

RAQUEL NEVES DE MELLO

**BEGOMOVÍRUS EM SOJA NO BRASIL E FERRAMENTAS
MOLECULARES PARA SUA IDENTIFICAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2001**

RAQUEL NEVES DE MELLO

**BEGOMOVÍRUS EM SOJA NO BRASIL E FERRAMENTAS
MOLECULARES PARA SUA IDENTIFICAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

APROVADA: 30 de novembro de 2001.

Prof. Murilo Geraldo de Carvalho
(Conselheiro)

Dr. Álvaro Manuel Rodrigues Almeida

Prof. Sérgio H. Brommonschenkel

Dr^a. Cleide Maria Ferreira Pinto

Prof. Francisco Murilo Zerbini Júnior
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao PRODETAB, pelo financiamento deste projeto; ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos; ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, pela oportunidade de realização do curso; a Geraldo Neves Xavier e a José Joaquim Sant'Ana Galvão, pelo apoio na casa-de-vegetação e no laboratório; a Marcelo Luiz de Laia, pelo auxílio no uso dos programas de computador; a Eduardo Chumbinho de Andrade, pela assistência nos ensaios de biobalística; a Fabrício Serrão Contin, Marcos Cotrim, Adriana Gonçalves Moreira e Edimar Ferreira Lopes, pela colaboração nos ensaios de detecção; a Jonas Jäger Fernandes, Luciana Pimenta Ambrozevicius, Simone da Graça Ribeiro, Andréa Cristina Mariano, Douglas Lau, Adriana Cheavegatti e Júlio Cezar Franco de Oliveira, pelas sugestões e discussões técnicas; ao Prof. Maurílio Alves Moreira, pelas sementes de soja; à Prof^a. Elizabeth Pacheco Batista Fontes, à Dr^a. Cleide Maria Ferreira Pinto e ao Prof. Sérgio Hermínio Brommonschenkel, pelas sugestões, correções e críticas; ao Dr. Álvaro Manuel Rodrigues Almeida, pelo material vegetal e pelas sementes de soja, e pelas inúmeras sugestões; ao Prof. Murilo Geraldo de Carvalho, pela revisão crítica do manuscrito; ao Prof. Francisco Murilo Zerbini, pela orientação durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO	IV
ABSTRACT	VI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1. Geminiviridae	6
2.2. <i>Begomovirus</i>	7
2.3. Características moleculares dos begomovírus	9
2.4. Mecanismos de variabilidade genética	13
2.5. Diagnose de doenças causadas por begomovírus	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Identificação de begomovírus associados à cultura da soja	20
3.1.1. Coleta das amostras e manutenção dos isolados virais	20
3.1.2. Extração de DNA viral e PCR	20
3.1.3. Sequenciamento do produto de PCR	23
3.1.4. Análises comparativas das sequências	23
3.2. Desenvolvimento de ferramentas moleculares para identificação de begomovírus associados à cultura da soja	24
3.2.1. Clonagem dos fragmentos de PCR	24
3.2.2. Desenvolvimento de sondas não-radioativas e hibridizações	25
3.2.3. Síntese de oligonucleotídeos específicos e reações de PCR	26
3.3. Avaliação da ocorrência de begomovírus associados à cultura da soja no campo	27
4. RESULTADOS	30
4.1. Identificação de begomovírus associados à cultura da soja	30
LeMV-rubi	31
4.2. Desenvolvimento de ferramentas moleculares para identificação de begomovírus associados à cultura da soja	34
4.3. Avaliação da ocorrência de begomovírus associados à cultura da soja no campo	37
5. DISCUSSÃO	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

RESUMO

MELLO, Raquel Neves de, D.S., Universidade Federal de Viçosa. Novembro de 2001. **Begomovírus em soja no Brasil e ferramentas moleculares para sua identificação.** Orientador: Francisco Murilo Zerbini Júnior. Conselheiros: Elizabeth Pacheco Batista Fontes e Murilo Geraldo de Carvalho.

Trinta e duas amostras de plantas de soja, feijão e plantas daninhas associadas, apresentando sintomas de viroses, foram coletadas entre fevereiro e julho de 1999 nos Estados do Paraná, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Goiás. A infecção viral foi verificada via PCR utilizando-se oligonucleotídeos universais para begomovírus, e 15 dessas amostras apresentaram resultado positivo. Sequenciamento direto dos produtos de PCR e comparação com seqüências de nucleotídeos conhecidas indicaram infecção por *Leonurus mosaic virus* (LeMV) em soja e *Leonurus sibiricus*, e por *Bean golden mosaic virus* (BGMV) em feijoeiro, além de três outros vírus desconhecidos. Um deles, “vírus A”, estava presente em soja e *Sida* sp., um segundo, “vírus B”, estava presente em *Sida* sp., e o terceiro, “vírus C”, estava presente em *Euphorbia* sp. Foram geradas sondas para detecção geral e específica desses vírus. Uma sonda geral, consistindo de um fragmento de 1.100 nucleotídeos (nt) dos DNAs-A de BGMV, LeMV e “vírus B”, e do DNA-A completo do *Tomato rugose mosaic virus* (TRMV), foi utilizada como ferramenta para a detecção de BGMV, LeMV, “vírus A”, “vírus B” e “vírus C” em 380 amostras de soja, outras leguminosas e plantas daninhas associadas, coletadas entre fevereiro e abril de 2001 nos Estados do Paraná, Minas Gerais, Goiás e São Paulo. Trinta e duas das 147 amostras de soja com sintomas de infecção viral, 37 das 83 amostras de plantas daninhas e uma das quatro amostras de feijoeiro estavam infectadas por begomovírus. Nenhum desses vírus foi detectado em seis plantas sintomáticas de *Crotalaria* sp., ou em 140 amostras de soja sem sintomas macroscópicos. Posteriormente, cinco sondas individuais, cada uma preparada a partir de um fragmento de 500 nt do DNA-B de BGMV, LeMV, “vírus A”, “vírus B” e “vírus C”, foram utilizadas para identificar esses vírus nas 70 amostras positivas. “Vírus A” foi encontrado em nove amostras de soja de Goiás e em três de *Sida* spp. do Paraná, e LeMV em sete amostras de *L.*

sibiricus do Paraná. BGMV, “vírus B” e “vírus C” não foram encontrados. As sequências de aminoácidos do terminal amínico da proteína capsidial dos “vírus A”, “B” e “C” apresentaram 83% de homologia com BGMV, 79% com SiGMV e 89% com TGMV, respectivamente. Os resultados indicam que há begomovírus infectando naturalmente soja no Brasil, que alguns desses vírus são provavelmente espécies ainda não descritas e que esses vírus estão dispersos pelas principais regiões produtoras do país.

ABSTRACT

MELLO, Raquel Neves de, D.S., Universidade Federal de Viçosa. November 2001. **Begomoviruses in soybean in Brazil and molecular tools for their identification.** Advisor: Francisco Murilo Zerbini Júnior. Committee members: Elizabeth Pacheco Batista Fontes and Murilo Geraldo de Carvalho.

Thirty-two leaf samples of soybean, bean and weeds with virus-like symptoms were collected from February to July 1999 in the states of Paraná, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul and Goiás. Viral infection was verified by PCR, using universal begomovirus primers, and 15 of these samples tested positive. Direct sequencing of PCR products and comparison to known nucleotide sequences indicated that *Leonurus mosaic virus* (LeMV) infected soybean, and *Leonurus sibiricus*, *Bean golden mosaic virus* (BGMV) infected bean. Three additional, unknown viruses were also detected. One of them, "virus A", infected soybean and *Sida* sp.; a second, "virus B", infected *Sida* sp.; the third one, "virus C", infected *Euphorbia* sp. Probes for general and specific detection of these viruses were generated. A general probe, consisting of a mixture of the same 1.100 nucleotide (nt) fragment of the DNA-A from BGMV, "virus A", and "virus B", plus the *Tomato rugose mosaic virus* (TRMV) full length DNA-A, was used as a tool to detect BGMV, LeMV, "virus A", "virus B" and "virus C" in 380 soybean, other *Fabaceae* and associated weed samples, collected from February to April 2001 in the states of Paraná, Minas Gerais, Goiás and São Paulo. Thirty two out of 147 symptomatic soybean samples, 37 out 83 weed samples, and one out four bean samples were found to be infected. No infection was found in six *Crotalaria* sp. samples with virus-like symptoms, or in 140 symptomless soybean samples. Next, five individual probes, each made of a 500 nt fragment of the DNA-B from BGMV, LeMV, "virus A", "virus B", or "virus C", were used to identify each of these viruses in the 70 samples that tested positive with the general probe. "Virus A" was found in nine soybean samples from Goiás and in three *Sida* sp. samples from Paraná. LeMV was found in seven *L. sibiricus* samples from Paraná. BGMV, "virus B" and "virus C" were not found. The amino acid sequences of the N-terminal region of the capsid protein of "virus A", "virus B" and "virus C"

displayed 83% homology to BGMV, 79% to SiGMV and 89% to TGMV, respectively. Together, these results indicate that begomoviruses are infecting soybeans and associated species in Brazil, that some of these viruses represent novel species, and that these viruses are present in the main soybean-producing areas in Brazil.

1. INTRODUÇÃO

Os vírus pertencentes ao gênero *Begomovirus* da família *Geminiviridae* apresentam genoma composto por DNA circular de fita simples, infectam dicotiledôneas e são transmitidos por “moscas-brancas”, aleirodídeos do complexo *Bemisia tabaci* (Rybicki et al., 2000). São vírus amplamente distribuídos em todo o mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, ocorrendo em culturas alimentares básicas como mandioca (Legg e Thresh, 2000) e feijão (Morales e Anderson, 2001), e industriais, como o algodão (Briddon e Markham, 2000).

Os geminivírus vêm despertando grande interesse, devido ao aumento da incidência e da severidade de doenças por eles causadas nas últimas duas décadas (Brown e Bird, 1992). A América Latina tem sido relatada como a região mais afetada em termos de número total de espécies conhecidas de begomovírus, de culturas afetadas, de perdas na produção e do tamanho da área agrícola atingida por esses patógenos (revisado por Morales e Anderson, 2001).

No Brasil, os begomovírus têm causado prejuízos em culturas de tomate (Ribeiro et al., 2002) e feijão (Costa, 1987), além de terem sido constatados infectando naturalmente algodão (Costa, 1937, citado por Morales e Anderson, 2001) e soja (Costa et al., 1979), além de grande número de plantas de espécies da vegetação espontânea (Costa e Bennett, 1950; Costa, 1955; Kitajima e Kim, 1987; Faria e Maxwell, 1999). Graves epidemias em tomateiro vêm sendo relatadas em vários estados desde a introdução do biótipo B de *Bemisia tabaci* no país (Ribeiro et al., 2002). Epidemias como essas têm ocorrido em várias partes do mundo e parecem estar associadas com o surgimento de novas variantes/espécies de begomovírus (Zhou et al., 1998; Legg e Thresh, 2000; Ribeiro et al., 2002), favorecida pela co-infecção de plantas com diferentes begomovírus (Harrison et al., 1997). Além da identificação de novos vírus em tomate, várias espécies de begomovírus vêm sendo caracterizadas no Brasil em plantas da vegetação espontânea, como guanxuma (*Sida* spp.) (E.P.B. Fontes, comunicação pessoal) e rubi (*Leonurus sibiricus*) (Faria e Maxwell, 1999), e em plantas cultivadas, como feijão-de-lima (*Phaseolus lunatus*) (Faria e Maxwell, 1999).

Segundo o IBGE (2001), a cultura da soja (*Glycine max* Merrill) ocupou 13,6 milhões de hectares no Brasil em 2000, com produção de 32,7 milhões de toneladas de grãos e valor avaliado em 7,3 bilhões de reais. É o principal produto agrícola da pauta de exportações do Brasil, sendo o país o segundo maior produtor mundial. Os principais estados produtores são o Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Paraná, Goiás e Mato Grosso, mas a cultura vem se expandindo por todas as regiões do país, inclusive Nordeste e Norte (IBGE, 2001).

A soja pode ser infectada naturalmente por diversos vírus, incluindo begomovírus, além de ser um excelente hospedeiro de *Bemisia tabaci*. Uma das espécies de begomovírus que infectam a soja é o vírus do mosaico-dourado do feijoeiro (*Bean golden mosaic virus*, BGMV), responsável por perdas severas na cultura do feijão, sendo fator limitante desta cultura em todas as regiões onde ocorre, notadamente no norte do Paraná, Triângulo Mineiro e Goiás (Costa, 1987). No início da década de 70, o Brasil era o maior produtor mundial de feijão, com 5 milhões de hectares. Com a disseminação de *B. tabaci* nos principais estados produtores, acompanhando a expansão da cultura da soja (Menten e Roston, 1980), o BGMV passou a causar perdas severas em cultivares suscetíveis de feijão, particularmente durante os meses mais secos do ano, quando as populações de *B. tabaci* atingem o pico. Como consequência, plantios da seca de feijão foram drasticamente reduzidos e o feijão foi substituído por outras culturas na maioria das áreas afetadas (Morales e Anderson, 2001). Desta forma, a expansão da cultura da soja no Brasil é indiretamente responsável pelo agravamento da incidência de mosaico-dourado em feijoeiro.

A primeira descrição da doença causada por BGMV se deu a partir de feijoeiros infectados em São Paulo (Costa, 1965). O primeiro relato desse vírus infectando soja naturalmente ocorreu em 1978 (Costa et al., 1979). Estirpes de BGMV foram descritas em diferentes países da América Central e Caribe (Bird et al., 1973) e, mais recentemente, nos EUA (Blair et al., 1995). Apesar de os sintomas causados em feijoeiro pelos isolados brasileiros (BGMV-Br) e da América Central (BGMV-DR, -GA e -PR) serem indistinguíveis, as seqüências de nucleotídeos e as propriedades biológicas indicaram que estes grupos de isolados constituem na verdade duas espécies distintas, o que resultou na proposta de que BGMV-Br mantenha o nome original de BGMV, e os demais

isolados passem a constituir a espécie *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) (Gilbertson et al., 1993a; Padidam et al., 1995).

Além do BGMV, há relatos de infecção natural de soja no Brasil por dois outros begomovírus, o *Euphorbia mosaic virus* (EuMV) e o *Abutilon mosaic virus* (AbMV) (Costa, 1955, 1977). AbMV foi um dos primeiros vírus de plantas citados na bibliografia científica, causando variação em espécies ornamentais de *Abutilon*. A doença foi chamada de “clorose infecciosa das malváceas” por Baur, que formulou a hipótese de ser esta uma enfermidade de origem viral (Baur, 1906, citado por Wege et al., 2000). No Brasil, a “clorose infecciosa das malváceas” foi relatada pela primeira vez em algodão (Costa, 1937, citado por Morales e Anderson, 2001). O nome “mosaico do Abutilon” foi dado em 1955 (Costa, 1955) e o AbMV foi caracterizado molecularmente em 1990 (Frischmuth et al., 1990). Muitos isolados de AbMV perderam a capacidade de serem transmitidos por mosca-branca. É possível que este fato seja devido ao uso de propagação vegetativa das plantas de abutilon. Como esses vírus não eram transmitidos por mosca-branca, os postulados de Koch só foram completados recentemente, quando os componentes clonados foram transmitidos por agroinoculação para *Malva parviflora* e desta, por enxertia, para abutilon (Wege et al., 2000).

O EuMV foi descrito pela primeira vez como “mosaico de *Euphorbia prunifolia*” (Costa e Bennett, 1950), no Brasil. Posteriormente, outros isolados de “mosaico de *Euphorbia*” foram relatados na América Central (Bird et al., 1975, citados por Costa, 1976) e do Norte (Kim e Fulton, 1984). Características biológicas, citológicas e bioquímicas sugeriram que esses vírus são isolados da mesma espécie (Costa, 1976; Kim e Fulton, 1984). Infecção natural de plantas de soja por EuMV foi relatada no Brasil em 1977 (Costa, 1977). A única seqüência de nucleotídeos disponível para o EuMV corresponde à região central do gene *cp* (Brown et al., 2001).

Apesar das enormes perdas causadas por geminivírus em diversas culturas e da importância da cultura da soja no Brasil, não existem estudos de incidência relativa de begomovírus em soja, de possíveis efeitos sinérgicos nas infecções mistas neste hospedeiro, das características epidemiológicas das viroses pertinentes e dos graus de suscetibilidade ou tolerância de diferentes cultivares de soja a cada um desses vírus. Isto se deve em parte à dificuldade para se diagnosticar geminivírus, uma vez que até recentemente esta era uma

tarefa trabalhosa e demorada (Wyatt e Brown, 1996), principalmente porque muitos dos begomovírus não são transmitidos via extrato vegetal tamponado, o que constitui enorme dificuldade para mantê-los em pronta disponibilidade. Com isso, os postulados de Koch para essas viroses só podem ser satisfeitos a partir da transmissão pelo vetor, por enxertia, por biobalística ou por agroinoculação.

Apesar de a sorologia congregar as técnicas mais utilizadas no diagnóstico das viroses vegetais em geral, técnicas que utilizam diretamente o DNA viral são as mais empregadas para a identificação de geminivírus, visto que algumas características desse grupo de vírus dificultam o emprego de sorologia (Wyatt e Brown, 1996). Essas características incluem a baixa concentração que esses vírus atingem nos tecidos vegetais, a restrição de muitos deles ao floema, a dificuldade de purificar as partículas virais a fim de utilizá-las como imunógenos, a baixa imunogenicidade inerente aos geminivírus e o pequeno grau de variação antigênica entre as proteínas capsidiais de diferentes begomovírus.

