brown *et al.*, 2015; Ghanim e Czosnek, 2016). A espécie foi descrita em 1889 como uma praga do tabaco na Grécia, com o nome de *Aleyrodes tabaci* (Gennadius, 1889). Foi relatada pela primeira vez como uma praga que causava sérios níveis de perdas na década de 1920, no norte da Índia (Misra e Lamba, 1929). Em 1957 o nome foi modificado para *Bemisia tabaci* (Russell, 1957). Atualmente é distribuída globalmente, com exceção da Antártida (Martin *et al.*, 2000). Devido ao fato de se alimentarem de seiva, esses insetos reduzem o vigor e a produtividade de plantas adultas e podem causar a morte de plantas jovens (Ghanim e Czosnek, 2016).

Atualmente é reconhecido que *B. tabaci* constitui um complexo de pelo menos 24 espécies crípticas (De Barro *et al.*, 2011). A sequência do gene que

codifica a citocromo oxidase I mitocondrial (*mtCOI*) é utilizada para definir a separação genética entre as espécies (Dinsdale *et al.*, 2010). Esses autores identificaram um "vale" na frequência da distribuição das divergências par-a-par das sequências do gene *mtCOI* em 3,5%, e propuseram que este valor fosse adotado como limiar para a separação das populações em espécies. Com base nesse critério, o biótipo B de *B. tabaci* foi reclassificado como a espécie críptica *B. tabaci* Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1) (Dinsdale *et al.*, 2010). Apesar de MEAM1 predominar no Brasil, o antigo biótipo A, atualmente *B. tabaci* New World (NW), e uma espécie nativa, *B. tabaci* New World 2 (NW2), também estão presentes, encontradas predominantemente em plantas não-cultivadas (Marubayashi *et al.*, 2013).

Embora *B. tabaci* seja reconhecida há muitos anos como vetora de vírus, só recentemente foram desenvolvidas ferramentas que permitiram analisar o genoma e o transcriptoma de *B. tabaci*, incluindo as suas bactérias endossimbiontes que são essenciais para a transmissão dos begomovírus. Essas ferramentas incluem a construção de bibliotecas de cDNA a partir de insetos adultos e a partir de diferentes estádios de desenvolvimento, o sequenciamento do transcriptoma e do proteoma, e o estudo da regulação e expressão gênica via silenciamento de RNA (Ghanim e Czosnek, 2016).

A emergência, prevalência e importância econômica das doenças causadas por begomovírus está intimamente relacionada com a distribuição e com o hábito alimentar altamente polífago de *B. tabaci* (Gilbertson *et al.*, 2015). O papel fundamental do vetor é evidente quando se considera que a emergência da maioria das espécies de begomovírus ocorreu ao longo dos últimos 30 anos, seguindo a dispersão global do vetor (Gilbertson *et al.*, 2015).

Os begomovírus são transmitidos por *B. tabaci* de modo persistente circulativo (Ghanim *et al.*, 2007; Gilbertson *et al.*, 2015). As partículas virais são adquiridas via estilete durante o processo de alimentação em plantas infectadas, entram no esôfago e na câmara de filtro, e subsequentemente são transportadas através da parede do intestino para a hemolinfa, onde circulam até adentrarem na glândula salivar, a partir da qual são transmitidas para novas plantas durante a alimentação do inseto (Hunter *et al.*, 1998; Ghanim *et al.*, 2001; Czosnek *et al.*, 2002; Ghanim *et al.*, 2007).

A proteína capsidial (CP) é a única proteína viral essencial para a aquisição e transmissão pelo inseto vetor (Azzam *et al.*, 1994). Para determinar o papel da CP do *Bean golden mosaic virus* (BGMV) na infecção sistêmica e transmissão por vetor, mutações foram inseridas no gene *CP* do BGMV. Esses mutantes foram capazes de infectar plantas de feijoeiro sistemicamente, porém a CP não foi detectada nas plantas infectadas e o vírus não foi transmitido por *B. tabaci*, demonstrando que a CP é essencial para a transmissão (Azzam *et al.*, 1994). Hofer *et al.* (1997) demonstraram que uma quimera do begomovírus *Abutilon mosaic virus* (AbMV; não transmitido por mosca-branca) contendo a CP do *Sida golden mosaic virus* (SGMV) foi transmitida para múltiplos hospedeiros por *B. tabaci*, reforçando o papel essencial da CP na interação vírus-vetor. A CP também é responsável pela especificidade dos geminivírus a seus vetores. Isso foi demonstrado pela substituição do gene *CP* do begomovírus *African cassava mosaic virus* (ACMV), transmitido por *B. tabaci*, pelo gene *CP* do curtovírus *Beet curly top virus* (BCTV), transmitido pela cigarrinha *Circulifer tenellus*. O vírus quimérico resultante foi transmitido por *C. tenellus*, mas não por *B. tabaci* (Bridson *et al.*, 1990).

Até recentemente, acreditava-se que os begomovírus não eram transmitidos via semente (Gilbertson *et al.*, 2015).

2.4. Aspectos gerais da transmissão de vírus de plantas via semente

A grande maioria dos vírus de plantas são transmitidos por contato mecânico ou por vetores, tais como fungos, insetos e nematoides; a transmissão via sementes, por meio da infecção dos tecidos embrionários, ocorre em apenas cerca de 15% dos vírus, e em muitos casos a taxa de transmissão pela semente é extremamente baixa, da ordem de 0,1 a 1% (Hull, 2002). Entretanto, apesar de pouco frequente, a transmissão via semente é a principal forma de disseminação de vírus de plantas a longas distâncias, assumindo, portanto, grande importância uma vez que os vírus podem persistir nas sementes e serem disseminados para áreas até então livres do patógeno.

As características de transmissão via semente diferem dentro de cada família e gênero (Hull, 2002). Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na infecção dos tecidos da semente.

A transmissão pela semente pode ocorrer de duas formas: direta, pela invasão do embrião após a fertilização, e indireta, mediada pela infecção de gametas antes da fertilização (Sastry, 2013). Um número significativo de vírus são capazes de infectar o embrião ou os tecidos que compõem a semente, incluindo diversos potyvírus (p.ex., *Bean common mosaic virus*, BCMV; *Lettuce mosaic virus*, LMV; *Pea seedborne mosaic virus*, PSbMV; *Soybean mosaic virus*, SMV; *Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV), cucumovírus (p.ex., *Tomato aspermy virus*, TAV), hordevírus (p.ex., *Barley stripe mosaic virus*, BSMV), ilarvírus (p.ex., *Tobacco streak virus*, TSV), nepovírus (p.ex., *Tobacco ringspot virus*, TRSV), dentre outros.

O PSbMV é detectado em tecidos florais (sépalas, pétalas, anteras e carpelos) em duas cultivares de ervilha, mas não é detectado nos grãos de pólen ou nos óvulos antes da fertilização. O vírus pode ser detectado em todos os tecidos da semente, incluindo o eixo embrionário, cotilédones e testa. A multiplicação viral ocorre nos tecidos embrionários, persistindo durante a maturação da semente (Wang e Maule, 1992). Wang e Maule (1994) propuseram que um tecido conectivo transiente, denominado suspensor, possibilita o acesso do vírus ao embrião. O suspensor, que surge entre os tecidos da planta-mãe e do óvulo após a fertilização, provavelmente está relacionado com o desenvolvimento e nutrição do embrião, atuando como uma ponte para que as partículas virais cheguem ao embrião. Dessa forma, sua degeneração "fecharia a janela" para a transmissão do vírus pela semente. Entretanto é sabido que embora haja continuidade simplástica (presença de plasmodesmas) entre o suspensor e o embrião em dicotiledôneas, não há conexão simplástica entre as células do suspensor e as células da testa de semente (Schulz e Jensen, 1969), o que impossibilitaria o estabelecimento do vírus no embrião. É possível que o vírus induza a formação de plasmodesmas na interface entre o suspensor e a testa. Entretanto, embora esteja bem estabelecido que os vírus podem modificar funcionalmente os plasmodesmas (Wolf *et al.*, 1989; Noueirry *et al.*, 1994), não existe até o presente nenhum relato de indução da formação de plasmodesmas durante infecções virais.

Roberts *et al.* (2003) propuseram uma rota diferente da apresentada por Wang e Maule (1994) para o acesso viral ao embrião. As partículas virais alcançariam o embrião via suspensor, por meio de sua ligação com a região micropilar, e desta com a testa da semente. Entretanto, não se tem conhecimento da existência de plasmodesmas entre esses tecidos. Os autores, por meio de análises ultraestruturais, sugerem que há conexão simplástica entre as células da testa e da região micropilar,

pois observaram a presença tanto de partículas virais como da proteína viral CI na parede das células entre os tecidos. Não foram observadas quaisquer estruturas semelhantes a plasmodesmas em tecidos de plantas infectadas ou saudáveis. A constatação da presença de plasmodesmas entre os limites desses tecidos poderia explicar o processo de infecção direta do embrião.

Embora o modelo proposto por Wang e Maule (1994) sugira que a infecção do embrião de ervilha pelo PSbMV não ocorre antes da fertilização, outros autores, trabalhando com patossistemas distintos, encontraram resultados diferentes.

