**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Identificação de isolados do *Sida mottle virus* e *Sida micrantha mosaic virus* não transmissíveis por *Bemisia tabaci* biótipo B que infectam maracujazeiros (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*)

Ana Carolina Christino de Negreiros Alves

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba
2012**

Ana Carolina Christino de Negreiros Alves
Engenheiro Agrônomo

**Identificação de isolados do *Sida mottle virus* e *Sida micrantha mosaic virus*
não transmissíveis por *Bemisia tabaci* biótipo B que infectam maracujazeiros
(*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*)**

Orientador:
Prof. Dr. **JORGE ALBERTO MARQUES REZENDE**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Alves, Ana Carolina Christino de Negreiros

Identificação de isolados do *Sida mottle virus* e *Sida micrantha mosaic virus* não transmissíveis por *Bemisia tabaci* biótipo B que infectam maracujazeiros (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) / Ana Carolina Christino de Negreiros Alves.- - Piracicaba, 2012. 71 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Geminivirus 2. Insetos vetores 3. Maracujá 4. Mosca-branca 5. Proteção cruzada I. Título

CDD 634.425
A474i

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

*Aos meus pais, Mara e Acácio, a minha avó Nena (in memoriam) e ao meu irmão
Marcus Vinicius,
Dedico.*

*As minhas tias Jenny e Ângela,
Ofereço*

AGRADECIMENTOS

A Deus, ao meu anjo da guarda (que por sinal tem sempre muito trabalho...) e a todos aqueles que me auxiliaram durante todo este tempo.

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) pela formação profissional e momentos preciosos da minha vida. Em especial ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia, aos seus docentes e funcionários, pela estrutura e assistência oferecidas desde a iniciação científica.

Ao Professor Jorge A. M. Rezende pela orientação, amizade, estímulo, compreensão e principalmente ter sido um bom exemplo durante todos estes anos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade e apoio financeiro.

A Dra. Alice K. I. Nagata e toda sua equipe do Lab. de Biologia Molecular (Embrapa Hortaliças) pelo grande auxílio na parte molecular deste trabalho e por sempre me receberem muito bem. Em especial a Dr. Leonardo C. Albuquerque e Dra. Sarah da S. Barreto que se mostraram ótimos colegas de trabalho.

Aos professores Dr. João R. Spotti Lopes e Dr. Fernando L. Cônsoli pelas preciosas explicações e auxílio relacionado aos aleyrodídeos.

Ao Prof. Dr. José R. P. Parra e sua equipe do Laboratório de Biologia de Insetos, por cederem o local para criação dos insetos quando precisamos.

Ao Prof. Dr. Francisco A. O. Tanaka por ceder o estereomicroscópio do NAP/ MEPA e as conversas animadoras durante o trabalho.

A Profa. Dra. Elaine Carrer e ao futuro doutor André Luiz Barbosa, por possibilitarem o procedimento de inoculação por biobalística.

Aos colegas Dr. Julio César Barbosa, Pedro Javier Mansilla Córdova e David M. de A. Spadotti pela grande cooperação na fase final desta tese e pelos experimentos realizados em conjunto.

Aos funcionários da biblioteca Central pelo auxílio de formatação de tese, comutações e atenção oferecida durante o curso.

Aos meus companheiros de laboratório de ontem e de hoje: José S. Giampam (Minuto), Scheila C. Maciel, Marília D. Vecchia, Estela Bonilha (Sorvete), Daniel Nakano (Teu-Ki), Adriana G. Moreira, Ana Paula O. A. Mello, Joice K. Banin, Ana C. Firmino, Adriana S. Jadão, Rogério Augusto Pazim (PaH), Vanessa C. dos Santos e Viviana Carmelo pelos tantos bons momentos, por tudo o que me ensinaram e aprendemos juntos. Em especial a David M. de A. Spadotti, Débora M.

S. Freitas e a Pedro Javier M. Córdova, pela cooperação nas disciplinas e trabalhos no laboratório, companhia no estudo de espanhol, participação em festas e afins, presença nos momentos não muito felizes e o mais importante: amizade.

Ao Grupo de Estudos da fitopatologia (GEFITO) e todos os seus membros pelas experiências compartilhadas.

Aos meus grandes amigos, Bárbara Eckstein, Alexandre José F. Diniz, Júlio César Barbosa, Ely O. Garcia, Juliana Ramiro, Wagner V. Pereira, Ariana E. Vilella, Oscar e Greicy Sarria Villa por simplesmente existirem. Encontrar pessoas boas e verdadeiras como eles foi um dos grandes presentes que Deus me deu nesta fase. Obrigada por caminharem comigo e terem feito todos os caminhos mais bonitos.

A todos os colegas de pós-graduação, em especial aos do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, pela boa convivência.

Ao centro espírita “Aprendizes do evangelho”, ao “Barracão da Luz”, a Paula Cristina P. Sebastião e Luiz R. Xavier, pela amizade, tantos bons momentos e fazerem parte daquilo que “mudou o meu universo”.

Finalmente, mas de forma alguma menos importante, agradeço à minha família. Mãe, pai, irmão, tios, primos, cachorros e afins. Por nossas diferenças e nossas semelhanças, que fizeram parte da construção do que eu sou hoje. Em especial a minha mãe que sempre “apoiou um jovem pesquisador” e ao Flokinhos que esteve ao meu lado durante toda a redação desta tese, esperando pacientemente a “mamãe” terminar o parágrafo para ele ir passear....

*“Nada na vida é para ser temido,
é apenas para ser compreendido.”
Dra. Marie Curie*

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 DESENVOLVIMENTO	17
2.1 Sobre o maracujazeiro	17
2.2 Sobre os begomovirus.....	20
2.3 Sobre a <i>Bemisia tabaci</i>	22
2.4 Material e Métodos.....	28
2. 5 Resultados e discussão.....	39
2.5.1 Caracterização molecular dos isolados	39
2.5.2 Transmissão dos isolados	41
2.5.3 Proteção pela forma atenuada	50
3 CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXOS	63

RESUMO

Identificação de isolados de *Sida mottle virus* e *Sida micrantha mosaic virus* não transmissíveis por *Bemisia tabaci* biótipo B que infectam maracujazeiros (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*)

Doenças causadas por vírus do gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) são incomuns em espécies de passifloras. Nos últimos dez anos, entretanto, foram encontrados no Brasil begomovirus infectando passifloras em pomares nos municípios de São Fidelis (RJ), Paragominas (PA), Patos de Minas (MG) e Araguari (MG). Estes isolados foram transmitidos mecanicamente para plantas de *Nicotiana benthamiana*, que apresentaram sintomas de mosaico e deformação foliar. Também foi possível a transmissão para plantas de *Sida rhombifolia* através de inoculação por biobalística com o DNA amplificado do isolado de São Fidelis. Estas plantas demonstraram sintomas de mosaico amarelo e deformação foliar. O DNA total extraído de plantas infectadas foi amplificado por RCA, sendo que o componente A (DNA-A) dos isolados de Paragominas e Patos de Minas foram sequenciados diretamente por “primer walking”. O DNA-A dos isolados de São Fidelis e Araguari foram clonados e sequenciados. As sequências de nucleotídeos dos isolados de Paragominas e de São Fidelis apresentaram 90% de similaridade ao *Sida mottle virus* (SiMoV), enquanto a sequência de nucleotídeos do isolado de Araguari apresentou 96% de similaridade ao *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV). Assim esses isolados encontrados em maracujazeiro podem ser considerados estirpes do SiMoV e SimMV, respectivamente. Não foi possível a transmissão desses isolados através de *Bemisia tabaci* biótipo B, no entanto, os insetos foram capazes de adquirir o vírus. O isolado de São Fidelis foi detectado separadamente na região onde se encontra a glandula salivar (cabeça e protórax) e na região posterior do inseto, indicando que o vírus transpos a barreira do mesenteron e circulou pela hemolinfa do inseto. Alves (2008) obteve uma forma atenuada do isolado de São Fidelis através de inoculações mecânicas em plantas de *N. benthamiana*. O DNA-A desta forma atenuada foi sequenciado e apresentou 90% de identidade ao isolado do qual se originou. A forma atenuada do begomovirus foi capaz de proteger plantas de maracujazeiro contra a estirpe severa do vírus.