As técnicas mais utilizadas na detecção e identificação de geminivírus em plantas e no inseto-vetor têm sido a reação em cadeia da polimerase, ou PCR (Navot et al., 1992; Rojas et al., 1993; Deng et al., 1994; Mehta et al., 1994), e a hibridização de ácidos nucléicos (Czosnek et al., 1988; Crespi et al., 1991). Como envolvem diversas etapas e demandam muito tempo, são pouco adequadas para a análise de um grande número de amostras, além de não excluïrem erros decorrentes de contaminação entre as amostras. Muitas tentativas vêm sendo feitas objetivando simplificar essas técnicas e torná-las rotineiras (Navas-Castillo et al., 1998; Shamloul et al., 2001).

Desde o registro pioneiro de soja com infecção natural pelo BGMV (Costa et al., 1979), nenhuma menção de outros geminivírus ocorrendo nessa cultura foi feita nas diferentes regiões produtoras no Brasil. A existência de outros begomovírus em soja e em outras hospedeiras freqüentemente associadas à esta cultura torna evidente a necessidade de estudos a respeito da ocorrência desses vírus no campo, a fim de avaliar possíveis prejuïzos para a soja, diretos ou indiretos, atuais ou previsíveis, e estabelecer medidas preventivas de controle.

O exposto fundamenta os objetivos do estudo aqui apresentado, (i) identificar begomovírus infectando soja e outras leguminosas e plantas

daninhas associadas ao seu cultivo, (ii) desenvolver ferramentas moleculares que permitam identificá-los rápida e confiavelmente e (iii) efetuar estimativa inicial de sua ocorrência em alguns dos principais estados produtores da soja no Brasil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Geminiviridae

A família *Geminiviridae* é caracterizada pelo aspecto geminado da partícula viral, contendo DNA de fita simples (ssDNA) circular com 2.500 a 3.000 nucleotídeos (nt) encapsidado por uma única proteína estrutural disposta na forma de 22 capsômeros, conferindo-lhe a aparência de dois icosaedros incompletos, com cerca de 18×30 nm (Lazarowitz, 1992). Atualmente constitui-se em uma das famílias de maior importância econômica dentre os vírus de plantas.

A família compreende os gêneros *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus* e *Topocuvirus* (Rybicki et al., 2000). Os mastrevírus incluem geminivírus com um único componente genômico, que infectam monocotiledôneas e são transmitidos por cigarrinhas (Homoptera:Cicadellidae). O *Maize streak virus* (MSV) é a espécie-tipo, do qual o gênero deriva seu nome. Este gênero inclui alguns patógenos importantes de culturas como o milho e o trigo. Nenhuma espécie deste gênero foi relatada até o presente no Brasil.

Assim como *Mastrevirus*, o gênero *Curtovirus* é constituído por vírus com um único componente genômico e transmitidos por cigarrinhas. Todavia, esses vírus diferem daqueles por infectarem espécies dicotiledôneas. Em *Mastrevirus* existem pelo menos duas exceções, *Tobacco yellow dwarf virus* (TobYDV) e *Bean yellow dwarf virus* (BeYDV), patógenos de dicotiledôneas (Liu et al., 1997), mas que são mantidos neste gênero em razão de sua organização genômica. No DNA dos mastrevírus encontram-se duas regiões intergênicas, uma curta (SIR), com aproximadamente 50 nt, e uma longa (LIR), com aproximadamente 200 nt, enquanto os curtovírus possuem somente a região intergênica longa. O genoma dos mastrevírus apresenta duas ORFs no sentido viral, *mp* e *cp*, e duas no sentido complementar, *repA* e *repB*, enquanto o dos curtovírus apresenta três ORFs no sentido viral, *mp*, *V3* e *cp*, e quatro no sentido complementar, *C4*, *rep*, *C2* e *ren*. O *Beet curly top virus* (BCTV) é a espécie-tipo do gênero *Curtovirus*. No Brasil, já foi descrita uma doença provavelmente causada por curtovírus, o “broto crespo do tomateiro” (Kitajima e Kim, 1987).

As espécies incluídas no gênero *Begomovirus* apresentam dois componentes genômicos (DNA-A e DNA-B), com exceção de alguns isolados do *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) e *Ageratum yellow vein virus* (AYVV), e são transmitidas por mosca-branca (Homoptera:Aleurodidae) para espécies dicotiledôneas. Cada um dos componentes genômicos, com aproximadamente 2.600 nt, é encapsidado em partículas geminadas distintas, sendo necessários os dois componentes para a infecção. O *Bean golden mosaic virus* (BGMV) é a espécie-tipo deste gênero. Entre os begomovírus que apresentam maior importância econômica estão o TYLCV e o *African cassava mosaic virus* (ACMV) (Lazarowitz, 1992; Rybicki, 1994; Timmermans et al., 1994). Diversas viroses hoje atribuídas a begomovírus vêm sendo descritas no Brasil desde 1937.

Recentemente foi reconhecido um quarto gênero de geminivírus, denominado *Topocuvirus*. O membro-tipo, e única espécie do gênero, é o *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV), com um único componente genômico e transmitido por cigarrinhas (Homoptera:Auchenorrhyncha) a espécies dicotiledôneas. O sequenciamento do genoma completo indicou que a espécie surgiu da recombinação entre um ancestral do BCTV e um vírus sem semelhança com qualquer outro geminivírus conhecido (Bridson et al., 1996). O novo gênero foi criado com base na organização do genoma e no relacionamento filogenético com outras espécies de geminivírus (Rybicki, 1994). A criação de um novo gênero com base em características filogenéticas pode indicar uma nova tendência de enfatizar na taxonomia de vírus parâmetros relacionados com o processo evolutivo das espécies.

Atualmente são reconhecidas 67 espécies de geminivírus nos quatro gêneros que compõem a família, além de 17 espécies candidatas (Rybicki et al., 2000).

2.2. *Begomovirus*

As espécies virais classificadas no gênero *Begomovirus* incluem alguns dos principais patógenos de plantas em regiões tropicais e subtropicais do globo (Brown e Bird, 1992; Polston e Anderson, 1997). Os vírus que causam mosaico-dourado do feijoeiro (*Bean golden mosaic virus*, BGMV, no Brasil, e *Bean golden yellow mosaic virus*, BGYMV, na América Central e Caribe)

(Morales e Anderson, 2001), enrolamento amarelo das folhas do tomateiro (*Tomato yellow leaf curl Israel virus - Israel*, TYLCV-Is, no Oriente Médio e nas Américas Central e do Norte, e *Tomato yellow leaf curl virus - Sardinia*, TYLCV-Sar, no Mediterrâneo) (Moriones e Navas-Castillo, 2000) e mosaico da mandioca (*African cassava mosaic virus*, ACMV, e *East African cassava mosaic virus*, EACMV) na África (Legg e Thresh, 2000), são exemplos de doenças causadas por begomovírus e limitantes para a produtividade das respectivas culturas.

Recentemente, o surgimento e a disseminação de diversos novos begomovírus infectando tomateiros nas Américas veio ressaltar de forma dramática o impacto causado por esses patógenos na agricultura (Polston e Anderson, 1997). Epidemias em tomateiro e feijoeiro têm sido associadas a mudanças drásticas nos sistemas de exploração agrícola, com expansão de culturas como a soja, que funcionam como excelentes hospedeiras para a mosca-branca (Morales e Anderson, 2001). *Bemisia tabaci* é uma espécie polífaga com mais de 500 hospedeiros e distribuída pelas regiões tropicais e subtropicais do globo (Morales e Anderson, 2001). O biótipo B de *B. tabaci* (ou *B. argentifolii*) foi introduzido nos EUA em 1986, e em 1989 já era responsabilizado por uma epidemia de *Tomato mottle virus* (ToMoV) em tomates na Flórida, causando graves prejuízos econômicos (Polston e Anderson, 1997). Hoje *B. tabaci* é considerada um complexo de biótipos, com diferentes biótipos ocorrendo em diferentes regiões do mundo (Brown et al., 1995). A capacidade diferenciada de transmissão de espécies de begomovírus por esses diferentes biótipos ainda não está clara. Dezesesseis culturas de *B. tabaci*, oriundas de três continentes, foram capazes de transmitir 12 begomovírus diferentes de vários países (Bedford et al., 1994). Por outro lado, a transmissão de três isolados de *Tomato leaf curl virus* (TLCV) por espécimes de diferentes culturas de *B. tabaci* foi mais frequente quando envolvido o vetor simpátrico do que com o alopátrico (McGrath e Harrison, 1995), indicando uma interação específica de região geográfica entre vírus e vetor. Assim, embora aparentemente todos os biótipos de *B. tabaci* sejam capazes de transmitir begomovírus, é possível que a eficiência de transmissão seja maior para certas combinações biótipo/espécie viral do que para outras.

As recentes epidemias de begomovírus refletem conjunções favoráveis de vários fatores, como abundância de plantas hospedeiras suscetíveis e de

um inseto vetor polífago. Tipicamente, essas epidemias resultam da co-infecção de plantas com diferentes begomovírus, favorecendo o surgimento de novas variantes virais por recombinação ou pseudo-recombinação (Harrison e Robinson, 1999). A introdução e rápida disseminação do biótipo B de *B. tabaci* nas Américas aumentou a dispersão dos begomovírus e as chances de infecção viral múltipla. Esse biótipo é mais fecundo que os outros (Bedford et al., 1994) e apresenta resistência a muitos inseticidas, o que resulta no surgimento de grandes populações. Com essas características e sua ampla gama de hospedeiros, *B. tabaci* biótipo B pode estar transmitindo begomovírus pré-existentes a partir de suas plantas hospedeiras originais, incluindo invasoras, para espécies cultivadas, resultando nas recentes epidemias descritas.

2.3. Características moleculares dos begomovírus

O genoma dos begomovírus existe sob variadas formas. A variação mais evidente é a ausência do DNA-B em algumas espécies. No caso do TYLCV, o DNA-A mostrou-se suficiente para desempenhar todas as funções essenciais do vírus, tanto as relacionadas com a replicação quanto ao movimento (Kheyr-Pour et al., 1991; Navot et al., 1991). A organização genômica dos begomovírus é representada na Figura 1.

Os begomovírus também podem apresentar componentes de DNA distintos do DNA genômico. Em condições experimentais, componentes B defeituosos e interferentes foram identificados em ACMV (Stanley e Townsend, 1985). Num deles, a molécula mostra grande perda nucleotídica, com a remoção do gene *ns* e parte do gene *mp*. Em *Ageratum yellow vein virus* (AYVV), um begomovírus de apenas um componente, foi encontrada uma outra forma defeituosa e interferente, denominada DNA- β , que apresenta somente a região intergênica e parte do gene *rep* (Stanley et al., 1997). De forma análoga à da molécula defeituosa interferente de ACMV, o DNA- β de AYVV acumula-se até atingir concentrações elevadas e reduz o acúmulo do DNA genômico, atenuando os sintomas da infecção viral (Stanley e Townsend, 1985; Stanley et al., 1997). Um DNA satélite associado a um isolado de TLCV foi descrito por Dry et al. (1997). Esse satélite é formado por uma pequena molécula de DNA circular, de 682 nucleotídeos, sem qualquer homologia significativa de

seqüência com o TLCV, exceto a seqüência conservada TAATATTAC. Essas modalidades de DNA extra-genômico podem ser encontradas em begomovírus mantidos sob condições experimentais. Entretanto, não se sabe se essas formas de DNA ocorrem naturalmente em plantas infectadas, se são estáveis em condições de campo e qual o seu possível papel na epidemiologia das respectivas doenças.

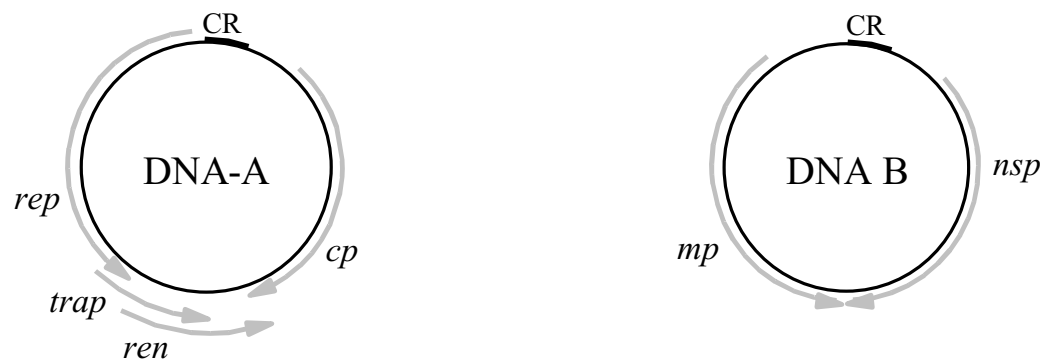


Figura 1. Representação esquemática do genoma de um *Begomovirus* típico. As setas indicam os genes localizados nas fitas viral e complementar dos componentes genômicos virais.

Variações mais sutis são encontradas dentro do genoma dos begomovírus. Entre aqueles que apresentam dois componentes, é maior a variabilidade de seqüência no DNA-B, entre diferentes isolados, do que no DNA-A. Entretanto a parte do genoma que mostra maior variação entre diferentes begomovírus é a região comum (RC). Entre os dois componentes de DNA de uma mesma espécie de begomovírus ela é idêntica ou muito similar, exceto em *Cabbage leaf curl virus* (CLCV), que apresenta 80% de homologia

entre as seqüências das RCs do DNA-A e do DNA-B (Hill et al., 1998). A RC é onde se inicia o processo de replicação dos geminivírus (Fontes et al., 1994a, b). Ela é formada por cerca de 200 nucleotídeos com elementos de seqüência altamente conservados, tais como a referida seqüência TAATATTAC, sítio de clivagem da proteína Rep; as “caixas” TATA, envolvidas na iniciação da transcrição do gene *cp*, na fita viral, e a do gene *rep*, na fita complementar; e iterons, cujas seqüências, embora com alguma especificidade para cada vírus, estão arranjadas – em sua posição relativa, espaçamento e orientação - de forma a mostrar alguma conservação entre grupos diferentes de begomovírus, especialmente os dos Hemisférios Ocidental e Oriental (Argüello-Astorga et al., 1994 a, b). Entretanto, exceto pelas seqüências conservadas citadas, há muito pouca similaridade entre as RCs de diferentes begomovírus (Harrison e Robinson, 1999).

A região mais conservada do genoma dos begomovírus é encontrada no gene *cp*, codificador da proteína capsidial (CP). As comparações entre as seqüências de aminoácidos da CP levam à curiosa conclusão de que em begomovírus infectando diferentes hospedeiras numa mesma região geográfica elas se mostram mais relacionadas entre si do que as dos mesmos vírus causando doenças, com sintomas indistinguíveis, em outras regiões (Hong e Harrison, 1995; Padidam et al., 1995; Rybicki, 1994). A comparação de padrões de epitopos da CP de diferentes begomovírus reflete este mesmo fenômeno (Swanson et al., 1992; Natesham et al., 1996). Árvores filogenéticas construídas a partir de seqüências de aminoácidos da CP de begomovírus de diferentes partes do mundo mostram dois ramos distintos, um contendo os vírus do Hemisfério Ocidental e outro os do Hemisfério Oriental. Esta última ramificação pode ainda ser dividida em dois sub-grupos, o primeiro compreendendo os vírus da África e Mediterrâneo e o segundo os vírus da Ásia. Pelo menos duas espécies virais, *Tobacco leaf curl virus* (TbLCV) na China e *Tomato leaf curl Australia virus -Australia* (ToLCV-Au) na Austrália, não se encaixam em nenhum dos dois sub-grupos do Hemisfério Oriental e, talvez, formem um agrupamento distinto (Harrison e Robinson, 1999).

A proteína Rep, codificada pelo gene *rep*, é essencial para a replicação viral, pois cliva a forma replicativa do vírus (dsDNA) no nonanucleotídeo conservado TAATATTAC, iniciando a replicação, e religa as novas unidades genômicas virais, ao fim da replicação, uma vez concluído o processo de

replicação via círculo rolante (Gutierrez, 1999). Dentre todos os produtos codificados pelos genes presentes no DNA-A, a proteína Rep é a que mais varia entre diferentes begomovírus. Este fato reflete a grande variação encontrada na RC, uma vez que Rep se liga aos iterons da RC de maneira específica com base na seqüência de nucleotídeos desses iterons. Essa especificidade de interação mantém a similaridade entre as RCs dos DNAs-A e -B, visto que ambos necessitam de Rep para a replicação. Assim como para CP, existe uma clara divisão entre as Reps de diferentes espécies de begomovírus.

Ren é uma proteína acessória, amplificadora da replicação viral, enquanto que TrAp é ativadora da transcrição dos genes de sentido viral, *cp* e *ns* (Gutierrez, 1999). Essas proteínas têm um grau de variabilidade intermediária entre CP e Rep e mostram a mesma divisão entre begomovírus dos Hemisférios Ocidental e Oriental.

Os genes do DNA-B, *mp* e *ns*, apresentam maior variabilidade do que os do DNA-A. Ambos os produtos gênicos estão envolvidos no movimento do vírus na planta. A proteína NS é responsável pelo tráfego do DNA viral do núcleo para o citoplasma, enquanto a proteína MP está envolvida na passagem intercelular do DNA viral via plasmodesmas (Noueiry et al., 1994; Sanderfoot et al., 1996). Embora as análises filogenéticas baseadas nesses genes agrupem os begomovírus do Hemisfério Ocidental, especialmente para as seqüências de *ns*, as seqüências de begomovírus do Hemisfério Oriental diferem muito entre si (Rybicki, 1994).