Alta taxa de infecção (80%) de óvulos de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) pelo BCMV foi detectada antes da fertilização (Schippers, 1963). Porém, a taxa de transmissão desse vírus pela semente é de apenas 15%. Estudos com o SMV demonstraram que embriões infectados de cultivares de soja nas quais não ocorre transmissão pela semente apresentam redução progressiva no acúmulo de partículas virais ao longo do processo de desenvolvimento do embrião, levando à ausência de sementes infectadas (Bowers e Goodman, 1979). Domier *et al.* (2007) demonstraram que embriões imaturos de diferentes cultivares de soja apresentam entre 58% e 94% de sementes infectadas. Entretanto, após a maturação das sementes, a porcentagem de embriões infectados passa a variar de 0,8% a 66%. Segundo os autores, as possíveis causas dessa redução poderiam estar ligadas aos processos fisiológicos que ocorrem nas sementes durante a maturação, como a realocação de nutrientes, a drástica redução da atividade celular, e o aumento dos níveis de inibidores, como compostos fenólicos e quinonas.

A taxa de transmissão do LMV pelas sementes de alface varia de 1% a 16%, dependendo do genótipo de alface e do isolado de LMV (Pereira *et al.*, 2012). Em plantas de alface, as partículas de LMV foram encontradas em cerca de 20% dos

óvulos antes da fertilização. Após a fecundação, apenas 13% das sementes apresentavam infecção do embrião (Beserra Junior, 2008). Por outro lado, em plantas de ervilha infectadas pelo PSbMV a taxa de infecção de embriões permanece inalterada ao longo do desenvolvimento da semente (Wang e Maule, 1994).

O mecanismo de transmissão do nepovírus *Tobacco ringspot virus* (TRSV) pela semente em plantas de soja foi estudado em óvulos coletados um dia antes do florescimento. Foram encontradas partículas virais no embrião, demonstrando um processo direto de transmissão via óvulo antes da polinização. Os autores realizaram experimentos de polinização cruzada, os quais sugeriram que a infecção dos megagametófitos é o principal fator de transmissão pela semente (Yang e Hamilton, 1974).

Em conjunto, esses resultados indicam que a simples presença do vírus no embrião imaturo não é suficiente para assegurar a transmissão pela semente, pois em alguns casos o vírus pode ser inativado durante o desenvolvimento, ou embriões infectados podem se tornar inviáveis, de forma que apenas sementes livres de vírus sejam produzidas.

Apesar das evidências de que, para serem transmitidos via semente, os vírus devem infectar os tecidos internos das sementes, preferencialmente o embrião, uma exceção ocorre com as espécies do gênero *Tobamovirus*. Os vírus pertencentes a esse gênero permanecem aderidos ao tegumento das sementes, não tendo a capacidade de infectar o embrião e/ou o endosperma (Cezar *et al.*, 2009). Por outro lado, uma exceção dentro do gênero *Tobamovirus* é o *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), que além de permanecer no tegumento, é capaz de infectar o embrião. O CGMMV pode ser transmitido para a próxima geração tanto horizontalmente via

pólen como verticalmente via sementes de frutos de pepino infectado. A transmissão vertical ocorre a taxas de 12,8% a 76,7% (Liu *et al.*, 2014).

Estudos recentes relatam que alguns viroides podem ser transmitidos via semente. A taxa de transmissão do *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) é de 0-90% em tomateiro, 0,3% em *Capsicum annuum* var. *grossum*, 0,5% em *C. annuum* var. *angulosum*, 1,2% em *Glebionis coronaria* e 81% em *Petunia x hybrida*. Para o *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd) e *Columnnea latent viroid* (CLVd) as taxas de transmissão são de 25% em *Petunia x hybrida* e 5,3-100% em tomateiro, respectivamente. A presença do PSTVd no embrião e no endosperma de sementes de tomateiros infectados foi demonstrada por meio de hibridação *in situ* (Matsushita e Tsuda, 2016).

Groves *et al.* (2016) relataram o primeiro caso de transmissão de um tospovírus pela semente. O *Soybean vein necrosis virus* (SVNV), apesar de não causar sintomas foliares, é capaz de ser transmitido via sementes de soja a uma taxa de 6%, infectando sistemicamente as plântulas delas originadas.

2.5. Transmissão de begomovírus via semente

A distribuição de begomovírus nos tecidos de plantas infectadas depende da combinação específica vírus-hospedeiro. Na maioria dos casos os begomovírus se limitam ao parênquima floemático e câmbio, e apenas em algumas combinações ocorre a infecção de tecidos parenquimáticos do mesofilo (revisado por (Rojas *et al.*, 2005).

Devido a essa restrição ao floema, inferiu-se que os geminivírus em geral, e especificamente os begomovírus, não seriam capazes de atingir as regiões internas da

semente (Hull, 2002). Entretanto, existem relatos antigos sugerindo a infecção de tecidos associados a semente por alguns geminivírus. Bennett e Esau (1936) demonstraram a presença do curtovírus *Beet curly top virus* (BCTV) em todos os tecidos de semente, exceto o embrião.

O primeiro relato de transmissão via semente de um begomovírus ocorreu em 2015, na Coreia do Sul (Kim *et al.*, 2015). Os autores demonstraram uma taxa de transmissão de 70% em sementes de batata-doce (*Ipomoea batatas*, fam. Convolvulaceae) infectadas com o *Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV), com 21% das plântulas proveniente de sementes de plantas infectadas apresentando a presença do vírus. O SPLCV foi detectado por meio de PCR em tecidos florais, sementes e plântulas recém-germinadas. Esses resultados indicam que o SPLCV pode ser transmitido por semente em batata-doce, passando para a próxima geração por meio do embrião. No entanto, não existem informações sobre a localização citológica do SPLCV na semente, nem sobre o transporte do vírus dos órgãos vegetativos para os órgãos reprodutivos.

Um segundo relato de transmissão via semente de um begomovírus ocorreu em *Vigna mungo* (fam. Fabaceae) na Índia (Kothandaraman *et al.*, 2015). Uma coloração amarelada das vagens e sementes de plantas infectadas e o surgimento de sintomas no primeiro trifólio das plantas de feijoeiro no campo levaram à hipótese de que o *Mung bean yellow mosaic virus* (MYMV) poderia ser transmitido por semente. As sementes das plantas infectadas eram mal granadas, com tamanho e peso reduzidos, além de serem deformadas e exibirem coloração amarela. O vírus foi detectado via PCR no tegumento, cotilédones e eixos embrionários das sementes, e partículas icosaédricas geminadas foram observadas em semente por microscopia eletrônica de transmissão. As plântulas advindas de sementes de plantas infectadas,

apesar de não desenvolverem sintomas, apresentaram uma taxa de 32% de infecção viral. Os autores argumentam que nem sempre a presença do vírus na semente, mesmo no embrião, leva à infecção das plântulas, pois a intensa atividade metabólica de uma plântula em crescimento não criaria um ambiente propício à acumulação e translocação viral. A interferência da infecção viral nas vias metabólicas do hospedeiro que conduzem à expressão de sintomas pode não ocorrer de forma eficiente. Assim, a ausência de sintomas e a taxa de infecção relativamente baixa seriam justificáveis (Kothandaraman *et al.*, 2015).

Um terceiro relato sobre a transmissão de begomovírus via semente ocorreu na cultura do tomateiro (fam. Solanaceae) na Coreia (Kil *et al.*, 2016). Em 2013 e 2014, sem transmissão mediada por mosca branca, o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV-IL) foi detectado em plantas jovens de tomateiro germinadas a partir de frutos produzidos por plantas infectadas. Apesar da análise via PCR ser positiva para essas plantas, estas não apresentavam sintomas. A partir de análises via PCR detectou-se o TYLCV em tecidos florais, sementes e plântulas recém-germinadas de tomateiro. Em plantas de tomateiro agro-inoculadas com clones infecciosos de TYLCV, o vírus foi detectado em tecidos florais, sementes dessecadas, endosperma, embrião, cotilédones e mudas jovens. Amostras foliares, de caule e raízes de plântulas originadas de sementes infectadas foram positivas para a presença do TYLCV via PCR, confirmando a infecção sistêmica pelo vírus. Os autores demonstraram também que moscas brancas avirulíferas que se alimentaram de plantas germinadas a partir de sementes infectadas com o TYLCV foram capazes de transmitir o vírus para plantas saudáveis.

Plantas de tomateiro tolerantes ao TYLCV (contendo os genes *Ty-1* e *Ty-3*) também produziram sementes infectadas, porém o acúmulo de DNA viral foi menor

em comparação a plantas suscetíveis. Os padrões de acúmulo de DNA viral em folhas, sementes e mudas indicam que a replicação e acúmulo elevados do DNA viral que ocorrem em plantas suscetíveis podem proporcionar uma maior oportunidade para a transmissão do DNA viral para sementes e plântulas, e sugerem que os genes de tolerância ao TYLCV não estão envolvidos no processo de transmissão do vírus via sementes (Kil *et al.*, 2016).