Palavras-chave: Maracujazeiro; Geminivirus; *Bemisia tabaci*; Proteção cruzada

ABSTRACT

Identification of *Sida mottle virus* and *Sida micrantha mosaic virus* isolates non transmissible by *Bemisia tabaci* biotype B infecting passionflower (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*)

Diseases caused by begomoviruses (family *Geminiviridae*) are hardly found in *Passiflora* species. In the last years, however, begomovirus infected passionflowers were found in orchards in the counties of São Fidelis (state of Rio de Janeiro), Paragominas (Pará), Araguari and Patos de Minas (Minas Gerais). These isolates were mechanically transmitted to *Nicotiana benthamiana* plants, which showed variable symptoms of mosaic and leaf distortion. Another susceptible host is *Sida rhombifolia*, which was biolistic inoculated with amplified DNA of São Fidelis isolate, and showed symptoms of yellow mosaic and leaf distortion. Total DNA extracted from field infected passionflower was amplified by RCA, and the DNA-A of Paragominas and Patos de Minas isolates were directly sequenced by primer walking. The A component of São Fidelis and Araguari isolates were cloned and also completely sequenced. The complete nucleotide sequence of DNA-A of Araguari isolate shared 96% identity with that of *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV), whereas the DNA-A of Paragominas and São Fidelis isolates shared 90% identity with that of *Sida mottle virus* (SiMoV). These viruses may be considered as strains of SiMoV and SimMV, respectively. It was not possible to transmit these isolates by *Bemisia tabaci* biotype B, although the insects were able to acquire the virus. São Fidelis isolate could be detected separately at salivary gland region and posterior region of the insect, indicating that the virus could cross the digestive tract and circulate in the hemolymph. Alves (2008) obtained a mild strain of São Fidelis isolate by mechanical inoculation in *N. benthamiana* plants. The mild isolate was able to protect passionflower against the severe isolate of this begomovirus.

Keywords: Passion flower; Geminivirus; *Bemisia tabaci*; Cross protection

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá, possuindo uma área estimada em 48.000 ha e uma produção total de 600.000 t de frutos (FNP, 2011). As espécies de *Passiflora* mais plantadas no país são *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, conhecida como maracujá amarelo ou azedo e *P. alata*, o maracujá doce. A cultura tem grandes perdas quantitativas e qualitativas de produção devido a doenças fúngicas, bacterianas e principalmente de natureza viral. O endurecimento dos frutos, causado pelo potyvirus *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), é a mais importante doença da cultura. Este vírus encontra-se distribuído por todas as áreas produtoras de maracujá no território nacional e causa prejuízos significativos na produção quantitativa e qualitativa do maracujazeiro, além de reduzir a vida útil do pomar. O controle da virose é difícil, uma vez que as populações comerciais de maracujazeiro são suscetíveis ao CABMV e o vírus pode ser transmitido durante os tratos culturais e de modo não persistente por diversos pulgões, o que torna o controle químico dos insetos ineficiente (KITAJIMA; CHAGAS; CRESTANI, 1986; GIORIA et al., 2000; REZENDE; KITAJIMA, 2003; NASCIMENTO et al., 2006; FISCHER; REZENDE, 2008).

Alguns anos atrás foi constatada a presença de um vírus da Família *Geminiviridae*, Gênero *Begomovirus*, então denominado Passion flower little leaf mosaic virus (PLLMV), em infecção mista com o CABMV, causando grandes prejuízos em plantios de maracujazeiro no Estado da Bahia (NOVAES et al., 2002, 2003). Posteriormente infecções com outros begomovirus foram encontradas em pomares de maracujazeiro em diferentes regiões do Brasil. Lima et al. (2005) detectaram no estado de Alagoas um begomovirus infectando maracujazeiro e observaram a presença de poucos alelodídeos no pomar. Ferreira et al. (2009) descreveram um begomovirus infectando maracujazeiros no Estado da Bahia, tentativamente chamado Passionfruit severe leaf distortion virus (PSLDV). Análise da sequência de nucleotídeos do DNA-A deste vírus indicaram 77% de similaridade com o DNA correspondente do *Tomato chlorotic mottle virus*.

Foram detectados também begomovirus em plantas isoladas de maracujazeiro nos Estados do Rio de Janeiro (MOREIRA et al., 2006), Minas Gerais e Pará (REZENDE, dados não publicados). Até o momento, no entanto, essas begomovirose não parecem constituir grave ameaça para a cultura do

maracujazeiro, especialmente pelo fato de esta espécie vegetal não ser preferida para alimentação de *Bemisia tabaci* biótipo B (NUNES et al., 2008), inseto vetor de begomovirus.

Apesar da pouca importância dessa virose no momento, estudos devem ser desenvolvidos para elucidar as características biológicas da doença. Esse conhecimento poderá ser útil para elaboração de estratégias de manejo, caso ocorram aumentos na incidência da doença no futuro. Assim sendo, os objetivos deste trabalho foram caracterizar molecularmente os isolados de begomovirus encontrados em maracujazais nos estados de Minas Gerais, Pará e Rio de Janeiro, bem como avaliar a relação com o possível vetor, *B. tabaci* biótipo B. Fez-se também a caracterização molecular de uma forma atenuada de begomovirus de maracujazeiro obtida por Alves (2008) e avaliação de seu efeito protetor em plantas de maracujazeiro contra uma forma severa de begomovirus, o isolado de São Fidelis.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Sobre o maracujazeiro

O termo maracujazeiro é a denominação genérica de cerca de quinhentas espécies de *Passiflora*, a maioria nativa da América Tropical (SALOMÃO; ANDRADE, 1987; VANDERPLANK, 1996). As *Passifloraceae* americanas estão distribuídas em quatro gêneros (*Dilkea*, *Tetrastylus*, *Mitostemma* e *Passiflora*) sendo o gênero *Passiflora* de longe o mais importante, com 519 espécies reconhecidas (ESCOBAR, 1988). O número de espécies nativas encontradas no Brasil está em torno de 150, sendo a região Centro-Norte a maior em distribuição. O gênero *Passiflora* apresenta uma grande diversidade genética, com espécies divergindo quanto a morfologia, resistência às doenças, florescimento, entre outras. Estima-se que neste gênero há 50 a 60 espécies de *Passiflora* com fruta comestível (BRUCKNER; OTONI, 1999). Além do uso alimentício, as passifloras também podem ser exploradas para ornamentação e fins medicinais. O uso de passifloras em ornamentação é muito restrito no Brasil, no entanto vem crescendo em países do Hemisfério Norte, onde são cultivadas espécies como *P. caerulea* e *P. incarnata*. O uso medicinal de espécies de *Passiflora* faz parte da cultura de povos americanos, europeus e asiáticos, sendo recomendadas flores, folhas, frutos ou mesmo raízes para tratamento de diversas enfermidades desde verminoses a tumores gástricos. O uso medicinal se popularizou, no entanto, pelos efeitos benéficos ao sistema nervoso, em tratamentos de insônia, histeria e depressão, atribuídos em especial as espécies *P. alata* e *P. foetida*. Algumas espécies de maracujá também são apontadas como alimento funcional, ou seja, contribuem para manutenção da saúde ou reduzem a probabilidade de que ocorra uma doença, como *P. edulis* no tratamento de obesidade e diabetes (COSTA; TUPINAMBÁ, 2005; PEIXOTO, 2005).