Outras ORFs, como AV2 e AC4, foram identificadas em alguns, mas não em todos os begomovírus estudados. AV2 se sobrepõe parcialmente à CP e é encontrada somente em begomovírus do Hemisfério Oriental. O seu produto parece estar envolvido no movimento sistêmico de TYLCV, um begomovírus que não possui o DNA-B. Já AC4 está inserida no gene *rep*, mas em outra fase de leitura. Mutações em TGMV e ACMV que alteraram somente esta ORF, sem afetar Rep, não tiveram efeito na infectividade ou na produção de sintomas (Elmer et al., 1988; Eteessami et al., 1991). Já em TYLCV-Sar e ToLCV-Au, mutações que romperam a ORF AC4 levaram à atenuação de sintomas e diminuição do movimento sistêmico sem alterar a replicação em protoplastos, indicando que AC4 pode ser funcional nos begomovírus que apresentam apenas um componente genômico (Jupin et al., 1994; Rigden et al., 1994).

2.4. Mecanismos de variabilidade genética

Mutações pontuais parecem ser a causa principal de divergência entre isolados de uma determinada espécie de begomovírus. Embora poucas informações estejam disponíveis sobre diferenças entre as populações de moléculas genômicas que compõem um isolado, trabalhos com MSV (membro-tipo do gênero *Mastrevirus*) indicam que cada isolado deste vírus é composto por clones estreitamente relacionados e que diferem por mutações pontuais distribuídas ao longo do genoma (Isnard et al., 1998). Mutações silenciosas são bastante numerosas entre isolados de begomovírus, enquanto mutações que alteram aminoácidos parecem ser reprimidas por forte pressão de seleção para a manutenção da função ótima das proteínas. Comparações de seqüências de nucleotídeos de parte dos genes *rep* e *cp* e da RC de 20 isolados de BGMV mostraram que há baixa divergência entre eles (Faria e Maxwell, 1999). As mutações encontradas tanto em *rep* quanto em *cp* são na maioria silenciosas, e entre as que conduziram a alguma mudança de aminoácidos muitas foram conservadoras, ou seja, o aminoácido foi trocado por outro com as mesmas características bioquímicas.

Por outro lado, a grande variabilidade genética encontrada entre diferentes espécies de begomovírus resulta mais de uma variedade considerável de mecanismos alternativos do que de mutações pontuais. Esses mecanismos incluem pseudo-recombinação e recombinação, esta última tanto intra- quanto inter-específica. Ocorre a pseudo-recombinação quando há troca entre os DNAs A e B de isolados ou estirpes diferentes de uma mesma espécie de begomovírus, o que enseja um rearranjo entre os genes equivalentes desses isolados/estirpes (Harrison e Robinson, 1999). Tal rearranjo não costuma ser bem sucedido quando há envolvimento de espécies distintas, porque aparentemente os componentes B heterólogos deixam de ser replicados eficientemente.

Para a pseudo-recombinação ocorrer vantajosamente entre duas espécies distintas estas devem ser estreitamente relacionadas, o que se verificou, por exemplo, entre *Tomato mottle virus* (ToMoV) e *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV). Neste caso, os dois pseudo-recombinantes possíveis mostraram-se viáveis, mas induziram sintomas atenuados e produziram

quantidade relativamente baixa de DNA-B (Gilbertson et al., 1993). Em outro exemplo, mostrou-se viável apenas um dos dois possíveis pseudo-recombinantes entre duas espécies estreitamente relacionadas, SiGMV e AbMV. Ainda assim, este pseudo-recombinante causou infecção somente em algumas espécies de *Nicotiana*, mas não em *Sida rhombifolia* ou em *Malva parviflora*, as hospedeiras das quais procederam os progenitores (Hofer et al., 1997). Nesses dois casos, as sequências das RCs dos dois vírus progenitores apresentavam forte similaridade, mas também mais diferenças do que é esperado para estirpes do mesmo vírus, e os pseudo-recombinantes, quando viáveis, estavam menos adaptados aos hospedeiros originais do que seus progenitores.

A formação de pseudo-recombinantes viáveis depende da compatibilidade entre os DNAs-A e B, o que parece refletir a similaridade em função, e usualmente em seqüência, de suas RCs (Lazarowitz et al., 1992). Entre os critérios sugeridos pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) para o reconhecimento de uma nova espécie de begomovírus, está a capacidade, ou incapacidade, de formar pseudo-recombinantes viáveis com vírus afins (Rybicki et al., 2000). Este critério, entretanto, não pode ser utilizado para os vírus que não possuem DNA-B, e nem sempre é aplicável, pois depende da existência de clones infecciosos dos vírus. Como a capacidade de formação de pseudo-recombinantes é altamente dependente da seqüência da RC, a determinação de uma espécie com base na comparação desta seqüência pode ser uma solução viável para a maioria dos isolados (Harrison e Robinson, 1999).

Recombinação, especialmente inter-específica, parece ser o mecanismo-chave pelo qual são geradas novas espécies virais, possibilitando a melhor adaptação biológica dos pseudo-recombinantes derivados de espécies estreitamente relacionadas, e mantendo o fluxo de material genético entre diferentes begomovírus existentes na mesma região geográfica (Harrison e Robinson, 1999). A primeira evidência de que recombinação é um evento que ocorre naturalmente entre begomovírus foi encontrada entre as estirpes fraca e severa de TYLCV (Antignus e Cohen, 1994). A comparação das sequências de nucleotídeos dos DNAs-A das duas estirpes sugeriu que a região compreendida pelo gene *rep* e pela RC foi adquirida de diferentes progenitores não identificados, enquanto o restante do genoma veio de um mesmo

progenitor. As duas estirpes apresentaram 87% e 78% de identidade entre os nucleotídeos do gene *rep* e da RC, respectivamente, em contraste com os 98% do restante das respectivas moléculas.

O primeiro exemplo conhecido de recombinante natural entre duas espécies distintas de begomovírus foi relatado para um geminivírus altamente agressivo infectando mandioca em Uganda (UgV) (Legg e Thresh, 2000). A sequência de nucleotídeos de seu DNA-A é essencialmente idêntica à do EACMV, exceto por 60% dos nucleotídeos centrais do gene *cp*, que são essencialmente idênticos aos do ACMV (Zhou et al., 1997). Em UgV, o sítio de recombinação 5' está localizado em uma região onde as seqüências dos progenitores são iguais em 24 nucleotídeos, e o sítio 3' numa região onde as seqüências são iguais em oito nucleotídeos, sugerindo um evento de recombinação homóloga.

A multiplicidade de variantes encontradas entre isolados de begomovírus tem implicações na taxonomia destes vírus e, em muitos casos, dificulta o delineamento preciso das espécies virais (Harrison e Robinson, 1999). Um dos problemas taxonômicos fundamentais neste grupo de vírus é o de como nomear espécies distintas e causadoras de viroses macroscopicamente indistinguíveis. Este é o caso, por exemplo, das várias espécies de TYLCV. O outro problema está relacionado aos vírus recombinantes. Se parte do genoma de um isolado é proveniente de uma espécie já estabelecida, e o restante é proveniente de outra espécie, este vírus seria um isolado de qual das duas espécies progenitoras? Ou deveria ser considerado uma espécie distinta? Talvez muitos begomovírus hoje presentes numa mesma e extensa região geográfica, como o subcontinente indiano ou as Américas, possam ser considerados uma única super-espécie. Porém, mais importante que o assentamento taxonômico de novas formas virais é reconhecer que sérias epidemias podem surgir de variantes novas, como o referido UgV em Uganda, e várias formas de *Cotton leaf curl virus* (CoLCV) no Paquistão. Portanto, a aplicação do conceito de espécie em begomovírus permanece controversa, e os limites entre espécies têm sido estabelecidos mais por uma questão de conveniência do que de lógica (Harrison e Robinson, 1999).

2.5. Diagnóse de doenças causadas por begomovírus

Um diagnóstico preciso e precoce das viroses vegetais é um componente crucial do sistema de manejo da cultura no campo. Os métodos tradicionais de diagnóstico, como ensaios de gama de hospedeiros e técnicas sorológicas, são bastante utilizados no diagnóstico de inúmeras viroses vegetais. Essas técnicas, no entanto, têm pouca aplicação entre os begomovírus. Estes apresentam várias características que dificultam o uso de técnicas tradicionais, entre elas, dificuldade de transmissão de muitos desses vírus via extrato vegetal tamponado, presença dos mesmos sintomas em plantas infectadas por vírus distintos, difícil purificação das partículas na sua forma estável, vírions pouco imunogênicos e proteínas capsidiais antigenicamente indistintas. Durante muitos anos esses vírus foram pouco estudados, em parte porque as doenças por eles causadas não resultavam em perdas econômicas importantes, mas principalmente devido à dificuldade para diagnosticá-las. Este é o caso do BGMV, cujos estudos só foram intensificados nos últimos 15 anos com a utilização de técnicas baseadas na detecção do DNA viral, embora cause uma doença importante no Brasil há pelo menos três décadas.

As técnicas mais utilizadas na detecção e identificação de geminivírus em plantas e no inseto-vetor têm sido a reação em cadeia da polimerase, ou PCR (Navot et al., 1992; Rojas et al., 1993; Deng et al., 1994; Mehta et al., 1994), e a hibridização de ácidos nucleicos (Czosnek et al., 1988; Crespi et al., 1991).

As técnicas de hibridização são baseadas na habilidade de uma fita simples de ácido nucleico em hibridizar com uma fita complementar, sob condições apropriadas. Estas técnicas tornaram-se rotineiras quando a tecnologia de DNA recombinante possibilitou a produção de sondas complementares de ácido nucleico (cDNA) com especificidade suficiente para uso em larga escala (Karjalainen, 1987). Estas sondas são facilmente obtidas e podem ser armazenadas sob a forma de culturas bacterianas, sendo facilmente reativadas quando necessário, gerando uma quantidade ilimitada de sondas.

A técnica de hibridização baseia-se na clonagem de uma seqüência específica do ácido nucleico do vírus (sonda). A especificidade é determinada pelo tamanho e pela seqüência de nucleotídeos da sonda. O ácido nucleico (fita simples) que se quer detectar deve ser então imobilizado

em um suporte sólido (normalmente uma membrana de nitrocelulose ou náilon) para que hibridize com a sonda utilizada para a detecção (Zerbini et al., 2001). As condições de hibridização podem ser ajustadas, variando-se a temperatura, a concentração de sais ou a concentração de formamida, a fim de se controlar a especificidade (quantidade permitida de pares de bases não pareadas) (Hull, 1986; Batista, 1993). Essa consideração é crítica, já que o grau de hibridização observado entre organismos relacionados pode ser controlado pelas condições do teste (Miller & Martin, 1988).

Para que o DNA clonado seja utilizado como sonda é necessário marcá-lo, utilizando-se para isto isótopos radioativos (o mais comum é o fósforo 32) por métodos como o “nick-translation” (cortes na fita de DNA pela ação da DNase e reparo pela ação da DNA polimerase, incorporando os nucleotídeos marcados) ou o método do “random priming” (desnaturação da fita dupla do plasmídeo e alinhamento de hexanucleotídeos de seqüências aleatórias, onde ocorre a síntese de uma fita complementar pela ação da DNA polimerase, com incorporação do nucleotídeo radioativos). Os métodos de incorporação de compostos não-radioativos são semelhantes, mas neste caso um dos quatro nucleotídeos é marcado com o composto não-radioativo (por exemplo, digoxigenina ou fluoresceína), seguindo-se a detecção baseada em ELISA, por meio da ligação com complexos enzimáticos que formam um produto insolúvel na presença do substrato (Harper e Creamer, 1995; Sanchez-Navarro et al., 1996) ou formação de substrato quimioluminescente detectado em filme de raio-X. Os métodos não-radioativos têm a vantagem óbvia de não envolverem o uso de radioisótopos. No entanto, muitos dos reagentes são tóxicos e na prática devem-se tomar os mesmos cuidados para evitar contaminação do operador que os observados para os métodos radioativos.

As principais técnicas que usam a hibridização de ácidos nucléicos são “dot blot”, “Southern blot” e “Northern blot”. “Dot blot” consiste na aplicação da amostra triturada na forma de gotas sobre a membrana (Meinkoth e Wahl, 1984). O processo é facilitado com o uso de equipamentos que aplicam vácuo sobre a membrana. “Squash blot” (Gilbertson et al., 1991b), uma variação do “dot blot”, é a mais simples dessas técnicas e consiste na trituração do tecido a ser analisado diretamente sobre a membrana. “Southern blot” (Southern, 1975) consiste na purificação do DNA a ser analisado e separação deste por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida. O DNA é então desnaturado

e transferido para a membrana, usualmente por capilaridade. “Northern blot” é uma variação do “Southern blot” e baseia-se na imobilização e análise de RNA.

A reação em cadeia de polimerase (“polymerase chain reaction”, PCR) é uma técnica bastante simples, versátil e de ampla aplicação, que possibilita a produção de um grande número de cópias de uma seqüência específica do DNA (Saiki et al., 1985; Mullis, 1990). A técnica é baseada na amplificação, em progressão geométrica, da seqüência de interesse do DNA limitada por dois oligonucleotídeos iniciadores (“primers”), e apresenta uma sensibilidade muito superior à de qualquer outra técnica. Os principais obstáculos para o seu uso em larga escala são a alta freqüência de falsos positivos, devido principalmente à contaminações de reagentes e instrumental, e a sensibilidade da enzima utilizada na reação à presença de substâncias inibidoras em certos extratos vegetais.

Uma reação de PCR é composta por ciclos repetitivos, e no final de n ciclos, a reação contém um máximo de 2^n moléculas de fita dupla de DNA para cada molécula inicialmente presente na amostra, que são cópias da seqüência de DNA entre os oligonucleotídeos. Cada ciclo é composto por três passos: desnaturação das fitas duplas do DNA molde, alinhamento dos oligonucleotídeos com o DNA, e polimerização da nova fita de DNA pela ação da DNA polimerase. A especificidade da amplificação pode ser controlada por meio do tempo e da temperatura utilizados na fase de alinhamento dos oligonucleotídeos com o DNA. Estes parâmetros são dependentes da composição de bases e tamanho dos oligonucleotídeos e de sua concentração. O comprimento dos oligonucleotídeos, normalmente de 15 a 25 pares de bases, deve ser suficiente para que não haja alinhamento aleatório em regiões do DNA que não sejam a seqüência alvo.

Muitos são os exemplos do uso dessas técnicas para a detecção de begomovírus e outros geminivírus (Eiras et al., 1998). Técnicas de eletroforese em gel de agarose, hibridização molecular e PCR foram utilizadas para a detecção e estudo da distribuição de geminivírus em áreas de cultivo de olerícolas no México e sul dos Estados Unidos, possibilitando uma análise da dinâmica de ocorrência temporal e espacial desses vírus (Torres-Pacheco et al., 1992). A avaliação de uma epidemia de BGMV no sul da Flórida também foi feita por meio de hibridização, utilizando sondas específicas para o vírus em questão (Blair et al., 1995). A incidência do *Beet curly top virus* (BCTV) na

Califórnia foi determinada por meio da técnica de hibridização “dot blot”, e o vírus foi encontrado em 14 famílias de plantas daninhas diferentes e em diversas culturas (Creamer et al., 1996). Em trabalho realizado por Wyatt & Brown (1996), oligonucleotídeos universais para o gênero Begomovirus foram utilizados para a detecção de isolados de begomovírus via PCR.

As aplicações das ferramentas moleculares não se restringem à diagnose, possibilitando a determinação da concentração de vírus nos tecidos vegetais, a localização das partículas virais em nível subcelular e o estudo das interações vírus-hospedeiro, possibilitando um maior entendimento dos mecanismos moleculares de infecção.

As técnicas moleculares também se aplicam a estudos taxonômicos, por meio da comparação de seqüências de nucleotídeos ou de aminoácidos, a fim de determinar de forma mais precisa o relacionamento entre isolados. Padidam et al. (1995) compararam as seqüências genômicas de 36 geminivírus para classificá-los, e sugerem que a análise de uma pequena região do genoma (a região 5' do gene *cp*) é suficiente para classificar um isolado, utilizando oligonucleotídeos altamente conservados para clonagem e sequenciamento desta região. Frischmuth et al. (1997) utilizaram a clonagem e o sequenciamento de nucleotídeos para a análise de homologia entre dois begomovírus infectando *Sida rhombifolia* em Honduras, comparando-as com outros vírus que infectam *S. rhombifolia* na Costa Rica. Gilbertson et al. (1993) observaram a existência de diversidade genética entre begomovírus que causam o mosaico-dourado do feijoeiro, por meio da comparação da seqüência de nucleotídeos de isolados do BGMV do Brasil e de Porto Rico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Identificação de begomovírus associados à cultura da soja

3.1.1. Coleta das amostras e manutenção dos isolados virais

A fim de obter uma estimativa inicial da ocorrência de geminivírus em soja e em invasoras associadas ao seu cultivo no campo, amostras foliares foram coletadas pelo Dr. Álvaro M. R. Almeida (Embrapa/CNPSoja). Trinta e quatro amostras de plantas de soja, *Phaseolus vulgaris* (feijoeiro comum), *Sida* spp. (guanxuma), *Euphorbia* spp. (leiteiro ou amendoim-bravo) e *Leonurus sibiricus* (rubi), com sintomas de infecção por geminivírus, foram coletadas nos Estados de Minas Gerais, Paraná, Goiás e Mato Grosso do Sul, entre fevereiro e julho de 1999 (Figura 2, Quadro 1). Cada amostra constituiu-se de folhas da mesma planta. Todas as amostras coletadas foram identificadas e armazenadas em ultracongelador (-80°C). Onze amostras de plantas de soja sem sintomas foram também coletadas aleatoriamente, a fim de verificar a ocorrência de infecção latente (assintomática).

Os isolados virais foram mantidos em *Nicotiana benthamiana* após transmissão via bombardeamento de partículas, de acordo com o protocolo de Aragão *et al.* (1996). A forma replicativa (RF) do genoma viral foi extraída a partir das plantas infectadas utilizando-se o método de Gilbertson *et al.* (1991) e utilizada para o bombardeamento.