Com base nesses resultados recentes de transmissão de pelo menos três begomovírus via sementes de plantas pertencentes a três famílias botânicas (Convolvulaceae, Fabaceae e Solanaceae), fica clara a necessidade de maiores estudos sobre a transmissão de begomovírus via semente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta de amostras

Trinta e quatro plantas jovens de *Sida acuta* e cinco plantas de *Sida rhombifolia*, apresentando sintomas típicos da infecção por begomovírus, como mosaico e distorção foliar, foram coletadas em Viçosa, MG, em dezembro de 2013, e foram mantidas em casa-de-vegetação para a coleta de sementes, tecidos foliares e tecidos florais.

3.2. Clonagem e sequenciamento dos genomas virais

O DNA total das amostras foi extraído conforme o método descrito por Doyle e Doyle (1987). Os genomas virais foram amplificados utilizando-se amplificação por círculo rolante (*rolling-circle amplification*, RCA), de acordo com o método descrito por Inoue-Nagata *et al.* (2004). Alíquotas de 2 µL das amplificações foram submetidas a clivagens com diferentes enzimas de restrição, identificando-se aquelas que clivam cada componente em um sítio único para clonagem do genoma completo. Alíquotas das reações de clivagem contendo fragmentos de 2.600 nucleotídeos (nt), correspondentes a uma cópia do componente genômico de begomovírus, foram utilizadas para ligação ao vetor pBLUESCRIPT-KS+ (pKS+; Stratagene) previamente linearizado com a mesma enzima e desfosforilado. Os plasmídeos recombinantes foram utilizados para transformação de *Escherichia coli* DH5α via choque térmico, e os clones obtidos foram completamente sequenciados por *primer walking* na Macrogen Inc. (Seul, Coreia do Sul).

3.3. Identificação viral

As sequências nucleotídicas dos componentes genômicos de begomovírus (DNA-A e -B) foram comparadas com outras disponíveis no GenBank utilizando-se o algoritmo BLAST n (Altschul *et al.*, 1990), a fim de determinar as espécies virais com maior identidade.

3.4. Extração de DNA a partir de tecidos da semente

Para excluir qualquer possibilidade de contaminação por vírus na superfície das sementes, estas foram tratadas superficialmente com hipoclorito de sódio 10% (Kim *et al.*, 2015) ou com ácido sulfúrico 18 M por 3 minutos, seguido de três lavagens com água destilada. Após os tratamentos as sementes foram maceradas em lotes de 20, 30 ou 200 sementes. O DNA total das sementes foi extraído utilizando o método descrito por Doyle e Doyle (1987) e utilizado como molde para a amplificação dos genomas virais por RCA (Inoue-Nagata *et al.*, 2004).

Os produtos das amplificações foram clivados com a enzima *Msp*I (cujo sítio de reconhecimento é composto por apenas quatro nucleotídeos), e os fragmentos resultantes foram visualizados em gel de agarose. As amostras que apresentassem um padrão de clivagem cuja soma dos fragmentos totalizasse múltiplos de 2.600 nt e que fosse idêntico ou semelhante ao padrão encontrados nos tecidos foliares seriam selecionadas para clivagem em único ponto do genoma com diferentes enzimas para posterior clonagem e sequenciamento.

3.5. Extração de DNA a partir de tecidos florais

Flores inteiras e tecidos florais dissecados (pétalas, sépalas, estames, estiletes e ovários) tiveram seu DNA total extraído utilizando-se o método descrito por Doyle

e Doyle (1987). O DNA foi utilizado para detecção viral via RCA seguido de clivagem com *MspI*, e também via PCR utilizando-se oligonucleotídeos universais para o DNA-A de begomovírus (Rojas *et al.*, 1993). Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose. Foram analisadas um total de 240 flores provenientes das 39 plantas de *Sida* sp. mantidas em casa de vegetação.

3.6. Detecção viral em plântulas

Sementes provenientes de plantas comprovadamente infectadas foram tratadas com ácido sulfúrico 18 M por 3 minutos, seguido de três lavagens com água destilada, para quebra de dormência, e em seguida germinadas. Foram obtidas 269 plântulas. Folhas dessas plântulas foram coletadas aos 28 dias após a semeadura. O DNA total das amostras foliares foi extraído utilizando-se o método descrito por Doyle e Doyle (1987). O DNA foi utilizado para detecção viral via RCA seguido de clivagem com *MspI*, e também via PCR utilizando-se oligonucleotídeos universais para o DNA-A de begomovírus (Rojas *et al.*, 1993). Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose.

4. RESULTADOS

4.1. Detecção, clonagem e identificação viral a partir de plantas de *Sida acuta* e *Sida rhombifolia*

Trinta e quatro plantas jovens de *Sida acuta* e cinco plantas de *Sida rhombifolia*, apresentando sintomas típicos de infecção por begomovírus, foram coletadas em Viçosa, MG, em dezembro de 2013, e transferidas para casa-de-vegetação (Figura 1). A amplificação viral por RCA e posterior digestão com a

enzima de restrição *MspI* comprovou que 38 plantas estavam infectadas por begomovírus, com apenas uma planta de *S. acuta* apresentando resultado negativo. O *Sida yellow leaf curl virus* (SiYLCV) foi encontrado associado exclusivamente a plantas de *S. acuta* e o *Sida yellow mosaic virus* (SiYMV) foi encontrado associado exclusivamente a plantas de *S. rhombifolia*.

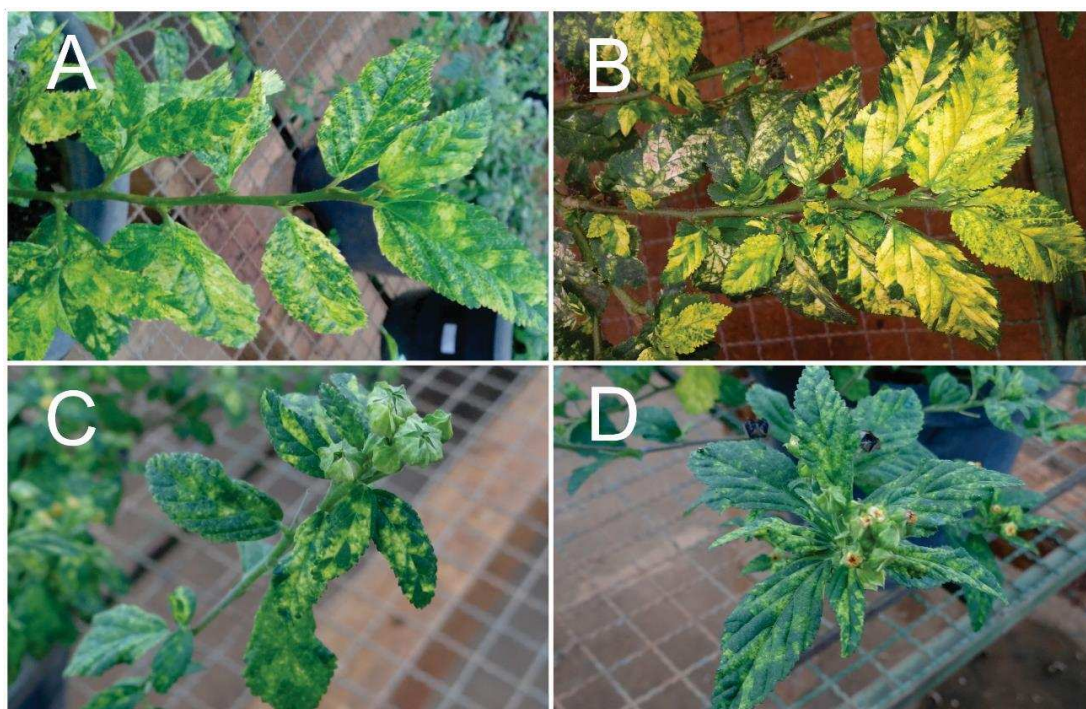


Figura 1. Sintomas em plantas de *Sida* spp. coletadas no campo e transferidas para casa-de-vegetação. **A, B.** Plantas de *Sida acuta* infectadas com o *Sida yellow leaf curl virus* (SiYLCV); **C, D.** Plantas de *Sida rhombifolia* infectadas com o *Sida yellow mosaic virus* (SiYMV).

4.2. Teste de inibição da *Taq* DNA polimerase por compostos presentes nas sementes de *Sida* spp.

A fim de analisar se compostos presentes nas sementes podem de alguma forma inibir a ação da enzima *Taq* DNA polimerase utilizada nos ensaios de PCR para detecção viral, um teste de inibição foi realizado. Preparou-se uma mistura de

DNA extraído de tecido foliar de *S. acuta* positivo para o SiYLCV com DNA extraído de sementes negativas para a presença viral. As misturas foram realizadas nas seguintes proporções: 5,0 µL de DNA de tecido foliar infectado + 5,0 µL de DNA de sementes sadia; 10,0 µL de DNA de tecido foliar infectado + 5,0 µL de DNA de sementes sadia; 15,0 µL de DNA de tecido foliar infectado + 5,0 µL de DNA de sementes sadia. As diferentes misturas foram submetidas à PCR utilizando-se oligonucleotídeos universais para o DNA-A de begomovírus (Rojas *et al.*, 1993), e também à RCA seguido de digestão com a enzima *MspI*.