O maracujá azedo ou amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa*) é uma planta alógama, com número de cromossomos $2n = 18$, que apresenta auto-incompatibilidade sem diferenciação morfológica na flor (homomórfica) e determinada pelo pólen (esporofítica) dentro da mesma flor e entre flores da mesma planta. O florescimento é afetado por condições de temperatura, precipitação e principalmente pelo fotoperíodo, sendo que a quantidade de dias longos acaba por determinar o período de safra de uma região. Cada flor abre uma única vez, durante o período de maior

insolação do dia, e caso não seja polinizada a flor murcha e cai. O agente polinizador é exclusivamente a mamangava (*Xylocopa* sp), isto porque insetos menores podem coletar néctar sem realizar a polinização e não há envolvimento do vento na polinização devido ao pólen ser pesado e pegajoso (SOUZA; MELETTI, 1997; FALEIRO; JUNQUEIRA; BRAGA, 2005). Diversos autores descrevem que quanto maior a eficiência na polinização maior será a frutificação, produção de suco, número de sementes e peso dos frutos. Desta forma, a produtividade final do maracujazeiro depende do inseto ou de polinizações artificiais. Freitas e Oliveira Filho (2003) observaram que ao favorecer a presença das mamangavas através do uso de colmeias racionais houve um incremento de 92% na frutificação, e por consequência na produção final da área. Outras medidas que favorecem o inseto também são interessantes, como o manejo de produtos fitossanitários e plantio de plantas alternativas para a *Xylocopa*, como hibiscus ou *Crotalaria juncea*. Muitas regiões produtoras de maracujá-amarelo apresentam uma concentração populacional baixa de mamangavas, tornando a polinização artificial uma alternativa economicamente viável para a cultura. A polinização artificial é um processo relativamente simples, onde o pólen é coletado das anteras de flores abertas ou ainda em botão com auxílio de uma espátula (ou dedeira), e posteriormente as flores são apenas tocadas com esta espátula (CAMILLO, 2003; FALEIRO; JUNQUEIRA; BRAGA, 2005). A produtividade do maracujazeiro também está relacionada a radiação solar, sendo observado que curtos períodos de sombreamento durante o dia são capazes de causar alterações morfológicas e redução da produção. As condições ideais de produção do maracujazeiro incluem médias de temperaturas anuais de 23° a 27°C e precipitação de 800 a 1750 mm ao ano (PEREIRA, 2008).

O maracujá azedo representa cerca de 97% da área plantada de passifloras no Brasil. A cultura é propagada principalmente por sementes, da mesma forma que em outros países produtores como o Havaí, Equador, Quênia, entre outros, havendo poucas exceções onde são utilizados híbridos enxertados (SOUZA; MELETTI, 1997; FALEIRO; JUNQUEIRA; BRAGA, 2005). O Brasil produz atualmente cerca de 600 mil toneladas de fruto ao ano em uma área estimada em 48 mil hectares. A produção vem apresentando crescimento, principalmente desde a safra de 2006. O Estado da Bahia é o maior produtor nacional, com cerca de 275 mil toneladas de fruto produzidas em 2008, seguido pelo Estado do Ceará (aproximadamente 112 mil toneladas de fruto/ano), Espírito Santo (66 mil toneladas de fruto/ano) e demais

estados com produção muito inferior. Esta produção é quase que totalmente absorvida pelo mercado interno, havendo pouca exportação de frutos. O maracujazeiro pode ser plantado em ampla faixa de latitude (40° N a 35° S) estando presente de forma comercial em quase todo o país, exceto nos estados da região Sul, devido a condições ambientais não favoráveis (SOUZA; MELETTI, 1997; FNP, 2011).

A cultura do maracujá azedo adquiriu expressão econômica na década de 80, inicialmente pelo incentivo da agroindústria, que estimulou o mercado do produto processado na forma de suco e, em seguida, pela crescente demanda no segmento *in natura*. A fruta, que era pouco comum nos mercados de atacado e varejo do país passou a ter seu espaço garantido. Os primeiros cultivares de maracujazeiro tornaram-se disponíveis somente a partir de 1999, com algumas seleções regionais como a Maguary (mais cultivada em Minas Gerais), Sul-Brasil, Golden Star (Rio de Janeiro e Espírito Santo) e as cultivares desenvolvidas pelo Instituto Agrônomo da Campinas: IAC Monte-Alegre, IAC – Jóia e IAC- Maravilha, antigas IAC 273, 277 e 275 respectivamente, mais utilizadas no Estado de São Paulo. Estas representam um avanço considerável em produtividade e qualidade de frutos para consumo *in natura* e industrial, porém deixam a desejar quanto à resistência as moléstias. A partir de 2000 o melhoramento genético se desenvolveu para atender aos novos padrões da indústria e consumo e também intensificar a busca por resistência varietal as principais doenças limitantes da cultura, a fusariose (*Fusarium solani*), a bacteriose ou morte precoce (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*) e ao vírus causador do endurecimento dos frutos do maracujazeiro (CABMV) (MELETTI, 2001; FALEIRO; JUNQUEIRA; BRAGA, 2005).

A busca por resistência genética às doenças do maracujazeiro na verdade teve início a mais de duas décadas, por meio de cruzamentos artificiais com espécies silvestres que possuem grande variabilidade genética a ser explorada nos programas de melhoramento genético. Como exemplos podem ser citadas as espécies *P. giberti*, *P. caerulea*, *P. suberosa*, *P. cincinnata*, *P. foetida*, *P. gilberti*, *P. laurifolia* e *P. maliformis*, que possuem resistência à bacteriose (*X. axonopodis* pv. *passiflorae*). *P. nitida* e *P. mucronata* são pouco afetadas pela infecção de *Nectria haematococca*, agente causal de cancrios e desintegração de tecidos corticais do colo e das raízes das plantas, com consequente morte dessas. *P. suberosa* é resistente ao vírus do mosaico do maracujá roxo (PGMV) e imune ao CABMV. *P.*

caerulea é resistente a fusariose (*F. solani*). *P. macrocarpa*, *P. caerulea* e *P. cincinnata* apresentam resistência ao nematóide *Meloidogyne incognita*. *P. serrato-digitata* e *P. amethystina* são resistentes a *Colletotrichum gloeosporioides*, causador da antracnose nos frutos e ramos. A murcha de fusarium (*Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*) pode ser controlada com uso de porta-enxerto resistente, *P. alata*, *P. quadrangularis* ou *P. macrocarpa* (BRAGA; JUNQUEIRA, 2000; RONCATTO et al., 2004; JUNQUEIRA et al., 2005; FISCHER et al., 2005; FISCHER; REZENDE, 2008; MACIEL et al., 2009).

2.2 Sobre os begomovirus

Begomovirus é o maior gênero dentro da família *Geminiviridae*, com 192 espécies virais aceitas atualmente e outras 86 espécies candidatas. Os geminivirus são caracterizados por apresentarem partículas icosaédricas geminadas, fato que deu origem ao nome da família, e ácido nucléico constituído de DNA circular de fita simples (ssDNA). Há um componente genômico nos gêneros *Mastrevirus*, *Curtovirus* e *Topocuvirus* e dois componentes, chamados A e B, no gênero *Begomovirus*. A maioria dos begomovirus possui DNA-A e DNA-B, havendo algumas exceções que possuem apenas o DNA-A, como o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), o *Ageratum yellow vein virus* (AYVV) e o *Tomato leaf curl virus* (ToLCV). O componente A contém genes necessários para a replicação viral e encapsidação. No sentido viral, o componente A codifica a proteína capsidial (CP, ORF AV1/V1), principal fator de especificidade do vetor, enquanto que no sentido complementar são codificadas as proteínas associadas a replicação (REP, ORF AC1/AC1), a C4 (ORF C4/C4) e um fator de transcrição (TrAP, ORF AC2/AC2). O componente B contém genes ligados a movimentação sistêmica (MP, ORF BC1) e movimentação na célula (NSP, ORF BV1). Estes componentes tem tamanho similar, entre 2.5 a 2.6 Kb, e ambos possuem uma região de aproximadamente 200 pb chamada região comum (RC) que apresenta alta homologia (cerca de 90%). Nesta região comum está inserida uma sequência de nove nucleotídeos (TAATATTAC), o domínio funcional da origem de replicação, que será clivado no início da replicação viral, processo que ocorre pelo mecanismo de círculo rolante. Além da organização genômica, os begomovirus também podem ser distinguidos dos demais gêneros dentro da família *Geminiviridae* por serem transmitidos por aleyrodídeos, alguns

também por transmissão mecânica, à espécies de dicotiledôneas como feijoeiro, soja, tomateiro, entre outras. *Curtovirus* e *Topocuvirus* são transmitidos à espécies dicotiledôneas por cigarrinhas das famílias *Cicadellidae* e *Membracidae*, respectivamente. Os *Mastrevirus* também são transmitidos por cigarrinhas (Homoptera: Cicadellidae) para monocotiledôneas, havendo algumas espécies que infectam dicotiledôneas (KHAN; DIJKSTRA, 2002; FARIA; ZERBINI, 2000; NAVAS-CASTILLO, 2011; KING et al., 2012).