3.1.2. Extração de DNA viral e PCR

Para verificar a presença de begomovírus nas amostras coletadas, todas elas foram submetidas a amplificação por PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos universais PAL1v1978 e PAR1c496 (Rojas *et al.*, 1993), que amplificam um fragmento do DNA-A viral correspondente à região 5' do gene *rep*, à região comum e à região 5' do gene *cp* (Figura 3). Para tanto, o DNA viral foi extraído segundo o método de Dellaporta *et al.* (1983) e submetido a amplificação por PCR com os oligonucleotídeos citados. A reação de PCR foi preparada em um volume total de 25 µl, contendo tampão 10× (Tris-HCl 100 mM, pH 8,3 e KCl 500 mM), MgCl₂ 2,5 mM, mistura de dNTPs a 0,2 mM, 0,4

μM de cada oligonucleotídeo, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase e 5 μl de DNA molde, completando-se o volume com água. Foram realizados 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. Os produtos de amplificação foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose (0,9% p/v). Após a eletroforese o gel foi corado com brometo de etídeo a fim de verificar a presença de uma banda entre 1.100 e 1.300 nucleotídeos (nt), correspondente ao fragmento amplificado de acordo com o par de oligonucleotídeos utilizado.

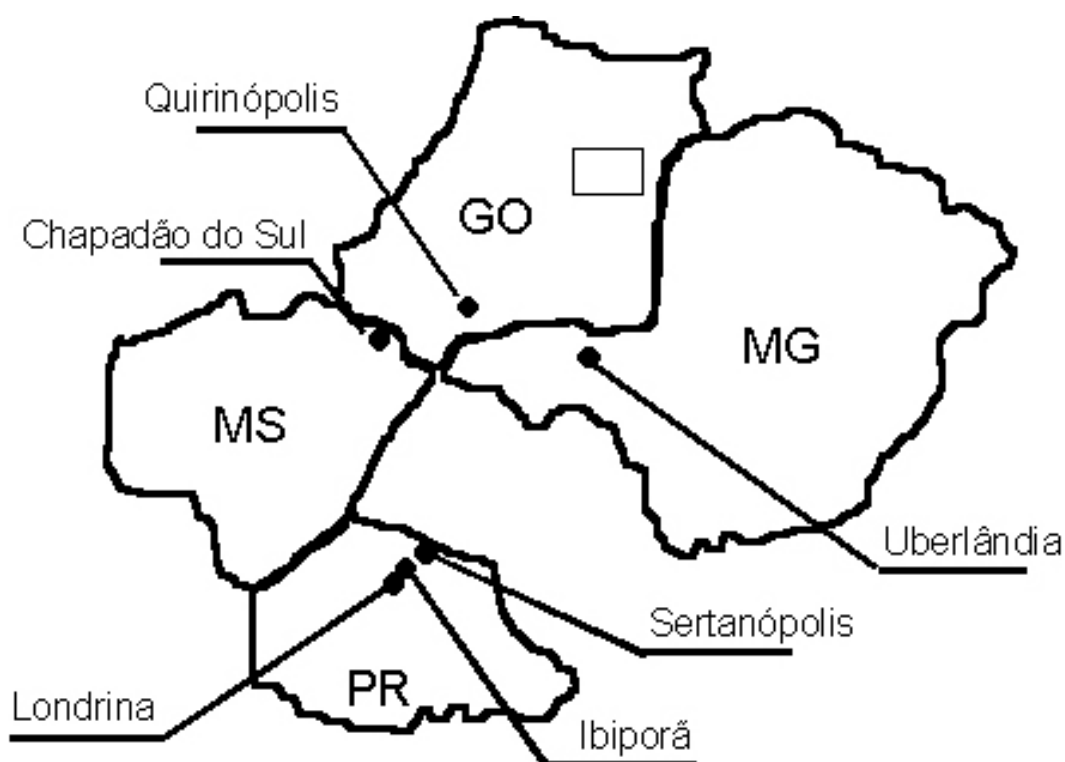


Figura 2. Localização dos Estados e municípios onde foram coletadas as amostras de plantas utilizadas para a identificação de begomovírus associados à cultura da soja.

Quadro 1. Espécies de plantas utilizadas na identificação de begomovírus associados à cultura da soja.

		<i>Glycine max</i>	<i>G. max</i> , sem sintoma	<i>Phaseolus vulgaris</i>	agrofava	<i>Leonurus sibiricus</i>	<i>Sida</i> spp.	<i>Euphorbia</i> spp.
Paraná	Ibiporã	-	-	-	-	1	1	-
	Londrina	16	11	1	1	5	1	3
	Sertanópolis	-	-	-	-	-	1	-
Minas Gerais	Araguari	-	-	-	-	-	1	-
Goias	Quirinópolis	-	-	-	-	-	1	-
Mato Grosso do Sul	Chapadão do Sul	-	-	-	-	-	1	-

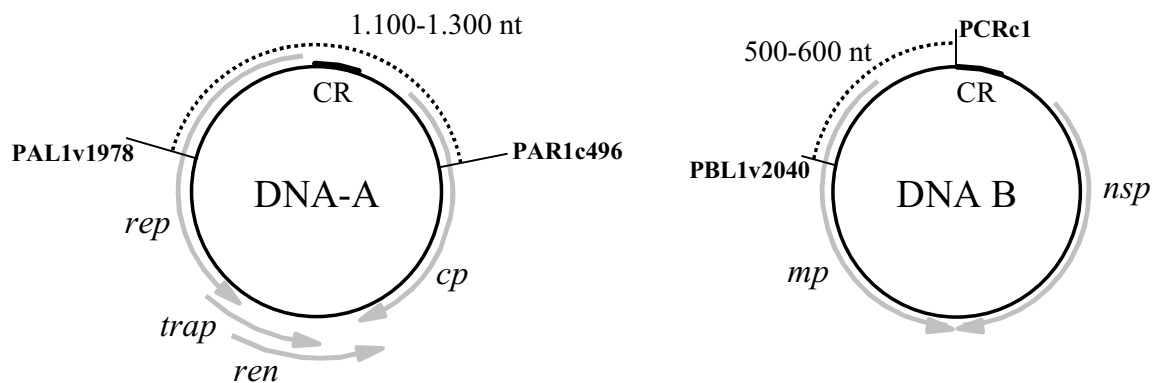


Figura 3. Representação esquemática do genoma de um begomovírus típico, indicando as posições de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR e os comprimentos previstos para os fragmentos amplificados. As setas indicam os genes localizados nas fitas viral e complementar de cada componente genômico.

3.1.3. Sequenciamento do produto de PCR

As amostras positivas foram submetidas a sequenciamento direto do produto de PCR. Novas reações, num volume total de 100 µl, foram realizadas com o DNA extraído dessas amostras, utilizando-se os mesmos reagentes e condições descritos no item anterior. Os produtos amplificados foram purificados por cromatografia de afinidade utilizando-se o kit “Concert Rapid PCR Purification System” (Gibco). A concentração final de DNA foi estimada por meio de eletroforese em gel de agarose (0,9% p/v). A reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se o oligonucleotídeo PAR1c496, que permite a amplificação de um fragmento do DNA-A correspondente à região 5’ do gene *cp* (Figura 3), representativa da variabilidade do genoma (Padidam *et al.*, 1995). A reação de sequenciamento foi realizada com o kit “BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (Perkin Elmer) em um volume final de 20 µl, contendo o oligonucleotídeo PAR1c496 a 0,5 µM e 150 ng de DNA. A mistura foi submetida a uma desnaturação inicial a 96°C por 3 minutos, seguindo-se 25 ciclos de desnaturação a 96°C por 40 segundos, anelamento a 55°C por 20 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos, e analisada em um sequenciador automático ABI 310 (Applied Biosystems).

3.1.4. Análises comparativas das sequências

As sequências foram analisadas com auxílio dos programas GCG (Devereux *et al.*, 1987), BLAST (Altschul *et al.*, 1990), DNAMAN 4.0 (Lynnon Biosoft), Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) e Mega (Kumar *et al.*, 1994). Foram determinadas as espécies de begomovírus com maior identidade com os isolados em questão, através das porcentagens de homologia entre os fragmentos amplificados e essas espécies. Uma árvore filogenética foi preparada, estabelecendo o relacionamento entre os isolados seqüenciados e outros begomovírus. As diferentes espécies virais utilizadas nas comparações de sequências estão listadas no Quadro 2.

Quadro 2. Espécies virais utilizadas nas comparações de sequências.

Nome	Sigla	Número de acesso no GenBank
<i>Abutilon mosaic virus</i>	AbMV	X15984
Barbados tomato virus	BaTV	AF213014
<i>Bean calico mosaic virus</i>	BCaMV	AF110189
<i>Bean dwarf mosaic virus</i>	BDMV	M88179
<i>Bean golden mosaic virus</i>	BGMV	M88686
<i>Cabbage leaf curl virus</i>	CLCV	U65529
<i>Jatropha mosaic virus</i>	JaMV	AF324411
<i>Leonurus mosaic virus</i>	LeMV	U92532
<i>Sida golden mosaic virus</i>	SiGMV	U77964
<i>Soybean crinkle leaf virus</i>	SCLV	AB020977
<i>Squash leaf curl virus</i>	SqLCV	M38183
<i>Tomato dwarf leaf curl virus</i>	TDLCV	AF035225
<i>Tomato golden mosaic virus</i>	TGMV	K02029
<i>Tomato mottle virus</i>	ToMoV	L14461
<i>Tomato rugose mosaic virus</i>	TRMV	AF291706
Tomato severe rugose virus	TSRV	AY029750
<i>Wissadula golden mosaic virus</i>	WGMV	U69280

3.2. Desenvolvimento de ferramentas moleculares para identificação de begomovírus associados à cultura da soja

3.2.1. Clonagem dos fragmentos de PCR

Após verificação da identidade dos isolados, os fragmentos de PCR de pelo menos um isolado de cada espécie viral encontrada foram clonados no vetor pGem-T (Promega), conforme instruções do fabricante. A transformação de *Escherichia coli* e a detecção de DNA plasmidial recombinante foram realizadas de acordo com Sambrook *et al.* (1989). Células competentes de *E.*

coli DH5 α foram transformadas pelo método do choque térmico e plaqueadas em meio 2 \times YT com ampicilina (100 μ g/ml), acrescido de 10 μ l de IPTG (0,2 g/ml) e 50 μ l de X-Gal (20 mg/ml) por placa. As colônias recombinantes foram identificadas pela sua coloração branca, transferidas para meio 2 \times YT líquido com ampicilina (100 μ g/ml) e incubadas à 37°C durante 12 horas sob agitação (250 rpm). Os plasmídeos foram extraídos dessas culturas pelo método da lise alcalina e analisados por meio de eletroforese em gel de agarose (0,9% p/v) a fim de verificar a presença de bandas com aproximadamente 4.000 nt, correspondentes ao DNA plasmidial contendo o inserto viral. A clonagem foi constatada por meio de digestão enzimática, com enzimas cujos sítios de reconhecimento estão presentes no vetor, ou com a enzima *Pst* I, cujo sítio de restrição está presente nos oligonucleotídeos utilizados, a fim de confirmar a presença do fragmento viral amplificado.

Para os isolados cujas seqüências apresentaram baixa homologia com begomovírus previamente caracterizados, um fragmento de 500 nt correspondente à região 5' do gene *mp* foi amplificado por PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos PCRC1 e PBL1v2040 (Rojas *et al.*, 1993), a fim de verificar a presença do DNA-B (Figura 3). As concentrações dos reagentes foram as mesmas descritas no item 3.1.2. A reação de PCR consistiu em 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. O sequenciamento dos fragmentos amplificados foi realizado conforme descrito no item 3.1.3.

3.2.2. Desenvolvimento de sondas não-radioativas e hibridizações

Os fragmentos clonados, de 1.100 nt para o DNA-A e 500 nt para o DNA-B, foram testados como sondas para detecção homóloga e heteróloga, respectivamente, dos vírus encontrados. O DNA-A completo do *Tomato rugose mosaic virus* (TRMV; Fernandes, 2001), também foi testado como sonda heteróloga. Foram utilizados dois kits de marcação não-radioativa, "Dig DNA Labeling and Detection" (Roche) e "Renaissance Random Primer Fluorescein Labeling" (NEN), conforme as instruções dos fabricantes. O primeiro gera sondas marcadas com digoxigenina e as detecta por precipitação do substrato NBT/BCIP. O segundo gera sondas marcadas com fluoresceína e a detecção é feita em filme de raio X, a partir da emissão de luz do substrato quimioluminescente CDP-Star. A especificidade das hibridizações foi

determinada pela temperatura e concentração salina durante a hibridização e as lavagens.

As hibridizações foram realizadas após “Southern blot”, “dot-blot” ou “squash blot”. No “Southern blot”, DNA total (Dellaporta *et al.*, 1983) ou fragmentos de PCR foram aplicados em gel de agarose (0,9% p/v) e submetidos a eletroforese. O DNA foi transferido por capilaridade para membrana de náilon carregada positivamente (Hybond N+, Amersham) de acordo com técnicas padrão (Sambrook *et al.*, 1989) e hibridizado com as sondas de acordo com as instruções do fabricante de cada kit. No “dot-blot”, 40 µl de extrato de plantas infectadas ou de DNA total desnaturado foram aplicados na membrana com o auxílio do aparelho “Bio-Dot” (Bio-Rad), conforme as instruções do fabricante. O extrato de planta foi preparado a partir de um disco de folha de cerca de 5 mm de diâmetro triturado na presença de 40 µl de tampão PEP (1xPBS, 2% PVP, 0,05% Tween 20) e centrifugado a 14.000g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o DNA foi desnaturado utilizando-se 1 volume de SSC 16x e formaldeído 7,5% para aplicação na membrana. Quando DNA total foi utilizado, este foi extraído segundo Dellaporta *et al.* (1983), e desnaturado com SSC 16x e formaldeído 7,5% para aplicação na membrana. “Squash blot” foi preparado a partir de discos de folha de cerca de 5 mm triturados diretamente sobre a membrana.

3.2.3. Síntese de oligonucleotídeos específicos e reações de PCR

Com base nas sequências parciais de nucleotídeos do DNA-A previamente obtidas, foram sintetizados oligonucleotídeos específicos para três das espécie virais encontradas, BGMV, “vírus B” e LeMV. As sequências dos oligonucleotídeos utilizados para detecção específica encontram-se no Quadro 3.

As concentrações dos reagentes e os parâmetros da reação de PCR foram os mesmos descritos no item 3.3.1, exceto a temperatura de anelamento que foi testada para cada par de oligonucleotídeos. Os fragmentos amplificados foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose (0,9% p/v). Após eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídeo a fim de verificar a presença de uma banda com aproximadamente 500 nt.

Quadro 3. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação específica dos isolados virais.

BGMV	5' -CGATGTAATCACCGTC-3' 3' -CGGGTAAGAACAACCCG-5'
“vírus B”	5' -CGCGCGGACACCAGAACTCC-3' 3' -GACGGTACGTTTAAACAGGC-5'
LeMV	5' -CAACTGTATCTCCGTCC-3' 3' -CGAGMGCRCCTCAAGRAGGAC-5'

3.3. Avaliação da ocorrência de begomovírus associados à cultura da soja no campo

A fim de constatar a ocorrência de begomovírus no campo, foram coletadas 380 amostras de plantas de soja, feijão, *Crotalaria* sp., guanxuma, leiteiro e rubi em três dos principais estados produtores (Paraná, Goiás e Minas Gerais), entre fevereiro e abril de 2001 (Figura 4, Quadro 4). As amostras foram testadas por “dot blot”, utilizando DNA total desnaturado, conforme descrito no item 3.3.2. As membranas foram hibridizadas com uma sonda mista preparada a partir do fragmento de 1.100 nt do DNA-A de BGMV, LeMV e “vírus B” e do DNA-A completo do TRMV, marcada com digoxigenina, a 68°C, ou com fluoresceína, a 65 °C, conforme descrito no item 3.3.2. As lavagens foram realizadas em condições de baixa especificidade (SSC 5x e SSC 2x). Os procedimentos de detecção foram realizados de acordo com as instruções dos fabricantes dos kits de marcação utilizados. Foram utilizados como controle negativo DNA total extraído de planta de soja sadia e como controle positivo uma mistura de DNA total obtido a partir de plantas infectadas com BGMV, LeMV e “vírus B”.

A fim de avaliar a ocorrência de BGMV, LeMV, “vírus A”, “vírus B” e “vírus C” no campo, as amostras consideradas positivas pelo ensaio anterior foram testadas para cada um dos vírus encontrados por “dot blot”. As membranas foram preparadas conforme descrito anteriormente e hibridizadas com sonda preparada a partir do fragmento de 500 nt do DNA-B de cada vírus, a 65 °C. As lavagens foram realizadas em condições de alta especificidade (SSC 2x e SSC 0,2x). Os controles positivos consistiram em DNA total extraído

de plantas infectadas com cada um dos vírus e o controle negativo consistiu em DNA total extraído de planta de soja sadia.