Os resultados foram negativos para a amplificação de DNA viral via PCR, porém positivos via RCA seguido de digestão com *MspI* (Figura 2), demonstrando que a *Taq* DNA polimerase tem sua ação inibida devido a compostos presentes nas sementes de *Sida acuta*. Com base nesse resultado, todas as análises subsequentes para a detecção viral nas sementes de *S. acuta* e *S. rhombifolia* foram realizadas utilizando-se RCA seguido de digestão com *MspI* (a detecção em tecidos florais e em plântulas foi realizada via RCA e também via PCR).

4.3. Detecção de SiYLCV e SiYMV em sementes de *Sida* spp.

As plantas de *S. acuta* e *S. rhombifolia* foram mantidas em casa-de-vegetação livre de mosca-branca e suas sementes foram coletadas durante o período de dezembro de 2013 a maio de 2015, totalizando aproximadamente 322 mil sementes (Tabela 1). As sementes foram divididas em grupos de 20, 30 ou 200 sementes para a extração de DNA e detecção viral. Sementes que não passaram por nenhum tipo de tratamento foram analisadas em grupos de 20 ou 200 sementes, extraído-se DNA de um total de aproximadamente 49 mil sementes. Sementes tratadas com hipoclorito de sódio 10% foram analisadas em grupos de 20 ou 200 sementes, extraído-se DNA de

um total de aproximadamente 18 mil sementes. Sementes tratadas com ácido sulfúrico foram analisadas em grupos de 30 sementes, extraindo-se DNA de cerca de 12 mil sementes. Assim, foram analisadas neste trabalho cerca de 80 mil sementes de *Sida* spp. (Tabela 1). Os resultados da detecção viral via RCA seguido de digestão com *MspI* foram negativos para a presença do SiYLCV e do SiYMV no total de sementes extraídas ao longo deste estudo (Tabela 1), indicando que esses dois vírus não são transmitidos via semente nas duas espécies de *Sida*.

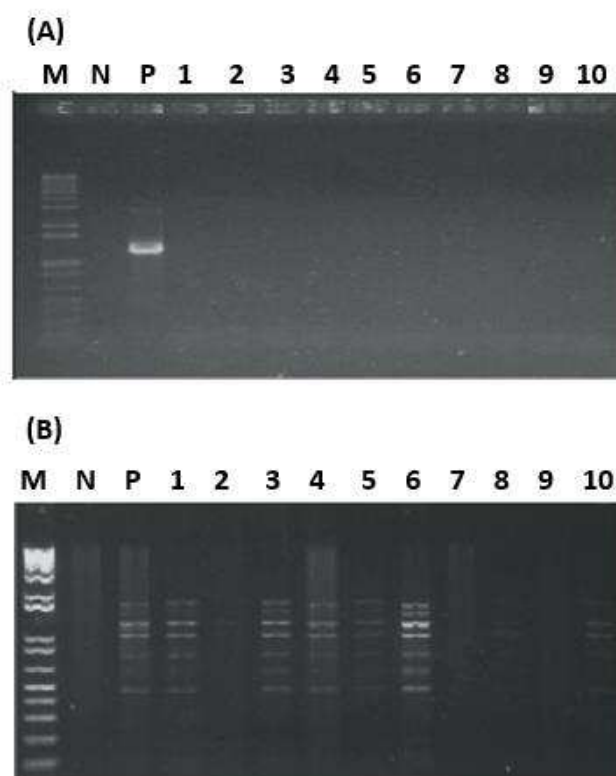


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose para avaliação de inibição da *Taq* DNA polimerase por compostos presentes nas sementes de *Sida acuta*. **A.** Amplificação de um fragmento do genoma viral via PCR utilizando oligonucleotídeos universais para o DNA-A; **B.** Amplificação do genoma completo via RCA seguido de digestão com *MspI*. **M.** Marcador (1 kb plus DNA ladder, Invitrogen); **N.** Amplificação a partir de DNA extraído de sementes saudáveis (controle negativo); **P.** Amplificação a partir de DNA extraído de tecido foliar infectado com o SiYLCV (controle positivo); **1, 2, 3.** Mistura na proporção de 10,0 μ L de DNA extraído de tecido foliar infectado + 5,0 μ L de DNA extraído de sementes saudáveis; **4, 5, 6.** Mistura na proporção de 15,0 μ L de DNA extraído de tecido foliar infectado + 5,0 μ L de DNA extraído de sementes saudáveis; **7, 8, 9, 10.** Mistura na proporção de 5,0 μ L de DNA extraído de tecido foliar infectado + 5,0 μ L de DNA extraído de sementes saudáveis.

Tabela 1. Amostras coletadas, begomovírus detectados nos tecidos foliares e resultados da detecção viral nas sementes.

Amostra	Espécie	Vírus ^a	No. aproximado de sementes coletadas ^b	No. de sementes utilizadas para extração de DNA ^c	No. de sementes positivas para a presença de vírus
SA01	<i>S. acuta</i>	SiYLCV	8.373	2.515/160/330	0
SA02	<i>S. acuta</i>	SiYLCV	17.495	8.315/560/330	0
SA03	<i>S. acuta</i>	SiYLCV	7.105	2.500/160/330	0
SA04	<i>S. acuta</i>	SiYLCV	7.423	100/160/330	0
SA05	<i>S. acuta</i>	SiYLCV	14.042	2.315/360/330	0
SA06	<i>S. acuta</i>	SiYLCV	14.165	9.385/2.760/330	0
SR07	<i>S. rhombifolia</i>	SiYMV	8.463	100/160/330	0
SR08	<i>S. rhombifolia</i>	SiYMV	7.630	100/160/330	0
SR09	<i>S. rhombifolia</i>	SiYMV	6.633	100/160/330	0
SA10	<i>S. acuta</i>	SiYLCV	8.782	100/160/330	0
SR11	<i>S. rhombifolia</i>	SiYMV	9.474	100/160/330	0
SR12	<i>S. rhombifolia</i>	SiYMV	10.267	100/160/330	0
SA13	<i>S. acuta</i>	SiYLCV	8.654	100/160/330	0
SA14	<i>S. acuta</i>	SiYLCV	8.016	100/160/330	0
SA15	<i>S. acuta</i>	SiYLCV	5.567	100/160/330	0
SA16	<i>S. acuta</i>	SiYLCV	7.987	100/160/330	0
SA17	<i>S. acuta</i>	SiYLCV	4.994	100/160/330	0
SA18	<i>S. acuta</i>	SiYLCV	10.067	100/160/330	0
SA19	<i>S. acuta</i>	Não infectada	6.334	1.740/360/330	0
SA21	<i>S. acuta</i>	SiYLCV	11.558	4.915/160/330	0
SA22	<i>S. acuta</i>	SiYLCV	4.991	190/160/330	0
SA23	<i>S. acuta</i>	SiYLCV	11.054	8.585/4.160/330	0
SA24	<i>S. acuta</i>	SiYLCV	8.912	190/160/330	0
SA25	<i>S. acuta</i>	SiYLCV	6.642	190/160/330	0
SA26	<i>S. acuta</i>	SiYLCV	3.405	160/160/330	0
SA27	<i>S. acuta</i>	SiYLCV	3.920	160/160/330	0
SA28	<i>S. acuta</i>	SiYLCV	6.051	160/160/330	0
SA29	<i>S. acuta</i>	SiYLCV	7.261	160/160/330	0
SA30	<i>S. acuta</i>	SiYLCV	5.272	170/160/330	0
SA31	<i>S. acuta</i>	SiYLCV	8.601	170/160/330	0
SA32	<i>S. acuta</i>	SiYLCV	9.907	205/160/330	0
SA33	<i>S. acuta</i>	SiYLCV	8.288	190/160/330	0
SA34	<i>S. acuta</i>	SiYLCV	8.433	100/160/330	0
SA35	<i>S. acuta</i>	SiYLCV	8.295	100/160/330	0
SA36	<i>S. acuta</i>	SiYLCV	4.780	100/4.960/330	0
SA37	<i>S. acuta</i>	SiYLCV	3.796	100/160/330	0
SA38	<i>S. acuta</i>	SiYLCV	8.852	100/160/330	0
SA39	<i>S. acuta</i>	SiYLCV	9.404	100/160/330	0
SA40	<i>S. acuta</i>	SiYLCV	11.524	4.900/160/330	0
Total	-	-	322.419	49.015/18.440/12.870 (80.325)	0

^a SiYLCV: *Sida yellow leaf curl virus*; SiYMV: *Sida yellow mosaic virus*.

^b Estimado com base no peso de 100 sementes.

^c Sementes que não passaram por nenhum tipo de tratamento, analisadas em lotes de 20 ou 200 sementes / Sementes tratadas com hipoclorito de sódio 10%, analisadas em lotes de 20 ou 200 sementes / Sementes tratadas com ácido sulfúrico 18 M, analisadas em lotes de 30 sementes.