Infecções causadas por begomovirus não são encontrados com frequência em maracujazeiro, provavelmente devido ao hábito alimentar do vetor *B. tabaci*, que tem o maracujá-amarelo como espécie não preferida para alimentação e colonização (NUNES et al., 2008). No entanto há relatos destes vírus em associação a passifloras. O primeiro relato de infecção por begomovirus em maracujazeiro no Brasil foi feito por Novaes et al. (2003) em pomares de maracujá-amarelo nos municípios de Livramento de Nossa Senhora e Bom Jesus da Lapa, Bahia. No primeiro município, todas as plantas estavam infectadas com o begomovirus, tentativamente chamado Passion flower little leaf mosaic vírus (PLLMV), e o CABMV, sendo observada que esta alta incidência do begomovirus em maracujazeiros estava associada à colonização das plantas pelo aleyrodídeo *B. tabaci*. Adultos do inseto coletados nas plantas infectadas no campo e transferidos para plantas sadias de maracujazeiro comprovaram a transmissão do PLLMV e permitiram o seu isolamento da infecção mista com o CABMV. Plantas de maracujazeiro infectadas apenas com esse begomovirus exibem mosaico amarelo, severa redução no tamanho das folhas novas e redução do crescimento vegetativo. A sequência de nucleotídeos de parte do DNA A, que corresponde à região central do gene da proteína capsial, mostrou similaridade deste begomovirus ao *Sida mottle virus* (SiMoV) (89,2 %), isolado de *Sida rhombifolia* em Viçosa, Minas Gerais (NOVAES et al., 2003). Em Andradina (AL) também foi detectado um begomovirus infectando maracujazeiro e observada a presença de poucos aleyrodídeos, porém não há sequência de nucleotídeos disponível para comparação (LIMA et al., 2005). Ferreira et al. (2009) descreveram um begomovirus infectando maracujazeiros no Estado da Bahia, tentativamente chamado Passionfruit severe leaf distortion vírus (PSLDV). Análise da sequência de nucleotídeos do componente A deste vírus indicou 77% de similaridade com o DNA correspondente do *Tomato chlorotic mottle virus*. No caso do DNA – B a maior porcentagem de identidade foi encontrada com o

Tomato spot yellow virus (74%). Os autores transmitiram o begomovirus através de biobalística para plantas de *Datura stramonium*, *Nicotiana benthamiana* e *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker. Uma outra espécie de begomovirus, tentativamente denominada *Passiflora leaf mottle virus*, foi encontrada infectando maracujazeiros em Porto Rico (BROWN; BIRD; FLETCHER, 1993). O vírus foi posteriormente identificado como sendo *Jathropa mosaic virus* (JMV). Esse vírus foi transmitido experimentalmente pela *B. tabaci* de plantas infectadas de *Jatropha gossypiflora* e *J. multifida* para essas duas espécies e para *P. foetida* e *P. edulis* f. *flavicarpa* (BROWN; BIRD, 1996; BROWN, 2001).

2.3 Sobre a *Bemisia tabaci*

Bemisia tabaci é uma espécie da ordem *Hemiptera*, subordem *Sternorhyncha*, família *Aleyrodidae*. São insetos pequenos (cerca de 1 mm de comprimento) e recobertos por uma pulverulência branca, o que levou a denominação popular “mosca-branca”. O aparelho digestivo destes insetos tem forma de câmara-filtro, ou seja, uma câmara onde o excesso de líquido sugado passa diretamente para o final do tubo digestivo, sendo eliminado pelo ânus em forma de gotículas (“honeydew”), o que permite a sucção contínua de seiva pelo inseto, uma vez que este se alimenta de um suco concentrado e de fácil absorção. O ciclo de vida do inseto é de aproximadamente 15 dias, sendo que a fêmea vive aproximadamente 18 dias. O inseto sofre quatro ecdises até atingir a forma adulta, sendo que as ninfas ficam aderidas na face inferior das folhas e tem pouca mobilidade. A última forma jovem, denominada ninfa IV é imóvel e não se alimenta, sendo por isso erroneamente chamada de “pupa”. A reprodução desta espécie pode ser sexuada, no entanto, ocorre preferencialmente através de partenogênese arrenótoca, onde ovos não fecundados dão origem a machos (NAKANO et al., 2002; GULLAN; CRASTON, 2005).

O centro de origem da *B. tabaci* é possivelmente a Índia e regiões próximas, isto baseado em diversos indícios e principalmente no grande número de inimigos naturais encontrados nestas regiões. Atualmente a espécie é encontrada em todos os continentes, em exceção a Antártida, sendo relatadas mais de 900 espécies de plantas hospedeiras do inseto (NAKANO et al., 2002; GULLAN; CRASTON, 2005; GISD, 2012).

A partir da década de 80 foram observados nos EUA aleyrodídeos com comportamento alimentar diverso e mais amplo do que as antigas populações de *B. tabaci*, causando prejuízos em feijoeiro, algodoeiro, tomateiro e outras culturas. Estes insetos se destacavam pelo alto potencial reprodutivo (300 ovos/fêmea) em comparação as antigas populações de *B. tabaci* (próximas a 100 ovos /fêmea), ampla adaptação a novos hospedeiros e ampla eficiência na transmissão de vírus. Estudos baseados na morfologia da última ninfa (IV) e moleculares sugeriram se tratar de biótipos dentro da espécie *B. tabaci*, sendo as populações antigas chamadas biótipo A (New world) e o novo biótipo, B (Middle East-Asia Minor). Posteriormente foram descritos mais de 30 diferentes biótipos. Estes biótipos podem diferir entre si quanto aos hospedeiros preferenciais (espécies e mesmo variedades de plantas), capacidade de transmissão de vírus, capacidade de induzir reações fisiológicas típicas nos hospedeiros e até mesmo incompatibilidade de cruzamentos, ou seja, infertilidade. Também há vasta variabilidade entre estes grupos quando analisadas proteínas ou sequências de DNA do inseto (BROWN; BIRD, 1992; DE BARRO et al., 2011; MARKHAM et al., 1996; PERRING, 2001; SSERUWAGI et al., 2005; GHANIM et al., 2001, 2007). Estas características (que ora indicavam espécies diferentes e ora apenas grupos regionalizados) somadas a quase impossibilidade de diferenciação morfológica entre estes aleyrodídeos, levaram a dúvidas quanto a sua classificação. Recentemente, De Barro et al. (2011) avaliaram algumas características biológicas e sequências parciais de nucleotídeos do gene da citocromo oxidase 1 da mitocôndria (mtCO1) do inseto e sugeriram em sua revisão haver, na verdade, 11 grupos bem definidos contendo cerca de 24 espécies indistinguíveis pela morfologia dentro destes. Os biótipos B e B2, por exemplo, formariam uma espécie pertencente ao grupo Africa/Middle East/Asia Minor. Neste trabalho estes insetos serão tratados ainda como biótipos apenas para facilitar a narração e interpretação.