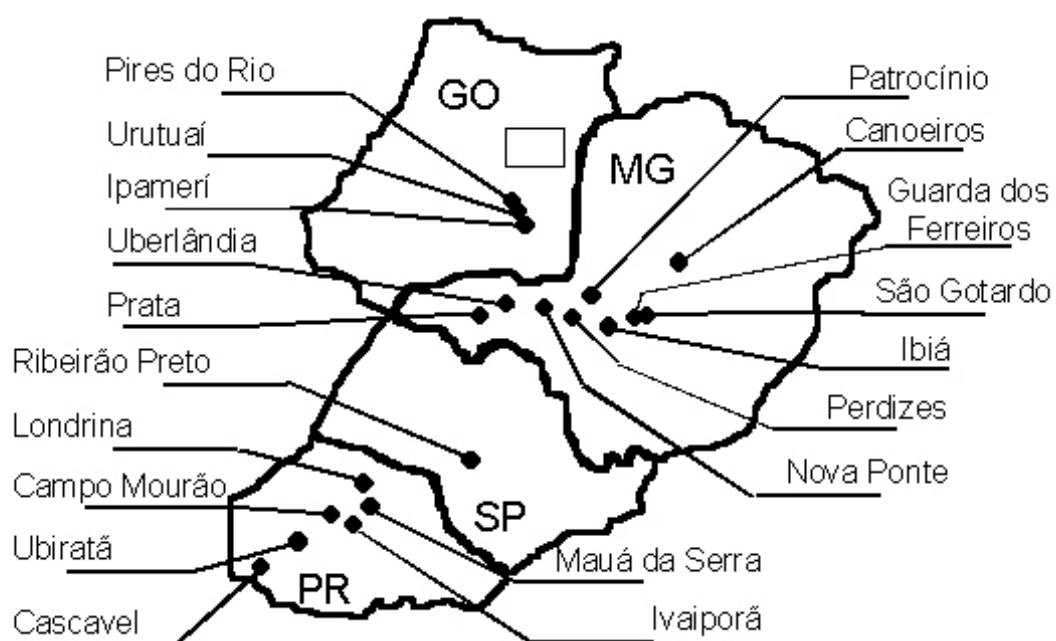


Figura 4. Localização dos Estados e municípios onde foram coletadas amostras de plantas para avaliação da ocorrência de begomovírus associados à cultura da soja.

Quadro 4. Espécies de plantas coletadas para avaliação da ocorrência de begomovírus associados à cultura da soja.

		<i>Glycine max</i>	<i>G. max</i> , sem sintoma	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Crotalaria</i> sp.	<i>Leonurus sibiricus</i>	<i>Sida</i> spp.	<i>Euphorbia</i> spp.
Paraná	Campo Mourão	-	13	-	-	-	-	-
	Cascavél	-	11	-	-	-	-	-
	Ivaiporã	-	17	-	-	-	-	-
	Londrina	10	78	-	-	9	14	19
	Mauá da Serra	-	7	-	-	-	-	-
	Ubiratã	-	14	-	-	-	-	-
Minas Gerais	Canoeiros	36	-	-	-	-	1	-
	Guarda dos Ferreiros	2	-	-	-	-	-	-
	Ibiá	6	-	-	-	-	-	-
	Nova Ponte	2	-	-	-	-	-	-
	Patrocínio	2	-	-	-	-	-	-
	Perdizes	4	-	-	-	-	-	-
	Prata	4	-	-	-	-	-	-
	São Gotardo	3	-	-	-	-	-	-
	Uberlândia	28	-	4	-	-	19	4
Goiás	Ipamerí	7	-	-	2	-	9	-
	Pires do Rio	20	-	-	-	-	1	3
	Urutuaí	27	-	-	-	-	2	-
São Paulo	Ribeirão Preto	-	-	-	-	-	1	-

4. RESULTADOS

4.1. Identificação de begomovírus associados à cultura da soja

Objetivando a identificação de espécies de begomovírus associadas ao cultivo da soja, as amostras coletadas foram testadas para infecção por begomovírus via PCR. A infecção foi constatada em 17 das 34 amostras analisadas que apresentavam sintomas típicos de infecção viral (Quadro 5). As amostras positivas apresentaram a amplificação do fragmento esperado de 1.100 nucleotídeos. Nas 11 amostras de plantas de soja sem sintomas, também analisadas via PCR, não foi detectada infecção viral (Quadro 5).

Quadro 5. Begomovírus detectados via PCR utilizando-se oligonucleotídeos universais, e identificados por sequenciamento a partir de amostras de soja, outras leguminosas e invasoras coletadas nos Estados do PR, MG, GO e MS.

Hospedeiro	Sintomas	Procedência	Número de amostras positivas/coletadas	Espécie viral identificada*
<i>Glycine max</i> (soja)	+	PR	4/ 16	LeMV (1) ^{a,b} “vírus A” (1)
<i>G. max</i>	-	PR	0/ 11	
<i>Phaseolus vulgaris</i> (feijão)	+	PR	1/ 1	BGMV (1)
		MG	1/ 1	BGMV (1)
<i>Phaseolus lunatus</i> (agrofava)	+	PR	0/ 1	
<i>Leonurus sibiricus</i> (rubi)	+	PR	4/ 6	LeMV (4)
<i>Sida</i> spp. (guanxuma)	+	PR	3/ 3	“vírus B” (2) ^b
	+	MG	1/ 1	
		GO	1/ 1	“vírus A” (1)
		MS	0/ 1	
<i>Euphorbia</i> spp. (leiteiro)	+	PR	2/ 3	“vírus C” (1) ^b

^aNúmero de amostras em que foi constatada a infecção pela espécie viral indicada; ^bEm ao menos uma das amostras positivas não foi possível identificar a espécie viral.

O produto de PCR amplificado a partir das 17 amostras positivas foi submetido a sequenciamento direto a fim de se obter a seqüência correspondente à região 5' do gene *cp*. As seqüências de aminoácidos da região do terminal amino da proteína capsidial foram a seguir comparadas com seqüências correspondentes de outros begomovírus a fim de se obter as porcentagens máximas de homologia (Quadro 6).

Quadro 6. Homologia máxima (%) de seqüência de aminoácidos entre begomovírus associados à cultura da soja e outros begomovírus. Os valores referem-se aos primeiros 26 aminoácidos da região do terminal amino da proteína capsidial comparada pelo programa BLAST.

	“vírus A”	“vírus B”	“vírus C”		LeMV-soja	LeMV-rubi			
BGMV	83%	SiGMV	79%	TGMV	89%	LeMV	88%	LeMV	92%
SLCV	81%	BCaMV	76%	WGMV	88%	SiGMV	80%	SiGMV	76%
TSRV	80%	BGMV	69%	TSRV	88%	BDMV	76%	BDMV	73%

Considerando-se que estirpes de uma mesma espécie apresentam 90% ou mais de homologia na região do terminal amino da proteína capsidial (Padidam et al., 1995), cinco espécies distintas de begomovírus foram identificadas em soja, feijoeiro, leiteiro, rubi e guanxuma (Quadro 5). Dentre as duas espécies infectando soja, uma foi identificada como LeMV e outra como uma possível espécie ainda não descrita, aqui designada “vírus A”. LeMV também foi detectado em quatro amostras de rubi coletadas no PR, e o “vírus A” em uma amostra de guanxuma coletada em GO. Um segundo vírus ainda não descrito, aqui referido como “vírus B”, foi detectado em duas amostras de guanxuma coletadas no PR. Finalmente, a terceira possível nova espécie viral, aqui referida como “vírus C”, foi encontrada em uma amostra de leiteiro do PR. BGMV foi detectado apenas em amostras de feijoeiro.

As seqüências de nucleotídeos da região comum (DNA-A) das novas espécies virais encontradas foram alinhadas com as seqüências de outros begomovírus, a fim de verificar a presença dos elementos em *cis* conservados e localizados nessa região (Figura 5). Os isolados associados à cultura da soja

apresentam um arranjo desses iterons típico dos begomovírus do Hemisfério Ocidental. Duas repetições diretas e uma repetição invertida (sítios de ligação da proteína Rep) estão presentes na região imediatamente anterior à caixa TATA do gene *rep*. A estrutura da origem de replicação também foi identificada, incluindo o nonanucleotídeo (TAATATTAC) conservado em todos os vírus da família *Geminiviridae*, e a estrutura em forma de grampo. Entretanto, apesar da conservação estrutural da região comum (presença e arranjo dos iterons), as seqüências de nucleotídeos propriamente ditas apresentam considerável variação entre as possíveis novas espécies (“vírus A”, “vírus B” e “vírus C”) e as espécies de begomovírus mais relacionadas (LeMV, BGMV e TGMV) (Figura 5).

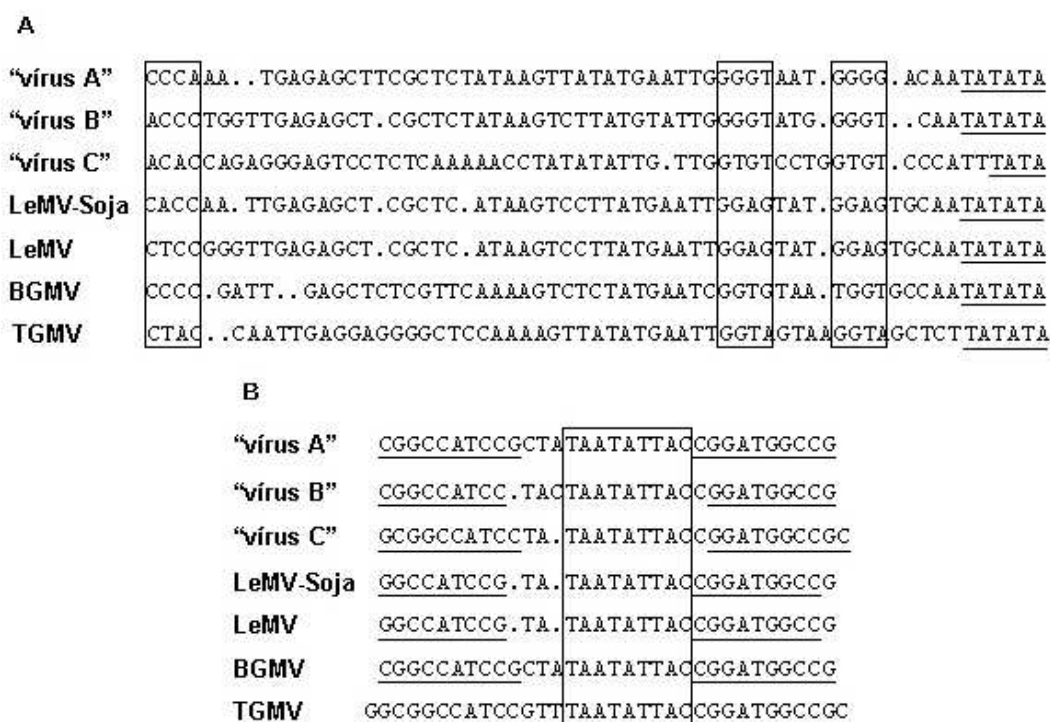


Figura 5. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da região comum das possíveis novas espécies de begomovírus associadas à cultura da soja e de begomovírus relacionados. A, elementos regulatórios em *cis* : iterons aparecem destacados e a caixa TATA sublinhada; B, origem de replicação: o nonanucleotídeo conservado aparece destacado e a haste da estrutura em forma de grampo sublinhada.

Utilizando-se os programas Clustal W e MEGA, uma árvore filogenética foi preparada (Figura 6) com base nas seqüências de aminoácidos da região do terminal amínico da proteína capsidial. Todas as espécies virais detectadas nas diferentes amostras vegetais coletadas foram incluídas na árvore, além de espécies de begomovírus previamente caracterizadas e que infectam leguminosas (BGMV e BDMV), solanáceas (TGMV), cucurbitáceas (CLCV e SLCV) e invasoras (SiGMV e LeMV). SCLV, um begomovírus típico do hemisfério oriental, foi incluído por infectar naturalmente soja na Ásia (Iwaki et al., 1983). Este vírus ocupou um ramo distinto da árvore, enquanto os begomovírus associados à cultura da soja agruparam-se com outros begomovírus do Hemisfério Ocidental.

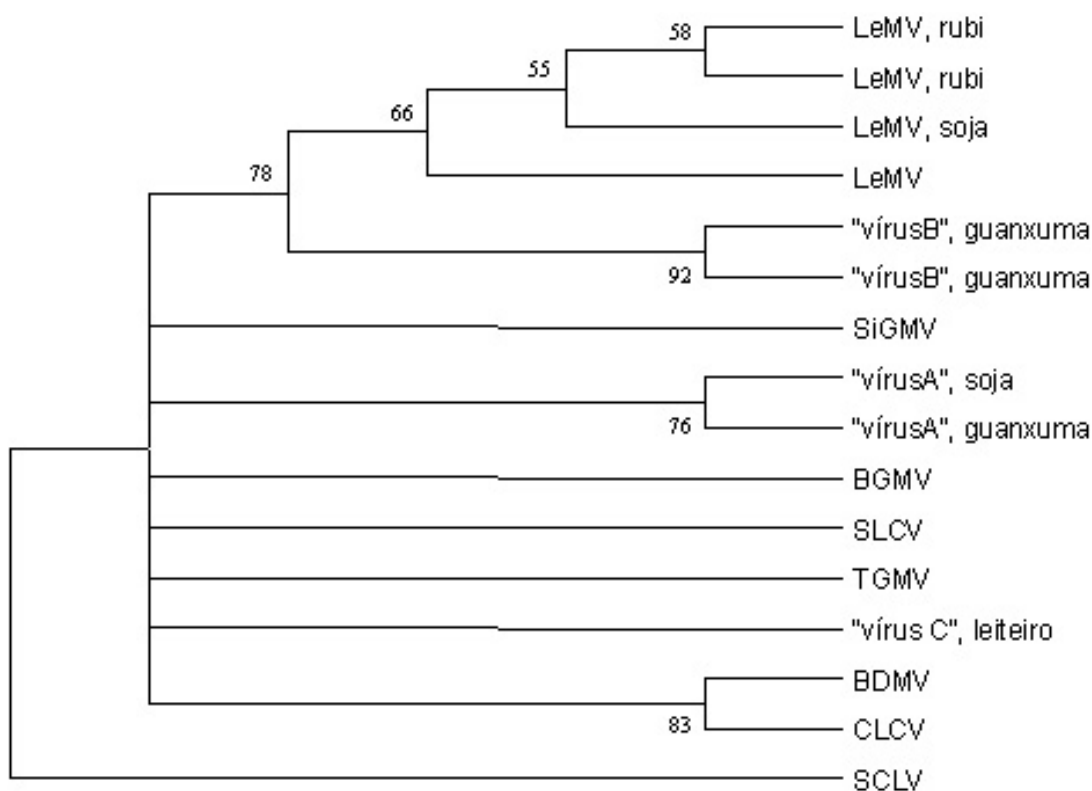


Figura 6. Árvore filogenética indicando o relacionamento entre os isolados de begomovírus associados à cultura da soja e outros begomovírus. A árvore foi preparada com base na seqüência dos primeiros 26 aminoácidos da região do terminal amino da proteína capsidial, utilizando-se os programas Clustal W para o alinhamento das seqüências e MEGA para construção da árvore. Foi utilizado um valor de bootstrap de 2000.

A homologia de seqüência do DNA-B entre as possíveis novas espécies virais e outros begomovírus também foi verificada. Um fragmento de 500 nucleotídeos correspondente à região 5' do gene *mp* foi amplificado via PCR e seqüenciado, comparando-se as seqüências pelo programa BLAST (Quadro 7). As possíveis novas espécies virais apresentaram homologias próximas a 90% com várias espécies de begomovírus. A amplificação via PCR e o seqüenciamento dessa região indica a presença de ao menos um DNA-B associado aos DNAs-A identificados.

Quadro 7. Homologia máxima (%) de seqüência de aminoácidos entre begomovírus associados à cultura da soja e outros begomovírus. Os valores referem-se à região do terminal amino da proteína de movimento (MP).

	"vírus A"		"vírus B"		"vírus C"
TRMV	91%	BaTV	92%	TDLCV	89%
TSRV	91%	ToMoV	92%	JaMV	87%
BGMV	89%	AbMV	92%	BaTV	87%

4.2. Desenvolvimento de ferramentas moleculares para identificação de begomovírus associados à cultura da soja

Com o objetivo de desenvolver ferramentas moleculares para uma identificação rápida e precisa de begomovírus associados à cultura da soja, foram preparadas sondas não-radioativas para detecção específica e não específica, e sintetizados oligonucleotídeos para a detecção das diferentes espécies virais encontradas via PCR. Em condições de baixa especificidade (hibridizações realizadas entre 65 e 68°C seguidas de lavagens com 5x SSC e 2x SSC), a sonda preparada a partir da mistura dos fragmentos de 1.100 nucleotídeos do DNA-A de BGMV, LeMV e "vírus B" foi capaz de detectar sete vírus distintos: BGMV, LeMV, "vírus A", "vírus B", "vírus C", TRMV e *Tomato chlorotic mottle virus* (TCMV, Ambrozevicius, 2000) (Figura 7a). Sob as mesmas condições, a sonda preparada com o componente A completo do TRMV detectou seis dos sete begomovírus citados, não sendo capaz de detectar o LeMV (Figura 7b). Hibridizações com sondas preparadas a partir do

fragmento de 500 nucleotídeos do DNA-B realizadas em condições de alta especificidade (temperatura de hibridização entre 65 e 68°C e lavagem final com 0,2x SSC) aumentaram a especificidade de detecção dos vírus homólogos à sonda (Figura 8).

Observou-se considerável variação nos resultados em função do método utilizado para extração de DNA viral a partir das amostras foliares. Assim, foram inconsistentes os resultados quando o extrato vegetal foi preparado com NaOH e desnaturado a 95°C, ou homogeneizado com tampão PEP e desnaturado com SSC/formaldeído. Também a utilização de material foliar triturado diretamente sobre a membrana (“squash blot”) resultou em dados não confiáveis, pois não foi possível distinguir positivos e negativos com segurança. Os resultados foram consistentes e confiáveis quando se utilizou DNA total purificado e desnaturado com formaldeído, tanto com a sonda marcada com digoxigenina e detectada por precipitação do substrato quanto com a sonda marcada com fluoresceína e detectada por quimioluminescência.

A especificidade das sondas foi testada utilizando-se plantas saudáveis de soja, feijoeiro, tomateiro, rubi, guanxuma e leiteiro como controles. Nas condições testadas, não houve hibridização das sondas com esses controles saudáveis.