4.4. Detecção de SiYLCV e SiYMV em tecidos florais de *Sida* spp.

DNA de flores inteiras (grupos de 10 flores) das duas espécies de *Sida* infectadas pelo SiYLCV e SiYMV foi extraído e utilizado para a amplificação viral via RCA seguido de digestão com *MspI* e também via PCR com oligonucleotídeos universais para o DNA-A. Os resultados foram positivos para a detecção dos dois vírus (Figura 3), demonstrando que as flores de ambas as espécies de *Sida* encontravam-se infectadas. Em seguida, os diferentes tecidos florais (pétalas, sépalas, estames, estiletes e ovários) foram dissecados, e o DNA extraído (grupos de 20 pétalas, sépalas, etc.) foi utilizado para a detecção viral via RCA seguido de digestão com *MspI* e também via PCR com oligonucleotídeos universais para o DNA-A. Os resultados foram positivos para a detecção dos dois vírus em todos os tecidos analisados (Figura 3), indicando que o vírus é capaz de infectar todas as partes florais.

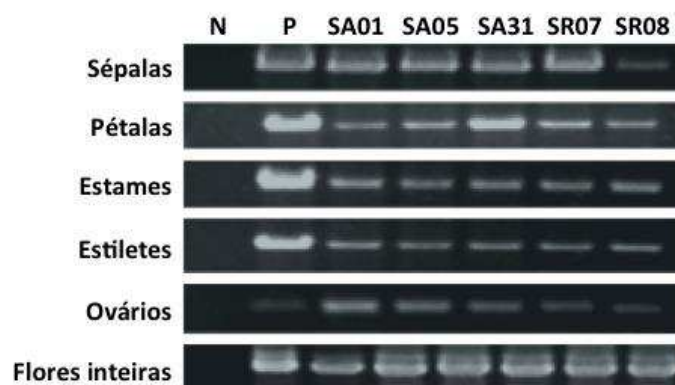


Figura 3. Detecção de *Sida yellow leaf curl virus* (SiYLCV) e *Sida yellow mosaic virus* (SiYMV) em flores inteiras e tecidos florais (sépalas, pétalas, estames, estiletes e ovários) de *Sida acuta* e *Sida rhombifolia*, via PCR utilizando oligonucleotídeos universais para o DNA-A de begomovírus (Rojas *et al.*, 1993). **N.** Amplificação a partir de DNA extraído de tecido foliar de plantas sadias (controle negativo); **P.** Amplificação a partir de DNA extraído de tecido foliar de plantas infectadas (controle positivo); **SA01, SA05, SA31.** Amplificação a partir de DNA extraído de amostras de *S. acuta*; **SR07, SR08.** Amplificação a partir de DNA extraído de amostras de *S. rhombifolia*.

4.5. Detecção de SiYLCV e SiYMV em plântulas de *Sida* spp.

Sementes provenientes de plantas comprovadamente infectadas foram tratadas com ácido sulfúrico para quebra de dormência e em seguida germinadas. O material foliar de 269 plântulas foi coletado aos 28 dias após a semeadura. O DNA total foi extraído de cada amostra individualmente e utilizado para amplificação viral via RCA seguido de digestão com *MspI* e também via PCR com oligonucleotídeos universais para o DNA-A. Os resultados foram negativos para a detecção dos dois vírus.

5. DISCUSSÃO

Com base nos estudos recentes que relataram a transmissão de três begomovírus via sementes de plantas pertencentes a três famílias botânicas (Convolvulaceae, Fabaceae e Solanaceae) (Kim *et al.*, 2015; Kothandaraman *et al.*, 2015; Kil *et al.*, 2016), fica clara a necessidade de maiores estudos sobre a transmissão de begomovírus via semente. Neste trabalho, os begomovírus *Sida yellow leaf curl virus* (SiYLCV) e *Sida yellow mosaic virus* (SiYMV) não foram detectados em aproximadamente 80 mil sementes coletadas a partir de plantas comprovadamente infectadas de *Sida acuta* e *Sida rhombifolia* (fam. Malvaceae), respectivamente. Além disso, não foi possível detectar a presença dos vírus em 269 plântulas provenientes de sementes coletadas de plantas infectadas. Em conjunto, esses resultados sugerem que a transmissão via semente não ocorre nessas combinações de vírus e hospedeiro.

A transmissão de vírus via semente depende de fatores relacionados à espécie viral e à planta hospedeira (Albrechtsen, 2006). Assim, um determinado vírus pode

ser transmitido pela semente de uma determinada espécie de planta, mas não ser transmitido pelas sementes de outra(s) planta(s). Da mesma forma, uma determinada espécie de planta pode ter os tecidos embrionários infectados por um determinado vírus, mas não por outro(s).

O potyvírus *Soybean mosaic virus* (SMV) pode induzir sintomas variados, dependendo do isolado viral e da cultivar de soja. Com base apenas na sintomatologia em diferentes cultivares de soja, os isolados de SMV são divididos em sete subgrupos, denominados G1 a G7. Além da variabilidade de sintomas apresentados pelas cultivares, muitas delas não transmitem determinados isolados via semente (Bowers Jr e Goodman, 1979), porém quando transmitem a taxa observada pode chegar a 43% (Domier *et al.*, 2007). Domier *et al.* (2007) verificaram que a transmissão do SMV de plantas de soja para a semente está diretamente relacionada com a expressão de algumas regiões cromossômicas da planta, denominadas C1 e C2.

Estudos realizados por Johansen *et al.* (1994) demonstraram que existem regiões do genoma do potyvírus *Pea seedborne mosaic virus* (PSbMV), como os genes HC-Pro e CP, que são fatores determinantes para a transmissão do vírus pela semente.

O tobrovírus *Pea early browning virus* (PEBV) pode ser transmitido por sementes de ervilha, e estudos realizados por Wang *et al.* (1997) utilizando diversos mutantes do PEBV demonstraram que o RNA1 é o responsável pela transmissão. Quando inoculados em plantas de ervilha, mutantes que tiveram o gene 12k do RNA1 deletado acumularam em baixa concentração no carpelo e no estigma das flores masculinas, mas não no grão de pólen, indicando que a proteína 12k está envolvida na transmissão do PEBV da planta para os tecidos das sementes e que,

provavelmente, essa proteína está envolvida no processo de infecção das células gaméticas.

No caso de vírus transmitidos pela semente, o embrião em desenvolvimento pode ser infectado antes da fertilização por meio de gametas infectados, ou diretamente pelo vírus após a fertilização. No presente estudo, a presença do SiYLCV e SiYMV foi detectada em tecidos florais (incluindo o ovário), sugerindo que os dois vírus são capazes de mover dos tecidos vegetativos para os tecidos reprodutivos, porém não atingem os tecidos das sementes.

Pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na infecção viral de tecidos de sementes (Maule e Wang, 1996). Mesmo nos casos em que os vírus são transmitidos dessa forma, a taxa de transmissão pela semente sofre redução progressiva ao longo do processo de desenvolvimento do embrião, o que pode levar à ausência de sementes infectadas (Bowers e Goodman, 1979). As possíveis causas dessa redução podem estar ligadas aos processos fisiológicos que ocorrem nas sementes durante a maturação, como a realocação de nutrientes, a drástica redução da atividade celular, e o aumento dos níveis de inibidores, como compostos fenólicos e quinonas (Maule e Wang, 1996).

É possível que o SiYLCV e o SiYMV sejam transmitidos às sementes, porém a taxas muito baixas. Considerando-se que a detecção viral foi realizada a partir de DNA extraído de grupos de 20, 30 ou 200 sementes, não é possível descartar a possibilidade, mesmo que improvável, de que nesses grupos de sementes não houvesse nenhuma semente infectada. Assim, seria interessante realizar tentativas de detecção a partir de DNA extraído de sementes individuais. Além disso, pode ter ocorrido uma diluição do DNA viral em proporção ao DNA da semente, dificultando (ou mesmo impossibilitando) a detecção. Deve-se ressaltar, entretanto, que os

métodos de detecção utilizados (PCR e RCA) são extremamente sensíveis, sendo teoricamente capazes de detectar a presença de uma única molécula de ácido nucleico. Compostos presentes nas sementes de *S. acuta* e *S. rhombifolia* apresentaram ação inibitória sobre a enzima *Taq* DNA polimerase. É razoável supor que esses compostos podem interferir de forma negativa também na extração de DNA, produzindo um extrato excessivamente oxidado e prejudicando as análises posteriores.

Dessa forma, embora os resultados indiquem que o SiYLCV e o SiYMV não são transmitidos via semente em *Sida acuta* e *Sida rhombifolia*, respectivamente, estudos adicionais devem ser realizados a fim de melhor compreender o mecanismo de movimento do vírus para os tecidos reprodutivos em vista da detecção viral nos tecidos florais.

6. LITERATURA CITADA

- ALBRECHTSEN, S.E. **Testing Methods for Seed-Transmitted Viruses: Principles and Protocols**. Boca Raton, FL: CABI, 2006.
- ALI, A.; KOBAYASHI, M. Seed transmission of *Cucumber mosaic virus* in pepper. **Journal of Virological Methods**, v. 163, p. 234-237, 2010.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- AMARAKOON, I.I.; ROYE, M.E.; BRIDDON, R.W.; BEDFORD, I.D.; STANLEY, J. Molecular and biological characterization of *Macrottilium yellow mosaic virus* from Jamaica. **Plant Pathology**, v. 57, p. 417-426, 2008.
- ANDRADE, E.C.; MANHANI, G.G.; ALFENAS, P.F.; CALEGARIO, R.F.; FONTES, E.P.B.; ZERBINI, F.M. *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**, v. 87, p. 3687-3696, 2006.
- ASSUNÇÃO, I.P.; LISTIK, A.F.; BARROS, M.C.S.; AMORIM, E.P.R.; SILVA, S.J.C.; IZABEL, O.S.; RAMALHO-NETO, C.E.; LIMA, G.S.A. Genetic diversity of begomoviruses in invasive species of Northeastern Brazil (in Portuguese). **Planta Daninha**, v. 24, p. 239-244, 2006.