O biótipo B provavelmente surgiu na região que compreende o Iran, Israel, Jordânia, Arábia Saudita, Paquistão e Iêmen (Middle East-Asia minor) e foi disperso no final dos anos 80, possivelmente junto ao comércio de plantas ornamentais (BROWN; BIRD, 1992; MARKHAM et al., 1996; JONES, 2003; DE BARRO; TRUEMAN; FROHLICH, 2005; DE BARRO et al., 2011). No Brasil a partir do início da década de 90 foram registrados aumentos populacionais e outros indícios de que o então chamado biótipo B estava presente em culturas de algodoeiro, tomateiro e

outras, bem como em plantas daninhas como *Sida rhombifolia*, *Ipoema sp*, *Sonchus oleraceae* e outras (LOURENÇÃO; NAGAI, 1994). Recentemente Valle et al. (2011) avaliaram *B. tabaci* encontradas nos estados de São Paulo, Bahia e Mato Grosso. Os autores observaram que há uma variação na população em função de isolamento geográfico, no entanto, os insetos amostrados pertenciam todos ao que se chama biótipo B, semelhante ao obtido por Rocha et al. (2011) estudando populações do estado de São Paulo em diversas hortaliças.

B. tabaci pode causar grandes danos às plantas pela alimentação direta no floema, excreção de “honeydew”, que atua como substrato para crescimento fúngico na superfície das folhas (fumagina), o que reduz a capacidade fotossintética da planta e principalmente a transmissão de vírus. Aleyrodídeos podem transmitir vírus dos gêneros *Crinivirus* (*Closteriviridae*), *Ipomovirus* (*Potyviridae*), *Carlavirus* (*Betaflexiviridae*), *Torradovirus* (*Secoviridae*) e em maior número *Begomovirus* (*Geminiviridae*). Espécies dos três primeiros gêneros são transmitidas de forma semipersistente por *B. tabaci*, sendo que os crinivirus também podem ser transmitidos por espécies do gênero *Trialeurodes*. Os membros do gênero *Torradovirus* são transmitidos por *B. tabaci* e *T. vaporariorum* de forma ainda não conhecida (BROWN; BIRD, 1992; NAVAS-CASTILLO et al., 2011).

Os Begomovirus são transmitidos por *B. tabaci*, constituindo o grupo mais numeroso de vírus transmitidos por este inseto, e causam sérios danos em diversas culturas como soja, feijoeiro, algodoeiro, mandioca, fumo, crucíferas, cucurbitáceas e solanáceas (JONES, 2003). As ocorrências de epidemias destes vírus ou mesmo a emergência de novas espécies de begomovirus foram diretamente relacionadas ao aumento de populações de *B. tabaci* biótipo B, introdução em alguns locais ou sua adaptação a outros hospedeiros (BROWN; BIRD, 1992; MARKHAM et al., 1996; JONES, 2003; DE BARRO; TRUEMAN; FROHLICH, 2005; NAVAS-CASTILLO et al., 2011; GISD, 2012).

Os begomovirus são transmitidos de forma persistente, circulativa e geralmente não propagativa pelo vetor. As ninfas podem adquirir o vírus durante a alimentação e este pode permanecer no inseto após as ecdises até o estágio adulto, sendo as fêmeas consideradas mais eficientes em transmitir vírus do que os machos. Há alguns casos excepcionais. Ghanim e Czosnek (2000) relataram que fêmeas virulíferas de *B. tabaci* biótipo B foram capazes de transmitir o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) para machos não virulíferos durante a cópula, sendo a

transmissão inversa também verdadeira. Este vírus aparentemente pode se replicar no vetor. Ghanim et al. (2007) observaram transmissão horizontal de begomovirus bipartidos entre indivíduos do biótipo B e também entre insetos do biótipo Q. Sinisterra et al. (2005) observaram a transcrição viral do TYLCV no vetor através de real-time PCR. Este estudo observou que em outras espécies virais os transcritos rapidamente não foram detectados e a concentração do vírus diminuía quando os insetos foram retirados da fonte de inóculo, no entanto, a concentração do TYLCV permaneceu constante e os transcritos deste puderam ser detectados e até mesmo aumentaram quando os insetos foram transferidos para plantas não hospedeiras do vírus, o que indica que este estaria se replicando no vetor. Também há relato de transmissão transovariana envolvendo o *Tomato yellow leaf curl Sardina virus* (TYLCSV), e a presença deste vírus no vetor afetar sua fecundidade ou longevidade (COSTA, 1976; HUNTER et al., 1998; HARRIS; SMITH; DUFFUS, 2001; MANSON et al., 2007; HOGENHOUT et al., 2008).

Hunter et al. (1998) propuseram um modelo para a transmissão de begomovirus onde os vírus são adquiridos durante a alimentação do inseto no floema da planta infectada. Assim como o alimento, os vírus são concentrados na câmara filtro, e levados ao mesenteron de onde passam para a hemolinfa do inseto, e assim circulam pelo corpo deste. As partículas atravessam a membrana da glândula salivar acessória, e após passarem por pequenos dutos nesta estrutura, são liberadas com a secreção salivar na próxima alimentação do aleyrodídeo. Trabalhos posteriores confirmaram este modelo. Caciagli et al. (2009) observaram através de microscopia eletrônica com imunomarcagem e detecções por PCR que a estabilidade e integridade da partícula viral é crucial para a circulação no vetor, confirmando que a via circulativa é realizada com o virion intacto, como já fora sugerido por outros autores (MEDINA et al., 2006). Liu et al. (1997) demonstraram a necessidade dos dois componentes genômicos para transmissão do *African cassava mosaic virus* – Kenya (ACMV-K) pelo vetor, avaliando pseudorecombinantes entre um isolado transmissível e outro não por *B. tabaci*. Estes pseudorecombinantes não foram transmitidos, sugerindo que diferenças em ambos os genomas contribuem para a ausência de transmissão do ACMV-K. Höfer et al. (1997) inseriram o gene da proteína capsidial de um begomovirus comumente transmitido pelo vetor no genoma do *Abutilon mosaic virus* (AbMV), begomovirus não transmitido pelo inseto. Os autores observaram que o mutante passava então a ser transmitido por *B. tabaci*,

concluindo que a capa protéica tem papel essencial na capacidade de transmissão pelo vetor. As proteínas da capa protéica também são o mais importante fator de especificidade entre o vírus e seu vetor, talvez por isto tenham menor variabilidade de sequência do que outras proteínas virais. Ohnishi et al. (2009) observaram através de microscopia eletrônica que na espécie não vetora de begomovirus, *T. vaporariorum*, as partículas estavam aderidas ao epitélio do mesenteron, não sendo observadas na hemolinfa do inseto. Estes resultados indicaram que o vírus pode se ligar de forma estável e firme no epitélio e que este seria a barreira para a não transmissão de begomovirus por esta espécie. Os autores sugeriram que esta interação deve ser mediada por receptores celulares e que seja estável contra degradação de proteínas do trato digestivo. Os vírus apresentam acumulação abundante em células epiteliais e de forma compartimentalizada no citoplasma, o que poderia gerar um abastecimento contínuo do vírus para a circulação e assim a persistência no vetor.

A transmissão também está associada à presença de uma proteína produzida por bactérias endossimbiontes dos aleyrodídeos, especialmente dos gêneros *Wolbachia*, *Hamiltonella* e *Cardinium*. Esta proteína é semelhante à proteína GroEL produzida por *Buchnera* sp., um endossimbionte de afídeos que auxilia na transmissão de vírus transmitidos por estes insetos, o que demonstra que vírus de classes muito diferentes usam de estratégias parecidas para evitar a degradação na hemolinfa. Alguns autores sugerem que a proteína se complexa as partículas virais na hemolinfa, protegendo-as da rápida proteólise que ocorreria no interior do inseto, caso este complexo não fosse formado (MORIN et al., 2000; HOUGENHOUT et al., 2008). Morin et al. (2000) observaram uma redução de 80% na transmissão do TYLVC-Is quando os aleyrodídeos foram alimentados com antissoro anti- GroEL, sugerindo que a interação com esta proteína seja também crucial para o vírus.