O uso de PCR com oligonucleotídeos sintetizados a partir da sequência de nucleotídeos de cada espécie viral permitiu detectar os vírus homólogos, desde que ajustada a temperatura de anelamento para cada par de oligonucleotídeos. Assim, oligonucleotídeos sintetizados com base nas seqüências de BGMV e “vírus B” possibilitaram amplificar especificamente o DNA viral homólogo, mas somente quando a temperatura de anelamento foi de 58°C. Abaixo desta temperatura foram amplificados DNAs celulares, e acima desta temperatura não houve amplificação. À temperatura de 60°C, os oligonucleotídeos sintetizados a partir da seqüência do LeMV permitiram a amplificação específica do DNA viral homólogo. Os padrões eletroforéticos dos produtos de amplificação utilizando-se os oligonucleotídeos referidos estão representados na Figura 9. PCR realizada com os oligonucleotídeos sintetizados a partir da seqüência do “vírus A” resultou em amplificação não específica.

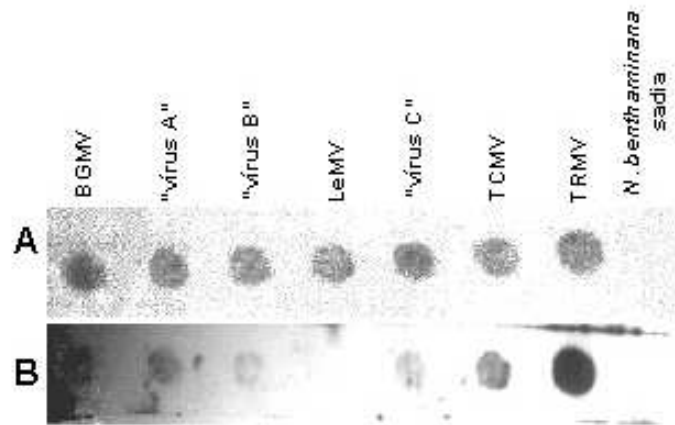


Figura 7. Detecção de begomovírus associados à cultura da soja por meio de hibridização não-radioativa, utilizando sonda marcada com fluoresceína e preparada a partir de (A) mistura dos fragmentos de 1.100 nucleotídeos do DNA-A de BGMV, "vírus B" e LeMV, e (B) DNA-A completo do TRMV. Hibridizações a 65°C seguidas de lavagens com 5x SSC e 2x SSC e detecção do substrato quimioluminescente CDP-Star em filme de raio-X. 1, BGMV; 2, "vírus A"; 3, "vírus B"; 4, LeMV; 5, "vírus C"; 6, TCMV; 7, TRMV; e 8, *N. benthamiana sadia*.

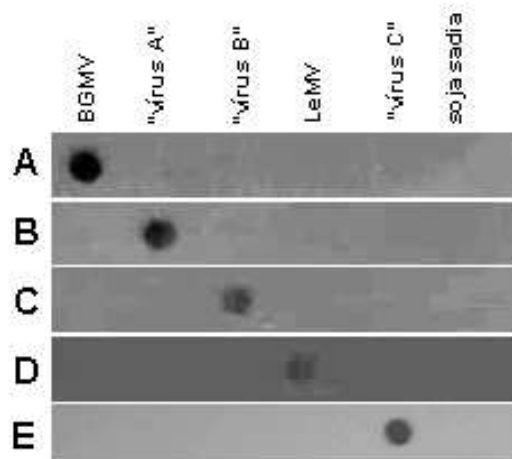


Figura 8. Detecção de begomovírus associados à cultura da soja por meio de hibridização não-radioativa, utilizando sonda marcada com fluoresceína e preparada a partir do fragmento de 500 nucleotídeos do DNA-B de (A) BGMV, (B) "vírus A", (C) "vírus B", (D) LeMV, e (E) "vírus C". Hibridizações a 65°C seguidas de lavagem final com 0,2x SSC e detecção do substrato quimioluminescente CDP-Star em filme de raio X.

Em conjunto, os resultados indicam que é possível detectar via hibridização molecular, com rapidez e confiabilidade, infecção por begomovírus associados à cultura da soja, e também distinguir as cinco espécies virais encontradas por hibridização, e três delas por PCR.

4.3. Avaliação da ocorrência de begomovírus associados à cultura da soja no campo

A presença de begomovírus foi detectada via hibridização molecular, utilizando-se sonda não-radioativa preparada a partir do fragmento de 1.100 nucleotídeos do DNA-A de BGMV, “vírus B” e LeMV, e do DNA-A completo do TRMV, em 70 das 380 amostras vegetais coletadas, incluindo plantas de soja, de outras leguminosas e de invasoras associadas ao cultivo da soja (Figura 10, Quadro 8).

Dentre as amostras coletadas em Minas Gerais, 18% estavam infectadas por begomovírus. Dentre estas, 29% foram amostras de plantas de soja (Quadro 8). Em 41% do total de amostras coletadas em Goiás e em 52% das plantas de soja coletadas neste Estado foi constatada infecção por begomovírus. No Paraná, nenhuma amostra de soja foi positiva para infecção por begomovírus. Embora neste Estado tenham sido coletados 52% do total de amostras de soja, apenas 7% destas apresentavam sintomas de infecção viral. Uma única amostra, de guanxuma, foi coletada no Estado de São Paulo, e nesta não foi detectada infecção por begomovírus.

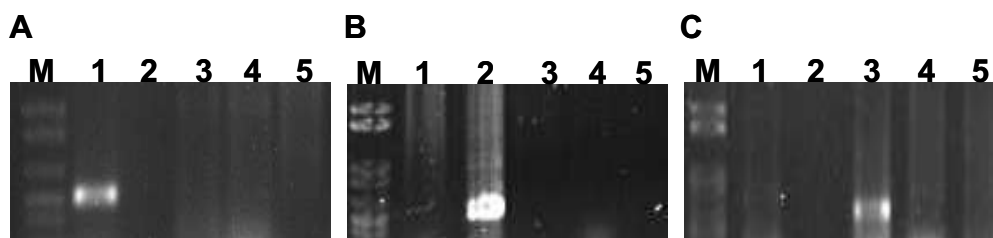


Figura 9. Padrões eletroforéticos em gel de agarose (0,9%) dos fragmentos amplificados via PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para (A) BGMV, (B) “vírus B”, e (C) LeMV. M, marcador de peso molecular (“1 kb DNA ladder”); 1, BGMV; 2, “vírus A”; 3, “vírus B”; 4, LeMV; 5, *N. benthamiana* sadia.

Quadro 8. Ocorrência de begomovírus em amostras de soja, de outras leguminosas e de invasoras coletadas em MG, PR, GO e SP, analisada por meio de hibridização molecular utilizando sonda não-radioativa preparada a partir do fragmento de 1.100 nucleotídeos do DNA-A de BGMV, “vírus B” e LeMV, e do DNA-A completo do TRMV.

Hospedeiro	Sintomas	Paraná	Goiás	Minas Gerais	São Paulo	Total	Infectadas (%)
<i>Glycine max</i> (soja)	-	0/ 140*				0/ 140	0
<i>G. max</i>	+	0/ 10	26/ 50	6/ 87		32/ 147	22
<i>Phaseolus vulgaris</i> (feijoeiro)	+			1/ 4		1/ 4	25
<i>Crotalaria</i> sp.	+		0/ 6			0/ 6	0
<i>Sida</i> spp. (guanxuma)	+	10/ 15	3/ 12	13/ 20	0/1	26/ 48	54
<i>Euphorbia</i> spp. (leiteiro)	+	2/ 19	0/ 3	1/ 4		3/ 26	12
<i>Leonurus sibiricus</i> (rubi)	+	8/ 9				8/ 9	89
TOTAL		20/ 193	29/ 71	21/ 115	0/ 1	70/ 380	18
INFECTADAS (%)		10	41	18	0.0		

*Número de amostras positivas/coletadas.

A fim de avaliar a ocorrência de cada uma das cinco espécies de begomovírus associadas à cultura da soja identificadas neste trabalho, as amostras nas quais foi detectada infecção por begomovírus via hibridização com a sonda mista (não específica) foram a seguir submetidas à análise via hibridização utilizando as sondas específicas para BGMV, “vírus A”, “vírus B”, “vírus C” e LeMV, preparadas a partir do fragmento de 500 nucleotídeos do DNA-B de cada vírus (Figura 11). Com este ensaio, verificou-se que o “vírus A” estava presente em 12 das amostras analisadas, sendo nove destas de soja, todas provenientes de Goiás. As outras três amostras infectadas pelo “vírus A” consistiram de plantas de guanxuma provenientes do Paraná. LeMV foi detectado em sete amostras de rubi provenientes do Paraná. BGMV, “vírus B” e “vírus C” não foram encontrados em nenhuma das amostras analisadas (Quadro 9).

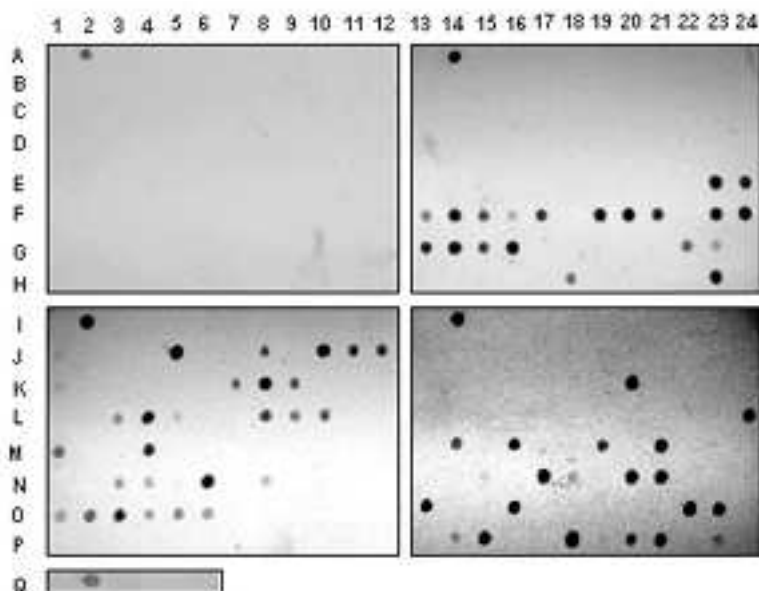
Das 70 amostras em que se detectou a presença de begomovírus, 21 destas estavam infectadas por um dos cinco vírus identificados neste trabalho. Em 49 amostras não foi possível identificar a espécie viral. Estes resultados indicam uma ocorrência relativamente freqüente de begomovírus infectando naturalmente a soja e plantas associadas a essa cultura. Alguns destes vírus

constituem possíveis novas espécies desse gênero, embora outros begomovírus não identificados neste trabalho também estejam presentes no campo.

Quadro 9. Espécies de begomovírus identificadas via hibridização não-radioativa com sondas específicas para BGMV, “vírus A”, “vírus B”, “vírus C” e LeMV, em amostras de soja, de outras leguminosas e de invasoras coletadas nos Estados de MG, PR, GO e SP.

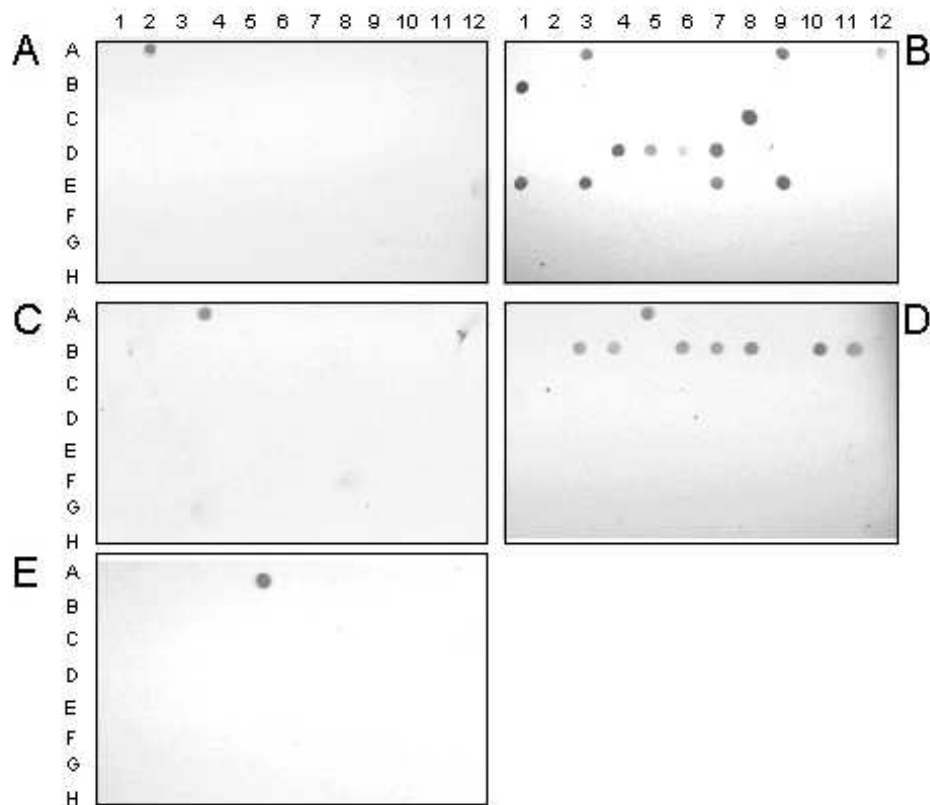
Hospedeira	Procedência	Amostras infectadas (número)	Espécie de begomovírus identificada
<i>Glycine max</i> (soja)	MG	6	“vírus A” (9) ^{a,b}
	GO	26	
<i>Phaseolus vulgaris</i> (feijão)	MG	1	
<i>Leonurus sibiricus</i> (rubi)	PR	8	LeMV (7)
<i>Sida</i> spp. (guanxuma)	PR	10	“vírus A” (3)
	MG	13	
	GO	3	
<i>Euphorbia</i> spp. (leiteiro)	PR	2	
	MG	1	

^aNúmero de amostras em que foi constatada a infecção pela espécie viral indicada; ^bEm ao menos uma das amostras positivas não foi possível identificar a espécie viral.



controle negativo			A1; A13; I1; I13; Q1
controle positivo			A2; A14; I2; Q2
<i>Glycine max</i> (soja)	-	Paraná	A3-A12; A15-C16; C19; C20; C22-D12; D14; D19-E12; E14-E19; E21; E22; F1-H12;
	+	Paraná	C5; C6; C21; D13; D15-D18; E13; E20
	+	Goiás	J3-J5; J9-J12; K6-K12; L1-L12; M1; M4-M12; N1-N12; O1-O6
	+	Minas Gerais	I15-I24; J13-J24; K13-K19; K21-K24; L13-L21; M23; M24; N13; N16; N19; N22-N24; O7-O12; O17-O20; O22-O24; P1-P19; P21; P24; Q3-Q5
<i>Phaseolus vulgaris</i> (feijão)	+	Minas Gerais	P22; O13-O15
<i>Crotalaria</i>	+	Goiás	I12; J2
<i>Leonurus sibiricus</i> (rubi)	+	Paraná	F20-F24; G13-G16
<i>Sida</i> spp. (guanxuma)	+	Paraná	E23; E24; F13-F19; H18-H23
	+	Goiás	I8-I11; J1; J6-J8; K1; K2; M2; M3
	+	Minas Gerais	K20; L22; L24; M13; M14; M16-M19; M21; M22; N14; N15; N17; N18; N20; N21; O16; O21; P20
	+	São Paulo	Q6
<i>Euphorbia</i> spp. (leiteiro)	+	Paraná	G17-G24; H13-H17; H24; I3-I7
	+	Goiás	K3-K5
	+	Minas Gerais	L23; M15; M20; P23

Figura 10. Detecção, via hibridização não-radioativa, de begomovírus em amostras provenientes do campo utilizando sonda marcada com fluoresceína preparada a partir de uma mistura dos fragmentos de 1.100 nucleotídeos do DNA-A de BGMV, “vírus B” e LeMV e do DNA-A completo do TRMV. Hibridizações a 65°C seguidas de lavagens com 5x SSC e 2x SSC e detecção do substrato quimioluminescente CDP-Star em filme de raio-X. O controle positivo consistiu na mistura de DNA total purificado a partir de plantas infectadas com BGMV, “vírus B” e LeMV, e o negativo na mistura de DNA total purificado a partir de plantas de soja ‘Cristalina’ e ‘Davis’ e feijoeiro ‘Jalo’ sadios.



controle negativo			A1
controles positivos	BGMV		A2
	"vírus A"		A3
	"vírus B"		A4
	LeMV		A5
	"vírus C"		A6
<i>Glycine max</i> (soja)		Goiás	C8; C11; C12; D1; D3-E12
		Minas Gerais	G7-G12; H2
<i>Phaseolus vulgaris</i> (feijão)		Minas Gerais	G3-G5
<i>Sida</i> spp. (guanxuma)		Paraná	A7-B12; C4-C6
		Goiás	C7; C9; C10; D2
		Minas Gerais	F1-G2; G6; H1
<i>Leonurus sibiricus</i> (rubi)		Paraná	B3-B11
<i>Euphorbia</i> spp. (leiteiro)		Paraná	B12-C3
		Minas Gerais	L23; M15; M20; P23

Figura 11. Detecção, via hibridização não-radioativa, de begomovírus em amostras provenientes do campo utilizando sonda marcada com fluoresceína e preparada a partir do fragmento de 500 nucleotídeos do DNA-B de (A) BGMV, (B) "vírus A", (C) "vírus B", (D) LeMV e (E) "vírus C". Hibridizações a 65°C seguidas de lavagens com 2x SSC e 0,2x SSC, e detecção do substrato quimioluminescente CDP-Star em filme de raio-X. Os controles positivos consistiram em DNA total purificado a partir de plantas infectadas com os respectivos vírus, e o negativo em mistura de DNA total purificado a partir de plantas de soja 'Cristalina' e 'Davis' e feijoeiro 'Jalo' sadios.