- AZZAM, O.; FRAZER, J.; DE LA ROSA, D.; BEAVER, J.S.; AHLQUIST, P.G.; MAXWELL, D.P. Whitefly transmission and efficient ssDNA accumulation of bean golden mosaic geminivirus require functional coat protein. **Virology**, v. 204, p. 289-296, 1994.
- BARRETO, S.S.; HALLWASS, M.; AQUINO, O.M.; INOUE-NAGATA, A.K. A study of weeds as potential inoculum sources for a tomato-infecting begomovirus in central Brazil. **Phytopathology**, v. 103, p. 436-444, 2013.
- BENNETT, C.W.; ESAU, K. Further studies on the relation of the curly top virus to plant tissues. **Journal of Agricultural Research**, v. 53, p. 595-620, 1936.
- BESERRA JUNIOR, J.E.A. **Adaptabilidade diferencial de dois isolados de *Lettuce mosaic virus* (LMV) em alface e *Nicotiana benthamiana*: Cinética da infecção viral e infecção dos tecidos embrionários**. Tese D.S. Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2008.
- BOWERS, G.R.; GOODMAN, R.M. Soybean mosaic virus: Infection of soybean seeds parts and seed transmission. **Phytopathology**, v. 69, p. 569-572, 1979.
- BRIDDON, R.W.; PATIL, B.L.; BAGEWADI, B.; NAWAZ-UL-REHMAN, M.S.; FAUQUET, C.M. Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, p. 97, 2010.
- BRIDDON, R.W.; PINNER, M.S.; STANLEY, J.; MARKHAM, P.G. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. **Virology**, v. 177, p. 85-94, 1990.
- BROWN, J.K.; FAUQUET, C.M.; BRIDDON, R.W.; ZERBINI, F.M.; MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J. Family *Geminiviridae*. pp. 351-373, In: KING, A.M.Q.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B.; LEFKOWITZ, E.J. (Eds.). **Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. London, UK: Elsevier Academic Press. 2012.
- BROWN, J.K.; ZERBINI, F.M.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E.; RAMOS-SOBRINHO, R.; SILVA, J.C.; FIALLO-OLIVE, E.; BRIDDON, R.W.; HERNANDEZ-ZEPEDA, C.; IDRIS, A.; MALATHI, V.G.; MARTIN, D.P.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.; UEDA, S.; VARSANI, A. Revision of *Begomovirus* taxonomy based on pairwise sequence comparisons. **Archives of Virology**, v. 160, p. 1593-1619, 2015.
- CALEGARIO, R.F. **Caracterização do isolado de begomovírus MG-Bi2, um possível membro da espécie *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV)**. Tese M.S. Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2004.
- CASTILLO-URQUIZA, G.P.; BESERRA JR., J.E.A.; BRUCKNER, F.P.; LIMA, A.T.M.; VARSANI, A.; ALFENAS-ZERBINI, P.; ZERBINI, F.M. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Archives of Virology**, v. 153, p. 1985-1989, 2008.
- CASTILLO-URQUIZA, G.P.; BESERRA JUNIOR, J.E.A.; ALFENAS-ZERBINI, P.; VARSANI, A.; LIMA, A.T.M.; BARROS, D.R.; ZERBINI, F.M. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato in Paty do Alferes, Rio de Janeiro state, Brazil. **Virus Reviews and Research**, v. 12, p. 233, 2007.

- CEZAR, M.A.; KRAUSE-SAKATE, R.; PAVAN, M.A.; COSTA, C.P.D. Evaluation of resistance of *Capsicum* spp. genotypes to tobamovirus. **Summa Phytopathologica**, v. 35, p. 39-43, 2009.
- COTRIM, M.A.; KRAUSE-SAKATE, R.; NARITA, N.; ZERBINI, F.M.; PAVAN, M.A. Genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Central São Paulo state (in Portuguese). **Summa Phytopathologica**, v. 33, p. 300-303, 2007.
- CZOSNEK, H.; GHANIM, M. The circulative pathway of begomoviruses in the whitefly vector *Bemisia tabaci*: Insights from studies with *Tomato yellow leaf curl virus*. **Annals of Applied Biology**, v. 140, p. 215-232, 2002.
- DE BARRO, P.J.; LIU, S.S.; BOYKIN, L.M.; DINSDALE, A.B. *Bemisia tabaci*: A statement of species status. **Annual Review of Entomology**, v. 56, p. 1-19, 2011.
- DE SILVA, D.; JONES, P.; SHAW, M. Identification and transmission of *Piper yellow mottle virus* and *Cucumber mosaic virus* infecting black pepper (*Piper nigrum*) in Sri Lanka. **Plant Pathology**, v. 51, p. 537-545, 2002.
- DINSDALE, A.; COOK, L.; RIGINOS, C.; BUCKLEY, Y.M.; DE BARRO, P. Refined global analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) mitochondrial cytochrome oxidase 1 to identify species level genetic boundaries. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 103, p. 196-208, 2010.
- DOMIER, L.L.; STEINLAGE, T.A.; HOBBS, H.A.; WANG, Y.; HERRERA-RODRIGUEZ, G.; HAUDENSHIELD, J.S.; MCCOPPIN, N.K.; HARTMAN, G.L. Similarities in seed and aphid transmission among *Soybean mosaic virus* isolates. **Plant Disease**, v. 91, p. 546-550, 2007.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.
- DUFFY, S.; HOLMES, E.C. Multiple introductions of the Old World begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus* into the New World. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 7114-7117, 2007.
- FARIA, J.C.; MAXWELL, D.P. Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. **Phytopathology**, v. 89, p. 262-268, 1999.
- FERNANDES, A.V.; GALVÃO, R.M.; MACHADO, J.J.; ZERBINI, F.M.; FONTES, E.P.B. Cloning and molecular characterization of A components of two new *Sida rhombifolia*-infecting geminiviruses. **Virus Reviews and Research**, v. 4, p. 148, 1999.
- FIALLO-OLIVÉ, E.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E.; MARTINEZ-ZUBIAUR, Y. Begomoviruses infecting weeds in Cuba: Increased host range and a novel virus infecting *Sida rhombifolia*. **Archives of Virology**, v. 157, p. 141-146, 2012.
- FIALLO-OLIVÉ, E.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E.; MARTINEZ-ZUBIAUR, Y. Two novel begomoviruses belonging to different lineages infecting *Rhynchosia minima*. **Archives of Virology**, v. 155, p. 2053-2058, 2010.
- FIALLO-OLIVÉ, E.; ZERBINI, F.M.; NAVAS-CASTILLO, J. Complete nucleotide sequences of two new begomoviruses infecting the wild malvaceous plant *Melochia* sp. in Brazil. **Archives of Virology**, v. 160, p. 3161-3164, 2015.

- FONTES, E.P.B.; LUCKOW, V.A.; HANLEY-BOWDOIN, L. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. **Plant Cell**, v. 4, p. 597-608, 1992.
- FRISCHMUTH, T.; ENGEL, M.; LAUSTER, S.; JESKE, H. Nucleotide sequence evidence for the occurrence of three distinct whitefly-transmitted, *Sida*-infecting bipartite geminiviruses in Central America. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 2675-2682, 1997.
- GENNADIUS, P. Disease of tobacco plantations in the Trikonía. The aleurodid of tobacco. **Ellenike Georgia**, v. 5, p. 1-3, 1889.
- GHANIM, M.; CZOSNEK, H. Interactions between the whitefly *Bemisia tabaci* and begomoviruses: Biological and genomic perspectives. pp. 181-200, In: CZOSNEK, H.; GHANIM, M. (Eds.). **Management of Insect Pests to Agriculture**. Amsterdam: Springer. 2016.
- GHANIM, M.; MORIN, S.; CZOSNEK, H. Rate of *Tomato yellow leaf curl virus* translocation in the circulative transmission pathway of its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. **Phytopathology**, v. 91, p. 188-196, 2001.
- GHANIM, M.; SOBOL, I.; GHANIM, M.; CZOSNEK, H. Horizontal transmission of begomoviruses between *Bemisia tabaci* biotypes. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 1, p. 195-204, 2007.
- GILBERTSON, R.L.; BATUMAN, O.; WEBSTER, C.G.; ADKINS, S. Role of the insect supervectors *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis* in the emergence and global spread of plant viruses. **Annual Review of Virology**, v. 2, p. 67-93, 2015.
- GROVES, C.; GERMAN, T.; DASGUPTA, R.; MUELLER, D.; SMITH, D.L. Seed transmission of *Soybean vein necrosis virus*: The first tospovirus implicated in seed transmission. **PLoS One**, v. 11, p. e0147342, 2016.
- GUTIERREZ, C.; RAMIREZ-PARRA, E.; CASTELLANO, M.M.; SANZ-BURGOS, A.P.; LUQUE, A.; MISSICH, R. Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. **Veterinary Microbiology**, v. 98, p. 111-119, 2004.
- HOFER, P.; BEDFORD, I.D.; MARKHAM, P.G.; JESKE, H.; FRISCHMUTH, T. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. **Virology**, v. 236, p. 288-295, 1997.
- HULL, R. **Matthew's Plant Virology**. 4a ed. London, UK: Academic Press, 2002.
- HUNTER, W.B.; HIEBERT, E.; WEBB, S.E.; TSAI, J.H.; POLSTON, J.E. Location of geminiviruses in the whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera : Aleyrodidae). **Plant Disease**, v. 82, p. 1147-1151, 1998.
- IDRIS, A.M.; HIEBERT, E.; BIRD, J.; BROWN, J.K. Two newly described begomoviruses of *Macroptilium lathyroides* and common bean. **Phytopathology**, v. 93, p. 774-783, 2003.
- INOUE-NAGATA, A.K.; ALBUQUERQUE, L.C.; ROCHA, W.B.; NAGATA, T. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi29 DNA polymerase. **Journal of Virological Methods**, v. 116, p. 209-211, 2004.