A transmissão de um begomovirus por aleyrodídeos pode ser determinada pela capacidade do vírus em se ligar a possíveis receptores no inseto e assim cruzar a barreira da câmara-filtro (ou região anterior do mesenteron) e atingir a hemolinfa do inseto. Medina et al. (2006) observaram através de microscopia eletrônica com imunomarcagem que o isolado não transmissível por *B. tabaci* do ACMV podia ser encontrado apenas na câmara filtro do inseto, indicando que o mesenteron seria a barreira para este isolado. Os autores sugeriram que as partículas tenham sido degradadas pelas enzimas do mesenteron, uma vez que a marcação estava

dispersa e não agregada. A aquisição e a retenção de vírus no aleyrodídeo aparentemente não são processos específicos para cada isolado ou espécie de vírus, uma vez que podem ocorrer mesmo que o inseto não seja capaz de transmitir o begomovirus, como *T. vaporariorum*, por exemplo. Há relatos na literatura de vírus e recombinantes artificiais que não são transmitidos por aleyroidídeos, no entanto estes são retidos no inseto por alguns dias, o que indica que as partículas são estáveis no proctodeu, mesmo não havendo neste estágio reação com a proteína análoga a GroEL (WU et al., 1996; HÖFER et al., 1997; ROSELL et al., 1999; MORIN et al., 2000).

O período necessário para aquisição, latência e inoculação de begomovirus varia entre as espécies, o que pode ser uma adaptação dos isolados para a transmissão por diferentes biótipos ou mesmo devido as condições experimentais (PICCÓ; DIEZ; NUEZ, 1996). Maruthi et al. (2002) estudaram a transmissão de isolados de ACMV que infectam mandioca em diversas regiões. Foram testadas as transmissões pelo vetor encontrado na mesma região do isolado e os encontrados em outros locais. Foi observado que quando transmitidos por insetos de outras regiões, estes vírus sofreram redução na eficiência de transmissão. Isto indica que há uma co-adaptação entre os isolados virais e o vetor. Brown e Bird (1992) citam que para eficiente transmissão de geminivirus é necessário um período de acesso a aquisição (PAA) de 2 a 24 horas, um período de acesso a inoculação (PAI) de 2 a 3 dias, podendo haver um período de latência de 4 a 10 horas. Cohen et al. (1983) observaram 100% de plantas infectadas pelo *Squash leaf curl virus* (SqLCV) quando os insetos foram deixados durante 6 horas para aquisição do vírus, sendo o período mínimo necessário para aquisição de 30 minutos. Santos, Ávila e Resende (2003) observaram um período de aquisição mínimo para transmissão do *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) próximo a 5 minutos e o período de acesso a transmissão de 15 minutos, sendo que o aumento destes períodos em casa de vegetação aumentou a eficiência de transmissão do vírus. Firmino et al. (2009) observaram um período de aquisição mínimo de 30 minutos, um período de acesso a inoculação mínimo de 10 minutos e um período de latência de 16 horas para o *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV), sendo que o inseto foi capaz de transmitir o vírus até 20 dias após a aquisição. Mansour e Al-Musa (1992) obtiveram um período mínimo de aquisição e inoculação de 30 minutos para o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), havendo um período de latência de 20 horas. Estes valores são relativos a um isolado obtido da

Jordânia, que segundo os autores, diferem dos resultados obtidos para outros isolados do mesmo begomovirus, como os isolados obtidos na Arábia Saudita, Israel e Tunísia.

Apesar de a *B. tabaci* biótipo B ser um inseto polífago, dificilmente é encontrada em cultivos comerciais de maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). No entanto, Nunes et al. (2008) observaram a colonização (ovos, ninfas e adultos) de *B. tabaci* biótipo B em espécies de *Passiflora* em casa-de-vegetação. Estes autores constataram que houve maior preferência para colonização e ovoposição em *P. amethystina*, seguida em menor quantidade de ninfas e ovos por folhas as espécies *P. morifolia*, *P. cincinnata*, *P. caerulea* e *P. foetida*, havendo pouquíssima ou ausência de colonização em *P. coriacea*, *P. suberosa*, *P. alata* e *P. edulis* f. *flavicarpa*. Na Bahia, Novaes et al. (2002) constataram a colonização de plantas de maracujazeiro com *B. tabaci*, cujo biótipo não foi identificado.

2.4 Material e Métodos

Origem e manutenção dos isolados virais

Isolados de begomovirus encontrados em pomares de maracujazeiros nos municípios de Paragominas (PA), Patos de Minas (MG), Araguari (MG) e São Fidelis (RJ) foram mantidos em plantas de *P. edulis* f. *flavicarpa* (maracujá amarelo) em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia e Nematologia (ESALQ/USP). Com a finalidade de manter fonte de inóculo de boa qualidade, os isolados foram frequentemente transmitidos por enxertia para novas plantas de maracujá-amarelo.

A forma fraca do isolado de São Fidelis (RJ) obtida por Alves (2008) em Piracicaba (SP) foi mantida em plantas de *N. benthamiana* através de inoculações mecânicas em casa de vegetação do mesmo departamento.

Isolados do *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) e do *Tomato severe rugose virus* (ToRSV) foram mantidos em plantas de tomateiro, da mesma forma que os begomovirus de maracujazeiro. Esses begomovirus foram usados como controles em testes de transmissão pelo vetor.

Extração de DNA total

Para a extração do DNA total de plantas foi usado o protocolo desenvolvido por Zhang et al. (1998) com algumas alterações. Amostras de folhas das plantas-teste, do controle positivo (planta infectada com begomovirus) e do controle negativo (planta sadia) foram maceradas em nitrogênio líquido e adicionados 800 µl de tampão CTAB (CTAB 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, Tris 100 mM, pH 8,0 e 0,2% de mercaptoethanol) aquecido a 65°C. As amostras foram agitadas em vortex e mantidas em banho-maria a 65°C durante 30 minutos, agitando-as a cada dez minutos. A seguir, foi adicionado um volume de CIA 24:1 (clorofórmio: álcool isoamilico), agitando vigorosamente e centrifugado por dez minutos a 10.000 g. O sobrenadante foi então transferido para um novo tubo e adicionado um volume de isopropanol e 0,25 do volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,5. A seguir as amostras foram colocadas em freezer por no mínimo uma hora e em seguida centrifugadas a 8.000 g por 10 minutos. O precipitado foi lavado por duas vezes com 500 µl de etanol 70%, centrifugando por um minuto a 8.000 g após cada lavagem. O precipitado foi seco a temperatura ambiente e dissolvido em 20 µl de água deionizada (Milli Q).

Para averiguar a presença do vírus no corpo do inseto, foi feita extração total de DNA dos aleyrodídeos após o período de aquisição do vírus segundo Idris et al. (2001) com algumas modificações. Um número mínimo de dez insetos por tratamento foi congelado em tampão de lise (5mM Tris-HCl, pH 8, 0,05 mM EDTA), na proporção de aproximadamente 60 µl/ inseto. Após foi adicionado 0,5% de Triton X-100 e 1 mg/ml de Proteinase K. As amostras foram maceradas com pistilo plástico e incubadas a 65°C durante 20 minutos. Em seguida, elas foram centrifugadas a 9000 g por 30 segundos e então recolhido o sobrenadante para novos tubos "eppendorf". A este sobrenadante foi adicionado o mesmo volume de isopropanol e 0,25 do volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,5. A seguir as amostras foram colocadas em freezer por uma hora e em seguida centrifugadas a 8.000 g por 10 minutos. O precipitado foi lavado por duas vezes com 200 µl de etanol 70%, centrifugando por um minuto a 8.000 g após cada lavagem. O precipitado foi seco a temperatura ambiente e dissolvido em 20 µl de água deionizada (Milli Q). As reações de PCR ou RCA foram feitas imediatamente após a extração. Como

controle foram usados alelodídeos que se alimentaram em plantas saudáveis e plantas infectadas com outro membro do gênero begomovirus, ToYVSV ou ToRSV.

Amplificação de DNA de begomovirus por círculo rolante (RCA)

Genomas de DNA circular, como os begomovirus, podem ser amplificados por meio da reação de círculo rolante (RCA) através da polimerase do bacteriófago $\Phi 29$ (INOUE-NAGATA et al., 2004).