5. DISCUSSÃO

Desde a década de 70 há relatos de que a soja no Brasil pode ser infectada naturalmente por begomovírus. Esses relatos sobre as espécies virais ocorrendo em soja basearam-se em características biológicas, como os sintomas freqüentemente associados à virose, gama de hospedeiros e transmissão pelo vetor. Com base nestes critérios, três espécies de vírus – BGMV, EuMV e AbMV – foram mencionadas como patógenos naturais de soja (Costa, 1977; Costa et al., 1979). No presente trabalho, AbMV não foi detectado em quaisquer das amostras analisadas e BGMV foi detectado somente em amostras de feijoeiro. Um begomovírus, aqui chamado “vírus C”, foi encontrado em leiteiro e causa sintomas semelhantes aos causados por EuMV neste hospedeiro (Costa e Bennett, 1950). Dados de seqüência correspondendo à região central do gene *cp* de um vírus nomeado *Euphorbia mosaic virus* (EuMV) estão depositados no GenBank (nº de acesso: AF068642). Como a região seqüenciada do vírus neste trabalho corresponde à região 5’ do mesmo gene, não havia como compará-las a fim de determinar se pertencem à mesma espécie viral. A identificação de BGMV, EuMV e AbMV em plantas de soja durante a década de 1970 foi realizada com base em características biológicas. Considerando-se a pouca variação da gama de hospedeiros e dos sintomas induzidos pelos begomovírus que infectam leguminosas, não é possível descartar a possibilidade de que os vírus encontrados neste trabalho infectando soja sejam os mesmos descritos anteriormente. É também possível que trate-se de outros begomovírus, ainda não descritos e caracterizados. Infelizmente, uma vez que as amostras de soja originais a partir das quais foram identificados o BGMV, EuMV e AbMV na década de 1970 não estão mais disponíveis, essa dúvida não poderá ser esclarecida.

Constatou-se neste trabalho a presença de dois begomovírus infectando soja, “vírus A” e LeMV. O “vírus A” merece mais atenção do que lhe foi dada até aqui. Ele foi encontrado não apenas em soja, mas também em guanxuma, e em dois Estados não limítrofes, Goiás e Paraná, indicando que esta espécie pode estar já disseminada e que guanxuma pode estar participando do ciclo do vírus. Neste trabalho, a amostragem nas regiões produtoras não foi proporcional à área plantada e o Rio Grande do Sul não foi analisado. Além

disso, não se estimou a reação das cultivares nacionais mais plantadas, como MG/BR46 Conquista, BRS MT Uirapuru, Engopa 315, e BRS 133, a este vírus. Portanto, desconhecemos quais lhe são imunes, resistentes ou tolerantes, sejam assintomáticas ou não, e qual o real potencial de dano desse vírus nas lavouras, nas diferentes regiões produtoras, onde as cultivares utilizadas não são as mesmas.

O outro vírus encontrado em soja, LeMV, também foi encontrado em rubi, em ambos os casos no Paraná. O primeiro relato da doença causada por LeMV foi feito em plantas de rubi infectadas naturalmente em São Paulo (Flores e Silberschmidt, 1962). Posteriormente, características citológicas e de transmissão por vetor indicaram que esta doença era causada por um geminivírus (Kitajima e Kim, 1987). Recentemente, o sequenciamento de 154 nucleotídeos do terminal amino do gene *cp* e de toda a RC de um isolado coletado no Mato Grosso do Sul, e as comparações subseqüentes, evidenciaram que LeMV é uma espécie distinta (Faria e Maxwell, 1999). Apesar de, neste trabalho, LeMV ter sido encontrado somente no Paraná, os relatos anteriores da ocorrência deste vírus em vários Estados (Flores e Silberschmidt, 1962; Kitajima e Kim, 1987; Faria e Maxwell, 1999) indicam que ele está disseminado pelo país e, da mesma forma que para o “vírus A”, uma invasora pode participar do ciclo natural do vírus.

Os isolados de LeMV oriundos de rubi apresentaram 92% de homologia na seqüência do terminal amino da CP com o isolado originalmente sequenciado por Faria e Maxwell (1999), enquanto o LeMV isolado de soja apresentou homologia de 88%. Esta ligeira variação entre os isolados de LeMV aqui descritos também pôde ser percebida nos íterons da RC: o isolado oriundo de soja apresentou alteração na seqüência repetida inversa, enquanto os isolados de rubi não diferem do isolado-tipo. Além dos três isolados de LeMV seqüenciados neste trabalho, outros dois, oriundos de rubi, foram identificados por “Southern blot”.

Outro vírus, aqui chamado “vírus B”, foi encontrado somente em guanxuma. Este vírus apresenta baixa homologia com SiGMV (79% para o terminal amino da CP) e com AbMV (61%), dois begomovírus que infectam guanxuma, e com o “vírus A” (73%) que também foi encontrado nesta invasora, indicando tratar-se de uma espécie distinta.

Alguns outros vírus podem infectar soja, como *Cabbage leaf curl virus* (CLCV), relatado na Colômbia (Morales e Anderson, 2001), e uma espécie não nomeada, encontrada na Argentina (P.R. Pardina, comunicação pessoal), além de *Soybean crinkle leaf virus* (SCLV), relatado na Ásia (Iwaki et al., 1983). Estas espécies apresentam baixa homologia com os vírus aqui descritos. De fato, não foi possível encontrar relacionamento filogenético entre estes vírus e os outros begomovírus que infectam soja. Tem-se verificado relacionamento filogenético mais próximo entre espécies de begomovírus de hospedeiras variadas, mas de uma mesma região geográfica, do que entre begomovírus que infectam a mesma hospedeira em regiões geográficas distintas (Harrison e Robinson, 1999), o que também foi verificado neste trabalho. A análise filogenética indicou que os vírus descritos neste trabalho são mais relacionados com outros begomovírus, de hospedeiras variadas, ocorrendo nas Américas, do que com begomovírus infectando soja no hemisfério oriental.

Os sintomas relatados em soja como causados por BGMV incluem um mosaico suave, pouco evidente, e pouca ou nenhuma distorção foliar (Costa et al., 1979; Gilbertson et al., 1991; Aragão et al., 1995), muito diferentes daqueles causados pelo vírus em feijoeiro. “Mosaico-crespo” é a denominação dada à doença causada por AbMV em soja (Costa, 1977). Neste caso, também, os sintomas são discretos e frequentemente indistinguíveis dos atribuídos a outras enfermidades da soja. Já a doença causada por EuMV em soja foi chamada de “mosaico-anão” e mostra sintomas ligeiramente mais severos do que aqueles apresentados pela infecção por AbMV (Costa, 1977). Neste trabalho, os sintomas visíveis nas amostras de soja infectadas foram mosaico suave e, menos freqüentemente, lesões cloróticas e mosaico dourado. Porque são pouco evidentes os sintomas em soja das viroses causadas por begomovírus, é razoável supor que estas vem sendo negligenciadas e a sua real importância está sendo perigosamente subestimada.

Utilizando bombardeamento de partículas, ou biobalística, não foi possível infectar plantas de soja, feijão, rubi, guanxuma ou leiteiro com estes vírus. Esta técnica é utilizada na inoculação de plantas com clones infecciosos de begomovírus não transmissíveis via extrato vegetal tamponado, ou que o sejam ineficientemente, como é o caso do BGMV (Gilbertson et al., 1991). Mesmo com o uso desta técnica, a eficiência da transmissão de BGMV é baixa, em torno de 50% das plantas de soja e feijão inoculadas (Gilbertson et al.,

1991; Aragão et al., 1995). Neste trabalho, como não estavam disponíveis clones infecciosos, as inoculações foram feitas com a forma replicativa do vírus (RF). O isolamento da RF é trabalhoso e a quantidade de DNA obtida é expressivamente menor do que a do genoma clonado. Isto talvez explique o insucesso nas tentativas de infectar a maioria das plantas testadas com o uso de RF. No entanto, foi possível infectar *Nicotiana benthamiana* com BGMV, “vírus B” e LeMV, inoculados em separado. Os sintomas destes vírus em plantas desta espécie variaram de um mosaico muito suave, causado pelo BGMV, até um mosaico amarelo discreto orientado no sentido fonte-dreno, causado pelo “vírus B” e pelo LeMV.

A verificação da ocorrência de infecção por begomovírus em amostras oriundas de campos de soja foi feita por meio de hibridização molecular com sonda preparada a partir de um fragmento de 1.100 nucleotídeos do DNA-A de BGMV, “vírus B” e LeMV, e do DNA-A completo do TRMV. A identificação das espécies virais foi realizada mediante hibridização com sonda de 500 nucleotídeos preparada a partir de um fragmento do DNA-B de cada vírus. No entanto, constatar a presença de um DNA-B associado a um DNA-A, em uma amostra infectada por begomovírus, não é garantia de que estes dois componentes sejam cognatos, isto é, pertençam à mesma espécie viral. Para comprovar a existência dessa correlação, as RCs dos dois componentes deveriam ter sido comparadas entre si, uma vez que, dentro de uma mesma espécie, elas são idênticas ou extremamente similares. Ainda assim, em pelo menos uma espécie conhecida, CLCV, a homologia entre as RCs dos dois componentes é baixa (Hill et al., 1998). Portanto, faz-se necessária uma segunda prova da correlação entre os dois componentes, qual seja, verificar se efetuam ou não pseudo-recombinação, uma vez que é postulado que Rep não participa da replicação de componentes B não cognatos, ou o faz ineficientemente. Para os cinco vírus descritos neste trabalho, foram encontrados componentes B associados aos componentes A em todos os casos. No entanto, não foram comparadas as seqüências das RCs dos dois componentes nem efetuados ensaios de pseudo-recombinação, não sendo portanto possível certificar que são cognatos os componentes A e B aqui relatados. Algumas evidências, entretanto, indicam que os componentes A e B seqüenciados o são. A primeira é que o sequenciamento parcial do componente A foi feito diretamente a partir de fragmentos de PCR. Se

houvesse infecção mista nestas amostras, o sequenciamento não conseguiria distinguir entre populações diferentes de moléculas. Mas isto não descarta a possibilidade de haver uma só população de DNA-A e mais de uma de DNA-B, nas amostras seqüenciadas. A segunda evidência a favor é que, à exceção do “vírus C”, as sondas preparadas a partir do DNA-B deram sinal positivo e específico com pelo menos dois isolados distintos de cada vírus, indicando uma associação constante entre os DNAs-A e B descritos. Além disso, os ensaios de “dot blot” específicos foram confirmados, via PCR, pelo menos para BGMV, “vírus B” e LeMV, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores específicos referidos em Material e Métodos.

O aumento crescente do conhecimento a respeito das características moleculares dos vírus suscita maior discussão sobre o conceito de “espécie de vírus”. Para o gênero *Begomovirus*, esta discussão adquire um caráter mais interessante, uma vez que neste gênero de vírus existem mecanismos secundários de variação genética, como a aquisição de moléculas adicionais de DNA, pseudo-recombinação e recombinação. Padidam et al. (1995) demonstraram que a análise de uma pequena região do genoma dos geminivirus é suficiente para classificar um isolado. A região que abrange os 60 ou 70 aminoácidos do terminal amino da proteína capsidial é a região mais variável desta proteína e representaria a variabilidade de todo o genoma. Outros autores, no entanto, consideram a região central deste mesmo gene como mais útil na identificação e classificação provisória de begomovírus, enquanto os 200 nucleotídeos da região 5' do gene seriam melhores para discriminar estirpes (Brown et al., 2001). Mas a multiplicidade de variações encontrada entre isolados de begomovírus tem levado alguns autores a sugerir que é inadequada a determinação de uma espécie de begomovírus baseada numa pequena região do genoma (Harrison e Robinson, 1999). O sequenciamento de componentes completos de DNA, embora desejável, pode também não ser útil para a determinação da espécie quando se trata de vírus gerados por recombinação (Harrison e Robinson, 1999). No presente trabalho, a identificação dos vírus foi feita com base nos primeiros 28 a 61 aminoácidos do terminal amino da proteína capsidial. Com isto, embora os dados indiquem que alguns dos isolados virais encontrados possam ser espécies ainda não descritas, ensaios de pseudo-recombinação e sequenciamento de outras

regiões do genoma, que permitam identificar possíveis eventos de recombinação, devem ser feitos a fim de confirmar estes resultados.

Até o início da década de 1990, algumas espécies de begomovírus eram conhecidas no Brasil como patógenos do tomateiro (Costa et al., 1975; Matys et al., 1975), sem que fossem associados a perdas para a cultura. A partir da introdução do biótipo B de *B. tabaci* no Brasil (Melo, 1992), graves e recentes epidemias de begomovírus em tomates têm sido relatadas (Ribeiro et al., 2002), e associadas temporal e espacialmente à presença do biótipo B nos campos de cultivo (França et al., 1996). Estas epidemias parecem estar associadas a novas variantes de begomovírus surgidas por recombinação (Ribeiro et al., 2002), conforme constatado para a variante UgV do ACMV na África (Legg e Thresh, 2000). Conforme verificado para o tomateiro, até recentemente não se observavam sintomas de begomovirose em soja, apesar da descrição antiga de plantas de soja infectadas naturalmente por estes vírus (Costa, 1955; 1977) e do fato de ser a soja excelente hospedeira do inseto vetor (Costa et al., 1973). A constatação da existência no campo de begomovírus capazes de infectar naturalmente a soja, associada à presença destes vírus em hospedeiras alternativas como guanxuma e rubi e à ampla disseminação do inseto vetor, formam uma combinação potencialmente perigosa para esta cultura, visto que podem favorecer a ocorrência de infecções múltiplas e, com isso, o aparecimento de novas variantes virais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

AMBROZEVICIUS, L.P. **Caracterização parcial de uma nova espécie de Begomovirus, e diversidade genética de geminivírus associados ao tomateiro no Sudeste do Brasil**, 2000. 92 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

ANTIGNUS, Y., COHEN, S. Complete nucleotide sequence of an infectious clone of a mild isolate of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). **Phytopathology**, v. 84, p. 707-712, 1994.

ARAGÃO, F.J.L., BRASILEIRO, A.C.M., RIBEIRO, S.G., FARIA, F.C., RECH, E.L. Inoculation of bean and soybean with cloned bean golden mosaic virus (BGMV) DNA using particle acceleration. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p. 642-644, 1995.

ARAGÃO, R.J.L., BARROS, L.M.G., BRASILEIRO, A.C.M., RIBEIRO, S.G., SMITH, F.D., SANFORD, J.C., FARIA, J.C., RECH, E.L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. **Theoretical Applied Genetics**, v. 93, p. 142-150, 1996.

ARGUELLO-ASTORGA, G.R., GUEVARA-GONZALEZ, R.G., HERRERA-ESTRELLA, L., RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. Geminivirus replication origin have a group-specific organization of interactive elements: a model for replication. **Virology**, v. 203, p. 90-100, 1994a.

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

BATISTA, M.F. Métodos moleculares para identificação de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 1, p. 165-196, 1993.

BEDFORD, I.D., BRIDDON, R.W., BROWN, J.K., ROSELL, R.C., MARKHAM, P.G. Geminivirus transmission and biological characterisation of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. **Annals of Applied Biology**, v. 125, p. 311-325, 1994.

BIRD, J., SANCHEZ, J., VAKILI, N.G. Golden yellow mosaic of beans (*Phaseolus vulgaris*) in Puerto Rico. **Phytopathology**, v. 63, p. 1435, 1973.

BLAIR, M.W., BASSET, M.J., ABOUZID, A.M., HIEBERT, E., POLSTON, J. E., McMILLAN, R.T., GRAVES, W., LAMBERTS, M. Occurrence of bean golden mosaic virus in Florida. **Plant Disease**, v. 79, p. 529-533, 1995.

BRIDDON, R.W., BEDFORD, I.D., TSAI J.H., MARKHAM, P.G. Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, tomato pseudo-curly top virus, suggests a recombinant origin. **Virology**, v. 219, p. 387-394, 1996.

BRIDDON, R.W., MARKHAM, P.G. Cotton leaf curl virus disease. **Virus Research**, v. 71, p. 151-159, 2000.

BROWN, J.K., IDRIS, A.M., TORREZ-JEREZ, I., BANKS, G.K., WYATT, S.D. The core region of the coat protein gene is highly useful for establishing the provisional identification and classification of begomoviruses. **Archives of Virology**, v. 146, p. 1581-1598, 2001.

BROWN, J.K., BIRD J. Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. **Plant Disease**, v. 76, p. 220-225, 1992.

BROWN, J.K., FROHLICH, D.R., ROSELL, R.C. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? **Annual Review of Entomology**, v. 40, p. 511-534, 1995.

BURTON, R.A., GIBEAUT, D.M., BACIC, A., FINDLAY, K., ROBERTS, K., HAMILTON, A., BAULCOMBE, D.C. & FINCHER, G.B. Virus-induced silencing of a plant cellulose synthase gene. **Plant Cell**, v. 12, p. 691-705, 2000.

COSTA, A.S. Fitoviroses do feijoeiro no Brasil. In: FEIJÃO: fatores de produção e qualidade. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 175-256.

COSTA, A.S. investigações sobre moléstias da soja no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v. 3, p. 3-30, 1977.

COSTA, A.S. Studies on Abutilon mosaic in Brazil. **Phytopathology Z**, v. 24, p. 97-112, 1955.

COSTA, A.S. Three whitefly-transmitted virus diseases of beans in São Paulo, Brazil. **FAO Plant Protection Bulletin**, v. 13, p. 121-130, 1965.