- INOUE-NAGATA, A.K.; MARTIN, D.P.; BOITEUX, L.S.; GIORDANO, L.D.; BEZERRA, I.C.; DE AVILA, A.C. New species emergence via recombination among isolates of the Brazilian tomato-infecting begomovirus complex. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 1329-1332, 2006.
- JOHANSEN, E.; EDWARDS, M.C.; HAMPTON, R.O. Seed transmission of viruses: Current perspectives. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, p. 363-386, 1994.
- JOVEL, J.; RESKI, G.; ROTHENSTEIN, D.; RINGEL, M.; FRISCHMUTH, T.; JESKE, H. *Sida micrantha* mosaic is associated with a complex infection of begomoviruses different from *Abutilon mosaic virus*. **Archives of Virology**, v. 149, p. 829-841, 2004.
- KIL, E.-J.; KIM, S.; LEE, Y.-J.; BYUN, H.-S.; PARK, J.; SEO, H.; KIM, C.-S.; SHIM, J.-K.; LEE, J.-H.; KIM, J.-K. Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV-IL): A seed-transmissible geminivirus in tomatoes. **Scientific Reports**, v. 6, p. 19013, 2016.
- KIM, J.; KIL, E.J.; KIM, S.; SEO, H.; BYUN, H.S.; PARK, J.; CHUNG, M.N.; KWAK, H.R.; KIM, M.K.; KIM, C.S.; YANG, J.W.; LEE, K.Y.; CHOI, H.S.; LEE, S. Seed transmission of *Sweet potato leaf curl virus* in sweet potato (*Ipomoea batatas*). **Plant Pathology**, v. 64, p. 1284-1291, 2015.
- KOTHANDARAMAN, S.V.; DEVADASON, A.; GANESAN, M.V. Seed-borne nature of a begomovirus, *Mung bean yellow mosaic virus*, in black gram. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 1925-1933, 2015.
- LEGG, J.; FAUQUET, C. Cassava mosaic geminiviruses in Africa. **Plant Molecular Biology**, v. 56, p. 585-599, 2004.
- LEKE, W.N.; MIGNOUNA, D.B.; BROWN, J.K.; KVARNHEDEN, A. Begomovirus disease complexes: Emerging threats to vegetable production systems of West and Central Africa. **Agriculture & Food Security**, v. 4, p. 1, 2015.
- LIMA, A.T.M.; SOBRINHO, R.R.; GONZALEZ-AGUILERA, J.; ROCHA, C.S.; SILVA, S.J.C.; XAVIER, C.A.D.; SILVA, F.N.; DUFFY, S.; ZERBINI, F.M. Synonymous site variation due to recombination explains higher genetic variability in begomovirus populations infecting non-cultivated hosts. **Journal of General Virology**, v. 94, p. 418-431, 2013.
- LIU, H.; LUO, L.; LI, J.; LIU, P.; CHEN, X.; HAO, J. Pollen and seed transmission of *Cucumber green mottle mosaic virus* in cucumber. **Plant Pathology**, v. 63, p. 72-77, 2014.
- MACANAWAI, A.R.; EBENEBE, A.A.; HUNTER, D.; DEVITT, L.; HAFNER, G.; HARDING, R. Investigations into the seed and mealybug transmission of *Taro bacilliform virus*. **Australasian Plant Pathology**, v. 34, p. 73-76, 2005.
- MANSOOR, S.; BRIDDON, R.W.; ZAFAR, Y.; STANLEY, J. Geminivirus disease complexes: An emerging threat. **Trends in Plant Science**, v. 8, p. 128-134, 2003.
- MARTIN, D.P.; SHEPHERD, D.N. The epidemiology, economic impact and control of maize streak disease. **Food Security**, v. 1, p. 305-315, 2009.

- MARTIN, J.; MIFSUD, D.; RAPISARDA, C. The whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) of Europe and the Mediterranean basin. **Bulletin of Entomological Research**, v. 90, p. 407-448, 2000.
- MARUBAYASHI, J.M.; YUKI, V.A.; ROCHA, K.C.G.; MITUTI, T.; PELEGRINOTTI, F.M.; FERREIRA, F.Z.; MOURA, M.F.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E.; PAVAN, M.A.; KRAUSE-SAKATE, R. At least two indigenous species of the *Bemisia tabaci* complex are present in Brazil. **Journal of Applied Entomology**, v. 137, p. 113-121, 2013.
- MATSUSHITA, Y.; TSUDA, S. Seed transmission of potato spindle tuber viroid, tomato chlorotic dwarf viroid, tomato apical stunt viroid, and Columnea latent viroid in horticultural plants. **European Journal of Plant Pathology**, v. 145, p. 1007-1011, 2016.
- MAULE, A.J.; WANG, D. Seed transmission of plant viruses: A lesson in biological complexity. **Trends in Microbiology**, v. 4, p. 153-158, 1996.
- MEDBERRY, S.L.; LOCKHART, B.; OLSZEWSKI, N.E. The *Commelina yellow mottle virus* promoter is a strong promoter in vascular and reproductive tissues. **Plant Cell**, v. 4, p. 185-192, 1992.
- MELGAREJO, T.A.; KON, T.; ROJAS, M.R.; PAZ-CARRASCO, L.; ZERBINI, F.M.; GILBERTSON, R.L. Characterization of a new world monopartite begomovirus causing leaf curl disease of tomato in Ecuador and Peru reveals a new direction in geminivirus evolution. **Journal of Virology**, v. 87, p. 5397-5413, 2013.
- MINK, G. Pollen and seed-transmitted viruses and viroids. **Annual Review of Phytopathology**, v. 31, p. 375-402, 1993.
- MISRA, C.S.; LAMBA, K.S. **The cotton white-fly (*Bemisia gossypiperda*, n. sp.)**. Government of India Central Publication Branch, 1929.
- MONCI, F.; SANCHEZ-CAMPOS, S.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E. 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**, v. 303, p. 317-326, 2002.
- MORALES, F.J. History and current distribution of begomoviruses in Latin America. **Advances in Virus Research**, v. 67, p. 127-162, 2006.
- NAHKLA, M.K.; MAXWELL, M.D.; HIDAYAT, S.H.; LANGE, D.R.; LONIELLO, A.O.; ROJAS, M.R.; MAXWELL, D.P.; KITAJIMA, E.W.; ROJAS, A.; ANDERSON, P.; GILBERTSON, R.L. Two geminiviruses associated with tomatoes in Central America. **Phytopathology**, v. 84, p. 467, 1994.
- NAVAS-CASTILLO, J.; FIALLO-OLIVÉ, E.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, p. 219-248, 2011.
- NOUEIRY, A.O.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. **Cell**, v. 76, p. 925-932, 1994.