DNA total extraído de plantas infectadas ou de alelodídeos que se alimentaram em plantas infectadas com o begomovirus foi submetido a reação de RCA. Esta reação foi realizada com o Kit Templi Phi (GE Healthcare) da seguinte forma: a 5 μ l do tampão da amostra foi adicionado 1 μ l de DNA total extraído da planta ou do inseto. Em seguida foi realizada a desnaturação do DNA a 95°C durante 3 minutos. Imediatamente as amostras foram transferidas para o gelo. Em seguida, foram adicionados 5 μ l de tampão de reação e 0,2 μ l da enzima (polimerase do bacteriófago $\Phi 29$). A reação foi incubada a 30°C durante pelo menos 18 hs. Ao final da reação a enzima foi desativada aquecendo-se as amostras a 65°C durante 10 minutos. A confirmação da RCA foi realizada, quando pertinente, por PCR e observação em gel de agarose por eletroforese.

Deteção de DNA de begomovirus por PCR

Para a reação de PCR foram utilizados dois μ l de DNA total extraído de plantas ou produto da RCA, para a amplificação como descrito por Wyatt e Brown (1996). Foram adicionados 0,062 u/ μ l da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1,25x do tampão desta enzima, 5 mM de cloreto de magnésio ($MgCl^{+2}$) e 1 nM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs). Foram usados separadamente oligonucleotídeos iniciadores que amplificam parte do DNA-A que contém o gene da proteína capsidial (AV496 /Ac1978) e do DNA-B (PCRC1/PBL1v 2040). Em termociclador, as amostras foram aquecidas a 94°C por 2 minutos e após passaram por 30 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu em 1 min. a 94°C, 1 min. a 55°C e 2 min. a 72°C, sendo completado por 10 min. a 72°C.

Como controle da extração de DNA de *B. tabaci* foi incluída uma PCR para detecção de parte do gene citocromo oxidase 1 do DNA da mitocôndria (mtCO1),

usando o par de oligonucleotídeos iniciadores C1-J-2195F e L2-N-3014R (FROHLICH et al., 1999). Em termociclador as amostras foram aquecidas a 95°C por 2 minutos e após passaram por 30 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu em 1 min. a 95°C, 1 min. a 52°C e 1 min. a 72°C, sendo completado por 5 min. a 72°C. Os produtos destas reações foram identificados juntamente com marcador de 1Kb (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) em gel de agarose 1%, corado com Syber safe (1:10000, Invitrogen).

Sequenciamento do DNA-A viral

Diretamente do produto da RCA

Produtos da reação de RCA do DNA-A dos diferentes isolados de begomovirus de maracujazeiro foram quantificados em gel de agarose através do marcador molecular (50 ng/µl), diluídos a 10 ng/µl em água deionizada e enviados para o sequenciamento de nucleotídeos na empresa Macrogen (Seoul, Korea do Sul). Para o sequenciamento foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores universais do DNA-A de begomovirus Par1v 496 /Ac1978, quando o objetivo foi apenas a detecção do vírus. As sequências de nucleotídeos geradas foram primeiramente avaliadas quanto à qualidade pelo programa Electropherogram Quality Analysis da Embrapa (<http://bioinformatica.cenargen.embrapa.br/phph/>) e aqueles fragmentos que apresentaram qualidade satisfatória foram então comparados a outras sequências já depositadas no GeneBank usando os programas Blast (<HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ou Clustal X 1.8 (THOMPSON et al., 1997), disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>.

Para a obtenção da sequência completa de nucleotídeos do genoma dos diferentes isolados e da forma atenuada do vírus, produtos de RCA foram sequenciados conforme descrito acima. Cada fragmento obtido foi então utilizado como molde para o desenho e um novo par de oligonucleotídeos iniciadores (tabela 1), que permitiu o sequenciamento de um novo fragmento, e assim sucessivamente até o sequenciamento completo do genoma. Desta forma, a justaposição destes fragmentos com o auxílio dos programas Clustal X 1.8, Blast ou Staden 4.0 (STADEN, 1996) permitiu a obtenção da sequência completa do DNA do isolado do vírus.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos iniciadores usados para amplificação do DNA-A do genoma de begomovirus encontrados em maracujazeiro

Isolado	Nome	Sequência
Paragominas (PA)	PLLMV-540F	5' –CCACCGTGTAGGTAA-3'
	PLLMV-1099F	5' –CGTAATAACGCCTAAC-3'
	PLLMV-715F	5' GATTTCTGCAGTTDATRTTYTCRTCCATCCA 3'
	PLLMV-2131F	5' – GCAGCAGCGTCATTA-3'
	PLLMV-314F	5' GAT GGC GGG AAC CTC AAA 3'
	PLLMV-2285F	5'- AGG TCA GCA CAT TTC CAT CC -3'
Araguari (MG)	PLLMV-1622F	5'- CACGATTGATGGGATC -3'
	PLLMV-1816F	5' CCA GAT GGC CAC TGA AGT AA 3'
	PLLMV-540F	5' –CCACCGTGTAGGTAA-3'
	PLLMV-314F	5' GAT GGC GGG AAC CTC AAA 3'
	PLLMV-715f	5' GATTTCTGCAGTTDATRTTYTCRTCCATCCA 3'
Patos de Minas (MG)	PLLMV-540F	5' –CCACCGTGTAGGTAA-3'
	PLLMV-1099F	5' –CGTAATAACGCCTAAC-3'
	PLLMV-1622F	5' – CACGATTGATGGGATC-3'
	PLLMV-2131F	5' – GCAGCAGCGTCATTA-3'
	PLLMV-732 R	5'- CGT TCT TCA CGG TTG CAG -3'
	PLLMV-2547	5' GTAAATAAGGCTGTGTACCCCC 3'
Forma atenuada Piracicaba (SP)	AT314	5' GAT GGC GGG AAC CTC AAA 3'
	AT442R	5' CCCTTCACAGCCTCTAGGAA 3'
	AT788F	5' GCACAAGTTCTACGCCAAG 3'
	AT1394F	5' GAATTCCCCGGTGCCTGA AT 3'
	1978F	5' GCATCTGCAGGCCACATYGTCTTYCCNGT 3'

Através de clonagem

A clonagem foi utilizada para o sequenciamento completo do DNA-A do isolado de Araguari e de São Fidelis. Para o preparo do inserto, o produto da RCA foi inicialmente clivado com algumas enzimas de restrição a fim de encontrar uma ou mais enzimas que o linearizassem, ou seja, clivassem o genoma viral em um único ponto. Escolhida a enzima *Pst*I, o produto de RCA foi digerido da seguinte forma: para uma reação de 20 µl foram adicionados 4 µl de produto da RCA, 1 µl da enzima *Pst*I, 2 µl de tampão da enzima, 1 µl de BSA (albumina de soro bovino) e o restante de água deionizada. Esta mistura foi incubada a 37° C por pelo menos 2 horas e então aplicada em gel de agarose 1% para a visualização e posterior purificação, através do Gel band Purification kit (GE HealthCare).

O vetor pBluescript SK+ (GE HealthCare) foi utilizado para clonar o genoma viral. Inicialmente o plasmídeo foi clivado com a enzima *Pst*I, eluido e quantificado.

Posteriormente foi realizada a desfosforilação com a enzima fosfatase alcalina (CIAP, Promega), da seguinte forma: 100 µl do vetor, 30 µl do tampão da enzima, 7,5 µl de fosfatase alcalina e 162,5 µl de água deionizada foram incubados por 30 minutos a 37°C. Em seguida o vetor foi precipitado em 10% de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 2,5 volume de isopropanol a -20°C durante a noite. O sobrenadante foi descartado e adicionado ao precipitado 100 µl de água deionizada e repetida a incubação com fosfatase alcalina e precipitação. Ao final o plasmídeo foi ressuspensionado em 50 µl de água deionizada.