COSTA, A.S. Whitefly-transmitted plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v. 14, p. 429-440, 1976.

COSTA, A.S., BENNETT, C.W. Whitefly-transmitted mosaic of *Euphorbia prunifolia*. **Phytopathology**, v. 40, p. 266-283, 1950.

COSTA, A.S., COSTA, C.L., SAUER, H.F.G. Surto de mosca branca em culturas do Paraná e São Paulo. **Anais da Sociedade de Entomologia do Brasil**, v. 2, p. 20-30, 1973.

COSTA, A.S., MIRANDA, M.A.C., ALMEIDA, A.M.R. Ocorrência de infecção natural de certas cultivares de soja com o vírus do mosaico dourado do feijoeiro. **Anais do I Seminário Nacional de Pesquisa de Soja**, v. 1, p. 145-150, 1979.

COSTA, A.S.; OLIVEIRA, A.R., SILVA, D.M. Transmissão mecânica do mosaico dourado do tomateiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, v. 6, p. 147, 1975.

CREAMER, R., LUQUE-WILLIAMN, M. e HOWO, M. Epidemiology and incidence of beet curly top geminivirus in naturally infected weed hosts. **Plant Disease**, v. 80, p. 533-535, 1996.

CRESPI, S., ACCOTTO, G.P., CACIAGLI, P., GRONENBORN, B. Use of digoxigenin-labelled probes for detection and host-range studies of tomato yellow leaf curl geminivirus. **Research in Virology**, v. 142, p. 283-288, 1991.

CZOSNEK, H., BER, R., NAVOT, N., ZAMIR, D., ANTIGNUS, Y., COHEN, S. Detection of tomato yellow leaf curl virus in lysates of plants and insects by hybridization with a viral DNA probe. **Plant Disease**, v. 72, p. 949-951, 1988.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J., HICKS, J.B. A plant DNA miniprep: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 1, p. 19-21, 1983.

DENG, D., MCGRATH, P.F., ROBINSON, D.J., HARRISON, B.D. Detection and differentiation of whitefly-transmitted geminiviruses in plants and vector insects by the polymerase chain reaction with degenerate primers. **Annals of Applied Biology**, v. 125, p. 327-336, 1994.

DEVEREUX, J., HAEBERLI, P., SMITHIES, O. A comprehensive set of sequence analyses programs for the VAX. **Nucleic Acids Research**, v. 12, p. 387-395, 1987.

DRY, IB, KRAKE, L.R., RIGDEN, J.E., REZAIAN, M.A. A novel subviral agent associated with a geminivirus: the first report of a DNA satellite. **Proceedings of the National Academy of science of USA**, v. 94, p. 7088-7093, 1997.

EIRAS, M., RESENDE, R.O., ÁVILA, A. C. Detecção de vírus de plantas através da reação em cadeia da polimerase. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, p. 5-17, 1998.

ELMER, J.S., BRAND, L., SUNTER, G., GARDINER, W.E., BISARO, D.M., ROGERS, S.G. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus - II - The product of AL2 coding sequence is required for replication. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 7043-7060, 1988.

ETESSANI, P., SAUNDERS, K., WATTS, J. STANLEY, J. Mutational analysis of complementary sense genes of African cassava mosaic virus DNA A. **Journal of General Virology**, v. 72, p. 1005-1012, 1991.

FARIA, J.C., MAXWELL, D.P. Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. **Phytopathology**, v. 89, p. 262-268, 1999.

FERNANDES, J.J., FONTES, E.P.B., BROMMONSCHENKEL, S.H., CARVALHO, M.G., ZAMBOLIM, E.M., ZERBINI, F.M. Molecular cloning and sequencing of *Tomato rugose mosaic virus* (TRMV, a geminivirus isolated from tomato at "Triângulo Mineiro", Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 440, 2000.

FLORES, E., SIBERSHMIDT, K. Observation on a mosaic disease of *Leonurus sibiricus* occurring spontaneously in São Paulo. **Phytopathology Z**, v. 43, p. 221-233, 1962.

FONTES, E.P.B., EAGLE, P.A., SIPE, P.S., LUCKOW, V.A., HANLEY-BOWDOIN, L. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 269, p. 8459-8465, 1994a.

FONTES, E.P.B., GLADFELTER, H.J., SCHAFFER R.L., PETTY, I.T.D., HANLEY-BOWDOIN, L. Geminivirus replication origins have a modular organization. **Plant Cell**, v. 6, p. 405-416, 1994b.

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

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.

FRISCHMUTH, T., ZIMMAT, G., JESKE, H. The nucleotide sequence of Abutilon mosaic virus reveals prokaryotic as well as eukaryotic features. **Virology**, v. 178, p. 461-468, 1990.

GILBERTSON, R.L., FARIA, J.C., HANSON, S.F., MORALES, F.J., AHLQUIST, P.G., MAXWELL, D.P., RUSSEL, D.R. Cloning of the complete DNA genomes of four bean-infecting geminivirus and determining their infectivity by electric discharge particle acceleration. **Phytopathology**, v. 81, p. 980-985, 1991a.

GILBERTSON, R.L., HIDAYAT, S.H., MARTINEZ, R.T., LEONG, S.A., FARIA, J.C., MORALES, F.J., MAXWELL, D.P. Differentiation of bean-infecting geminivirus by nucleic acid hybridization probes and aspects of bean golden mosaic virus in Brazil. **Plant Disease**, v. 75, p. 336-342, 1991b.

GILBERTSON, R.L., FARIA, J.C., AHLQUIST, P., MAXWELL, D.P. 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**, v. 83, p. 709-715, 1993a.

GILBERTSON, R.L., HIDAYAT, S.H., PAPLOMATAS, E.J., ROJAS, M.R., HOU, Y.M., MAXWELL, D.P. Pseudorecombination between infectious cloned DNA-components of tomato mottle and bean dwarf mosaic geminivirus. **Journal of General Virology**, v. 74, p. 23-31, 1993b.

GUTIERREZ, C. Geminivirus DNA replication. **CMLS Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 56, p. 313-329, 1999.

HARPER, K., CREAMER, R. Hybridization detection of insect-transmitted plant viruses with digoxigenin-labeled probes. **Plant Disease**, v. 79, p. 563-567, 1995.

HARRISON, B.D., ROBINSON, D.J. Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted geminiviruses (begomoviruses). **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, p. 369-398, 1999.

HARRISON, B.D., ZHOU, X., OTIM-NAPE, G.W., LIU, Y., ROBINSON, D.J. Role of a novel type of double infection in the geminivirus-induced epidemic of severe cassava mosaic in Uganda. **Annals of Applied Biology**, v. 131, p. 437-448, 1997.

HILL, J.E., STRANDBERG, J.O., HIEBERT, E., LAZAROWITZ, S.G. Asymmetric infectivity of pseudorecombinants of cabbage leaf curl virus and squash leaf curl virus: implications for bipartite geminivirus evolution and movement. **Virology**, v. 250, p. 283-292, 1998.

HÖFER, P., ENGEL, M., JESKE, H., FRISCHMUNTH, T. Host range limitation of pseudorecombinant virus produced by two distinct bipartite geminivirus. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 10, p. 1019-1022, 1997.

HONG, Y.G., HARRISON, B.D. Nucleotide sequences from tomato leaf curl viruses from different countries: evidence for three geographically separate branches in evolution of the coat protein of whitefly-transmitted geminiviruses. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 2043-2049, 1995.

HULL, R. The potential for using dot-blot hybridisation in the detection of plant viruses. In: JONES, R.A.C., TORRANCE L. (Ed.). Developments and applications in virus testing. Great Britain: The Lavenham Press, 1986. p. 03-12.

IBGE. <http://www.ibge.br>

ISNARD, M., GRANIER, M., FRUTOS, R., REYNAUD, B., PETERSCHMITT, M. Quasispecies nature of three maize streak virus isolates obtained through different modes of selection from a population used to assess response to infection of maize cultivars. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 3091-3099, 1998.

IWAKI, M., THONGMEEARKOM, P., HONDA, Y., DEEMA, N. Soybean crinkle leaf: a new whitefly-borne disease of soybean. **Plant Disease**, v. 67, p. 546-548, 1983.

JUPIN, I., KOUCHKOVSKY, F., JOUANNEAU, F., GRONENBOURN, B. Movement of tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV): involvement of the protein encoded by ORF C4. **Virology**, v. 204, p. 82-90, 1994.

KARJALAINEN, R., ROUHIAINEN, L., SÖDERLUND, H. Diagnosis of plant viruses by nucleic acid hybridization. **Journal of Agricultural Science in Finland**, v. 59, p. 179-191, 1987.

KHEYR-POUR, A., BENDAHMANE, M., MATZEIT, V., ACCOTTO, G.P., CRESPI, S., GRONENBORN, B. Tomato yellow leaf curl virus from Sardinia is a whitefly-transmitted monopartite geminivirus. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 763-769, 1991.

KIM, K.S., FULTON, R.W. Ultrastructure of *Datura stramonium*-infected with an Euphorbia virus suggestive of a whitefly-transmitted geminivirus. **Phytopathology**, v. 74, p. 236-241, 1984.

KITAJIMA, E.W., KIM, K.S. Evidências citológicas de que o mosaico do *Leonurus*, mosaico dourado do capim mussambé, mosaico dourado do caupi e o broto crespo do tomateiro seriam geminivírus. **Fitopatologia Brasileira**, v. 12, p. 155, 1987.

KUMAR, S., TAMURA, K., JAKOBSEN, I.B., NEI, M. **MEGA 2**: Molecular evolutionary genetic analysis software, version 2.1. Tempe: Arizona State University, 2001 (programa de computador).

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

LAZAROWITZ, S.G., WU, L.C., ROGERS, S.G., ELMER, J.S. Sequence specific interaction with the viral AL1 protein identifies a geminivirus DNA replication origin. **Plant Cell**, v. 4, p. 799-809, 1998.

LEGG, J.P., THRESH, J.M. Cassava mosaic virus disease in East Africa: a dynamic disease in a changing environment. **Virus Research**, v. 71, p. 135-149, 2000.

LIU, L., van TONDER, T., PIETERSEN, G., DAVIES, J.W., STANLEY, J. Molecular characterisation of a subgroup I geminivirus from a legume in south Africa. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 2113-2117, 1997.

MATYS, J.C., SILVA, D.M., OLIVEIRA, A.A.R., COSTA, A.S. Purificação e morfologia do mosaico dourado do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v. 1, p. 267-274, 1975.

MCGRATH, P.F., HARRISON, B.D. Transmission of tomato leaf curl geminiviruses by *Bemisia tabaci*: effects of virus isolate and vector biotype. **Annals of Applied Biology**, v. 126, p. 307-316, 1995.

MEHTA, P., WYMAN, J.A., NAKLA, M.K., MAXWELL, D.P. Polymerase chain reaction detection of viruliferous *Bemisia tabaci* (Homoptera:Aleyrodidae) with two tomato-infecting geminiviruses. **Journal of Economical Entomology**, v. 87, p. 1285-1290, 1994.

MEINKOTH, J., WAHL, G. Hybridisation of nucleic acids immobilised on solid supports. **Analytical Biochemistry**, v. 138, p. 267-284, 1984.

MELO, P.C.T. **Mosca branca ameaça produção de hortaliças**. Asgrow, 1992. Asgrow Informe Técnico Sementes.

MENTEN, J.O.M., ROSTON, A.J. Mosaico dourado e a necessidade de regionalização da cultura do feijoeiro no Estado de São Paulo. **Revista Agrícola**, v. 55, p. 287-300, 1980.

MILLER, S.A., MARTIN, R.R. Molecular diagnosis of plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 26, p. 409-432, 1988.

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

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

MULLIS, K.B. The unusual origin of the polimerase chain reaction. **Scientific American**, v. 262, p. 56-65. 1990.

NATESHAN, H.M., MUNIYAPPA, V., SWANSON, M.M., HARRISON, B.D. Host range, vector relations and serological relationships of cotton leaf curl virus from Southern Indian. **Annals of Applied Biology**, v. 128, p. 233-244, 1996.

NAVAS-CASTILLO, J., DÍAZ, J.A., SÁNCHEZ-CAMPOS, S., MORIONES, E. Improvement of the print-capture polymerase chain reaction procedure for efficient amplification of DNA virus genomes from plants and insect vectors. **Journal of Virological Methods**, v. 75, p. 195-198, 1998.

NAVOT, N., PICHESKY, E., ZEIDAN, M., ZAMIR, D., CZOSNEK, H. Tomato yellow leaf curl virus: a whitefly-transmitted geminivirus with a single component. **Virology**, v. 185, p. 151-161, 1991.

NAVOT, N., ZEIDAN, M., PICHESKY, E., ZAMIR, D., CZOSNEK, H. Use of polymerase chain reaction to amplify tomato yellow leaf curl virus DNA from infected plants and viruliferous whiteflies. **Phytopathology**, v. 82, p. 1199-1202, 1992.

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.

PADIDAM, M., BEACHY, R.N., FAUQUET, C.M. Classification and identification geminiviruses using sequence comparisons. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 249-263, 1995.

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

RIBEIRO, S.G., AMBROZEVIĆIUS, L.P., ÁVILA, A. C., CALEGARIO, R.F., FERNANDES, J.J., LIMA, M. F., MELLO, R. N., ROCHA, H., ZERBINI, F.M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting geminiviruses in Brazil. **Archives of Virology**, 2002. (No prelo)

RIGDEN, J. E., KRAKE, L.R., REZAIAN, M.A.M, DRY, I.B. ORF C4 of tomato leaf curl geminivirus is a determinat of symptom severity. **Virology**, v. 204, p. 847-850, 1994.

ROBERTS, I.M, ROBINSON, D.J., HARRISON, B.D. Serological relationships and genome homologies among geminiviruses. **Journal of General Virology**, v. 65, p. 1723-1730, 1984.

ROJAS, M.R., GILBERTSON, R.L., RUSSEL, 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.

RYBICKI, E.B., BRIDDON, R.W., BROWN, J.K., FAUQUET, C.M., MAXWELL, D.P., HARRISON, B.D., MARKHAM, P.G., BISARO, D.M., ROBINSON, D., STANLEY, J. Geminiviridae. In: VAN REGENMORTEL, M.H.V., FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., CARSTENS, E., ESTES, M.K., LEMON, S., MANILOFF, J., MAYO, J.A., McGEOCH, D.J., PRINGLE, C.R., WICKNER, R. (Ed.) Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses; seventh report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. New York: Academic Press, 2000. p. 285-297.

RYBICKI, E.P. A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of Geminiviridae. **Archives of Virology**, v. 139, p. 49-77, 1994.

SAIKI, R.K., BUGAWAN, T.L., HORN, G.T., MULLIS, K.B., ERLICH, H.A. Analyses of enzymatically amplified - globin and HLA-DQ DNA with allele specific oligonucleotide probes. **Nature**, v. 324, p. 163-166, 1986.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., E MANIATIS, T. (Ed.). **Molecular cloning - a laboratory manual**, 2nd. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. s/p.

SANCHEZ-NAVARRO, J.A., CANO, E.A., PALLAS, V. Non-radioactive molecular hybridization detection of carnation mottle virus in infected carnations and its comparison to serological and biological techniques. **Plant Pathology**, v. 45, p. 375-382, 1996.

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

SHAMLOUL, A.M., ABDALLAH, N.A., MADKOUR, M.A., HADIDI, A. Sensitive detection of the Egyptian species of sugarcane streak virus by PCR-probe capture hybridization (PCR-ELISA) and its complete nucleotide sequence. **Journal of Virological Methods**, v. 92, p. 45-54, 2001.

SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, v. 98, p. 503-517, 1975.

STANLEY, J., SAUNDERS, K., PINNER, M.S., WONG, S.M. Novel defective interfering DNAs associated with ageratum yellow vein geminivirus infection of *Ageratum conyzoides*. **Virology**, v. 239, p. 87-96, 1997.

STANLEY, J., TOWNSEND, R. Characterisation of DNA forms associated with cassava latent virus infection. **Nucleic Acids Reserch**, v. 13, p. 2189-2206, 1985.

SWANSON, M.M., BROWN, J.K., POULOS, B.T., HARRISON, B.D. Genome affinities and epitope profiles of whitefly-transmitted geminiviruses from the Americas. **Annals of Applied Biology**, v. 121, p. 285-296, 1992.

THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acid Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TIMMERMANS, M.C.P., DAS, O.P., MESSING, J. Geminivirus and their use as extrachromosomal replicons. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 45, p. 79-112, 1994.

TORRES-PACHECO, I., GARZÓN-TIZNADO, J.A., BROWN, J.K., BECERRA-FLORA, A., RIVERA-BUSTAMANTE, R. Serological and biological variation between and within subgroup I and II strains of cucumber mosaic virus. **Phytopathology**, v. 41, p. 282-297, 1992

WEGE, C., GOTTHARDT, R.D., FRISCHMUTH, T., JESKE, H. Fulfilling Koch's postulates for *Abutilon mosaic virus*. **Archives of Virology**, v. 145, p. 2217-2225, 2000.

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

ZERBINI, F.M., AMBROZEVICIUS, L.P., NAGATA, A.K.I. Diagnose molecular de fitoviroses. In: ALMEIDA, A.M.R., LIMA, J.A. (Ed.) **Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitovirologia**. Brasília: SBF, 2001. p. 95-124.

ZHOU, X., LIU, Y., CALVERT, L., MUÑOZ, C., OTIM-NAPE, G.W., ROBINSON, D.J., HARRISON, B.D. Evidence that DNA-A of geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 2101-2111, 1997.

ZHOU, X.P., ROBINSON, D.J., HARRISON, B.D. Types variation in DNA-A among isolates of East African cassava mosaic virus from Kenya, Malawi and Tanzania. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 2835-2840, 1998.