- OROZCO, B.M.; MILLER, A.B.; SETTLAGE, S.B.; HANLEY-BOWDOIN, L. Functional domains of a geminivirus replication protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 9840-9846, 1997.
- PADIDAM, M.; SAWYER, S.; FAUQUET, C.M. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. **Virology**, v. 265, p. 218-224, 1999.
- PAHALAWATTA, V.; DRUFFEL, K.; PAPPU, H. Seed transmission of *Dahlia mosaic virus* in *Dahlia pinnata*. **Plant Disease**, v. 91, p. 88-91, 2007.
- PAXIMADIS, M.; IDRIS, A.M.; TORRES-JEREZ, I.; VILLARREAL, A.; REY, M.E.C.; BROWN, J.K. Characterization of tobacco geminiviruses in the Old and New World. **Archives of Virology**, v. 144, p. 703-717, 1999.
- PEDERSEN, T.J.; HANLEY-BOWDOIN. Molecular characterization of the AL3 protein encoded by a bipartite geminivirus. **Virology**, v. 202, p. 1070-1075, 1994.
- PEREIRA, L.S.; CHAVES, A.L.R.; FILHO, J.A.A.; COLARICCIO, A. Indexação do *Lettuce mosaic virus* em sementes e plântulas de genótipos de alface. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, p. 628-635, 2012.
- PINTO, V.B.; SILVA, J.P.; FIALLO-OLIVÉ, E.; NAVAS-CASTILLO, J.; ZERBINI, F.M. Novel begomoviruses recovered from *Pavonia* sp. in Brazil. **Archives of Virology**, v. 161, p. 735-739, 2015.
- PITA, J.S.; FONDONG, V.N.; SANGARE, A.; OTIM-NAPE, G.W.; OGWAL, S.; FAUQUET, C.M. Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 655-665, 2001.
- QUAINOO, A.; WETTEN, A.; ALLAINGUILLAUME, J. Transmission of cocoa swollen shoot virus by seeds. **Journal of Virological Methods**, v. 150, p. 45-49, 2008.
- RAMOS-SOBRINHO, R.; XAVIER, C.A.D.; PEREIRA, H.M.D.B.; LIMA, G.S.D.A.; ASSUNÇÃO, I.P.; MIZUBUTI, E.S.G.; DUFFY, S.; ZERBINI, F.M. Contrasting genetic structure between two begomoviruses infecting the same leguminous hosts. **Journal of General Virology**, v. 95, p. 2540-2552, 2014.
- RIBEIRO, S.G.; MARTIN, D.P.; LACORTE, C.; SIMÕES, I.C.; ORLANDINI, D.R.S.; INOUE-NAGATA, A.K. Molecular and biological characterization of *Tomato chlorotic mottle virus* suggests that recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses. **Phytopathology**, v. 97, p. 702-711, 2007.
- RIZVI, I.; CHOUDHURY, N.R.; TUTEJA, N. Insights into the functional characteristics of geminivirus rolling-circle replication initiator protein and its interaction with host factors affecting viral DNA replication. **Archives of Virology**, v. 160, p. 375-387, 2015.
- ROBERTS, I.M.; WANG, D.; THOMAS, C.L.; MAULE, A.J. *Pea seed-borne mosaic virus* seed transmission exploits novel symplastic pathways to infect the pea embryo and is, in part, dependent upon chance. **Protoplasts**, v. 222, p. 31-43, 2003.
- ROCHA, C.S.; CASTILLO-URQUIZA, G.P.; LIMA, A.T.M.; SILVA, F.N.; XAVIER, C.A.D.; HORA-JUNIOR, B.T.; BESERRA-JUNIOR, J.E.A.; MALTA, A.W.O.; MARTIN, D.P.; VARSANI, A.; ALFENAS-ZERBINI, P.; MIZUBUTI,

- E.S.G.; ZERBINI, F.M. Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly evolving, and segregated based on geographical location. **Journal of Virology**, v. 87, p. 5784-5799, 2013.
- ROJAS, M.R.; GILBERTSON, R.L.; RUSSELL, D.R.; MAXWELL, D.P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease**, v. 77, p. 340-347, 1993.
- ROJAS, M.R.; HAGEN, C.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 361-394, 2005.
- ROYE, M.E.; MCLAUGHLIN, W.A.; NAKHLA, M.K.; MAXWELL, D.P. Genetic diversity among geminiviruses associated with the weed species *Sida* spp., *Macroptilium lathyroides*, and *Wissadula amplissima* from Jamaica. **Plant Disease**, v. 81, p. 1251-1258, 1997.
- RUSSELL, L., M. Synonyms of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae). **Bulletin of the Brooklyn Entomological Society**, v. 52, p. 122-123, 1957.
- RYBICKI, E.P. A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of *Geminiviridae*. **Archives of Virology**, v. 139, p. 49-77, 1994.
- SANCHEZ-CAMPOS, S.; MARTINEZ-AYALA, A.; MARQUEZ-MARTIN, B.; ARAGON-CABALLERO, L.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E. Fulfilling Koch's postulates confirms the monopartite nature of tomato leaf deformation virus: A begomovirus native to the New World. **Virus Research**, v. 173, p. 286-293, 2013.
- SANDERFOOT, A.A.; LAZAROWITZ, S.G. Getting it together in plant virus movement: Cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. **Trends in Cell Biology**, v. 6, p. 353-358, 1996.
- SASTRY, K.S. **Seed-borne plant virus diseases**. Amsterdam: Springer Science & Business Media, 2013.
- SATTAR, M.N.; KVARNHEDEN, A.; SAEED, M.; BRIDDON, R.W. Cotton leaf curl disease - An emerging threat to cotton production worldwide. **Journal of General Virology**, v. 94, p. 695-710, 2013.
- SCHIPPERS, B. Transmission of bean common mosaic virus by seed of *Phaseolus vulgaris* L. cultivar Beka. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 12, p. 433-497, 1963.
- SCHULZ, S.P.; JENSEN, W.A. *Capsella* embryogenesis: The suspensor and the basal cell. **Protoplasma**, v. 67, p. 139-163, 1969.
- SILVA, S.J.C.; CASTILLO-URQUIZA, G.P.; HORA-JUNIOR, B.T.; ASSUNÇÃO, I.P.; LIMA, G.S.A.; PIO-RIBEIRO, G.; MIZUBUTI, E.S.G.; ZERBINI, F.M. Species diversity, phylogeny and genetic variability of begomovirus populations infecting leguminous weeds in northeastern Brazil. **Plant Pathology**, v. 61, p. 457-467, 2012.
- STANSLEY, P.A.; NARANJO, S.E. ***Bemisia*: Bionomics and management of a global pest**. Amsterdam: Springer, 2010.
- STENGER, D.C.; REVINGTON, G.N.; STEVENSON, M.C.; BISARO, D.M. Replicational release of geminivirus genomes from tandemly repeated copies:

- Evidence for rolling-circle replication of a plant viral DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 88, p. 8029-8033, 1991.
- SUNTER, G.; HARTITZ, M.D.; HORMUZDI, S.G.; BROUGH, C.L.; BISARO, D.M. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required for coat protein accumulation while ORF AL3 is necessary for efficient DNA replication. **Virology**, v. 179, p. 69-77, 1990.
- TAVARES, S.S.; RAMOS-SOBRINHO, R.; GONZALEZ-AGUILERA, J.; LIMA, G.S.A.; ASSUNÇÃO, I.P.; ZERBINI, F.M. Further molecular characterization of weed-associated begomoviruses in Brazil with an emphasis on *Sida* spp. **Planta Daninha**, v. 30, p. 305-315, 2012.
- THOMSON, K.; DIETZGEN, R.; THOMAS, J.; TEAKLE, D. Detection of pineapple bacilliform virus using the polymerase chain reaction. **Annals of Applied Biology**, v. 129, p. 57-69, 1996.
- VANITHARANI, R.; CHELLAPPAN, P.; PITA, J.S.; FAUQUET, C.M. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. **Journal of Virology**, v. 78, p. 9487-9498, 2004.
- VARSANI, A.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E.; HERNÁNDEZ-ZEPEDA, C.; IDRIS, A.; BROWN, J.K.; ZERBINI, F.M.; MARTIN, D.P. Establishment of three new genera in the family *Geminiviridae*: *Becurtovirus*, *Eragrovirus* and *Turncurtovirus*. **Archives of Virology**, v. 159, p. 2193-2203, 2014.
- VOINNET, O.; PINTO, Y.M.; BAULCOMBE, D.C. Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 96, p. 14147-14152, 1999.
- WANG, D.; MACFARLANE, S.A.; MAULE, A.J. Viral determinants of pea early browning virus seed transmission in pea. **Virology**, v. 234, p. 112-117, 1997.
- WANG, D.; MAULE, A.J. Early embryo invasion as a determinant in pea of the seed transmission of pea seedborne mosaic virus. **Journal of General Virology**, v. 73, p. 1615-1620, 1992.
- WANG, D.; MAULE, A.J. A model for seed transmission of a plant virus: Genetic and structural analyses of pea embryo invasion by *Pea seed-borne mosaic virus*. **Plant Cell**, v. 6, p. 777-787, 1994.
- WANG, H.; BUCKLEY, K.J.; YANG, X.; BUCHMANN, R.C.; BISARO, D.M. Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. **Journal of Virology**, v. 79, p. 7410-7418, 2005.
- WERE, H.K.; WINTER, S.; MAISS, E. Viruses infecting cassava in Kenya. **Plant Disease**, v. 88, p. 17-22, 2004.
- WOLF, S.; DEOM, C.M.; BEACHY, R.N.; LUCAS, W.J. Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. **Science**, v. 246, p. 377-379, 1989.
- YANG, A.F.; HAMILTON, R.I. The mechanism of seed transmission of tobacco ringspot virus in soybean. **Virology**, v. 62, p. 26-37, 1974.

- ZHOU, X. Advances in understanding begomovirus satellites. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, p. 357-381, 2013.
- ZORZATTO, C.; MACHADO, J.P.; LOPES, K.V.; NASCIMENTO, K.J.; PEREIRA, W.A.; BRUSTOLINI, O.J.; REIS, P.A.; CALIL, I.P.; DEGUCHI, M.; SACHETTO-MARTINS, G.; GOUVEIA, B.C.; LORIATO, V.A.; SILVA, M.A.; SILVA, F.F.; SANTOS, A.A.; CHORY, J.; FONTES, E.P. NIK1-mediated translation suppression functions as a plant antiviral immunity mechanism. **Nature**, v. 520, p. 679-682, 2015.