O produto da RCA linearizado foi submetido a reação de ligação com o plasmídeo utilizando a enzima T4 ligase (Promega) na proporção de 3:1 (unidades do inserto: vetor) com o vetor, da seguinte forma: 1 µl de T4 ligase, 2 µl de tampão da enzima, 1 µl de vetor, 3 µl de inserto e 13 µl de água deionizada foram incubados a 14°C por 20 horas. Foi feita uma precipitação adicionando 30 µl de água deionizada e 500 µl de álcool butílico, misturando vigorosamente e após centrifugado a 12000 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente e descartado. A ligação foi resuspensionada em 4 µl de água deionizada. Como controles da desfosforilação do vetor e da posterior transformação foram feitas ligações sem o inserto, apenas com o vetor desfosforilado e íntegro.

Células competentes de *Escherichia coli* XL1 foram transformadas com o plasmídeo contendo o genoma viral utilizando o método de choque térmico. Para a transformação cerca de 3 µl do produto da ligação foram adicionados a 100 µl de células bacterianas competentes, agitado manualmente e deixado em gelo durante 30 minutos. A seguir a mistura foi colocada a 42°C durante dois minutos e em seguida foi novamente inserida em gelo durante 3 minutos. Em seguida foi adicionado 1 ml de meio de cultura líquido LB, e a mistura deixada sob agitação por 1 hora a 37°C. Logo após as células bacterianas foram transferidas para meio LB sólido contendo 100 µg/ml de ampicilina, 80 µg/ml de X- Gal e IPTG (20 mM), e incubadas a 37°C por aproximadamente 12 horas. As colônias brancas (recombinantes) e os controles foram então transferidos para meio LB líquido com ampicilina (100mg/ml) e incubadas a 37°C durante 20 horas sob agitação (150 rpm). A clonagem foi confirmada por meio de extração dos plasmídios conforme Sambrook et al. (1989) ou pelo Quick plasmidium miniprep Kit (Invitrogen) e posterior clivagem enzimática.

O DNA plasmidial recombinante foi enviado para a empresa Macrogen para o sequenciamento de nucleotídeos do genoma viral. Para isso inicialmente foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores do vetor (T3 e T7). A partir das sequências obtidas foram desenhados oligonucleotídeos internos para completar o sequenciamento (tabela 2). As sequências obtidas foram editadas através do programa Staden 4.0 (STADEN, 1996) e comparadas a outras sequências usando o Clustal X1.8 ou Blast.

Tabela 2 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a obtenção da sequência de nucleotídeos completa do DNA-A do isolado de Araguari (MG)

Nome	Sequência (5'- 3')
T3	ATTAACCCTCACTAAAGGGA
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
SI480F	GTC CAG TCC TAC GAG CAG
SI1580R	CAT TGA GAG GCT GGA CAC

Colônia de *Bemisia tabaci* biótipo B

Colônias do aleyrodídeo *B. tabaci* biótipo B livres de vírus, iniciadas com adultos coletados em São Paulo pelo Dr. André L. Lourenção (IAC), foram mantidas sobre plantas sadias de couve (*Brassica oleraceae*), em gaiolas a prova de insetos, no Departamento de Fitopatologia e Nematologia (ESALQ/USP). Os insetos foram identificados pelas Dras Geni L. Villas Boas e Maria Esther de Noronha Fonseca (Embrapa Hortaliças) como *Bemisia tabaci* biótipo B.

Transmissão do vírus

Por *B. tabaci* biótipo B

Adultos de *B. tabaci* livres de vírus foram coletados com sugadores (figura 1A) e colocados para se alimentar sobre plantas-teste sistemicamente infectadas com o begomovírus. Os insetos foram confinados em folhas das plantas no interior de pequenas gaiolas confeccionadas com tecido do tipo “voil” (figura 1B). O período de acesso para a aquisição (PAA) do vírus foi de aproximadamente 24 h. Após a aquisição os aleyrodídeos foram retirados da fonte de inóculo e confinados em

plantas sadias das espécies a serem testadas. Foram confinados entre 10 a 15 insetos por planta. O período de acesso para inoculação (PAI) também foi de 24 h. Em seguida as plantas foram pulverizadas com inseticida para eliminar os insetos. As plantas foram mantidas em casa de vegetação para avaliação da infecção.

Figura 1 - Transmissão por aleyrodídeos. (A) sugador utilizado na coleta dos aleyrodídeos e (B) ilustração do confinamento de inseto em gaiola de tecido tipo “voil” para aquisição e transmissão do vírus

Como controle da eficiência da *B. tabaci* biótipo B na transmissão de begomovirus foi usado um isolado do ToYVSV mantido em tomateiro (*Solanum lycopersicum* = *Lycopersicon esculentum*). Esta transmissão foi feita de tomateiro para tomateiro usando o mesmo procedimento descrito acima.

Por biobalística

A transmissão do begomovirus para espécies não relacionadas ao maracujazeiro por biobalística foi realizada usando como inóculo o DNA amplificado por RCA. Para a realização da inoculação as partículas de tungstênio foram primeiramente preparadas conforme Passarin (2009), e o produto da RCA precipitado sobre estas partículas da seguinte forma: em um microtubo de 1,5 mL foram colocados 60 mg de micropartículas de tungstênio M10 de 1 µm (GTE Sylvia Chemicals/Metals) em água deionizada. Uma alíquota de 50 µl destas partículas foi agitada em sonicador, e em seguida adicionados 50 µl de CaCl_2 (2,5 M), 20 µl de espermidina (0,1 M) e 5 a 8 µl de produto de RCA na concentração de 1 µg/ µl. A mistura foi incubada á 4°C durante 30 mim sob agitação lenta. Após foi centrifugada a 10.000 g durante 1 segundo e em seguida descartado cuidadosamente o sobrenadante. A seguir foram feitas três lavagens consecutivas da seguinte forma: foram adicionados ao precipitado 200 µl de etanol gelado, agitado levemente e

centrifugando durante 1 segundo a 10.000 g. Após as lavagens toda a fase líquida foi retirada. Foram adicionados 30 µl de etanol absoluto gelado e o precipitado ressuspendido cuidadosamente. Em seguida foram distribuídas alíquotas de 5 µl desta suspensão no centro da membrana carreadora. Desta forma cada preparação permitiu a realização de seis disparos.

A inoculação foi realizada da seguinte forma: as membranas contendo as partículas de tungstênio com o DNA viral foram colocadas em um acelerador de partículas PDS-1000/He (BioIostic Particle Delivery System®) Bio –RAD™, sendo através deste projetadas na face inferior das folhas, com uma pressão de gás hélio de 1100 psi. Os disparos foram feitos sobre plantas jovens retiradas do substrato e acondicionadas em placa de Petri no interior do acelerador de partículas, como ilustra a figura 2. Todo o material utilizado para os disparos, como as membranas carreadoras, telas de retenção e ruptura foram previamente limpos em etanol 70% e secos em condições assépticas (fluxo laminar).

Figura 2 - Plantas sadias de *S. rhombifolia* a serem bombardeadas

As plantas bombardeadas foram novamente plantadas em solo em vasos de alumínio e mantidas em condições de laboratório durante uma semana ou até que estivessem adaptadas para serem transferidas para a casa de vegetação.

As plantas foram avaliadas quanto aos sintomas e a detecção da infecção foi feita por PCR.

Por inoculação mecânica

Para a obtenção do inóculo viral folhas de maracujazeiro ou *Nicotiana benthamiana* foram maceradas em almofariz de porcelana na presença de tampão fosfato de potássio 0,02 M (pH 7,0 acrescido de sulfito de sódio 0,02 M) gelado. As inoculações foram feitas nas folhas das plantas sadias polvilhadas com abrasivo

carbureto de silício, friccionando-as com pistilo umedecido na solução de inóculo. Em seguida as folhas foram lavadas com água para retirar excesso de abrasivo e de inóculo. As plantas foram mantidas em casa de vegetação para observações de sintomas e posteriormente análises para confirmação de infecção com o begomovirus.

Por enxertia de garfagem

Hastes de plantas de *Passiflora morifolia* infectadas com begomovirus foram cortadas em bisel com uma lâmina esterilizada. Estas foram inseridas em plantas de maracujazeiro onde previamente foi feita uma fenda também com lâmina esterilizada. As partes foram mantidas juntas por meio de presilhas plásticas apropriadas para essa prática horticultural em câmara úmida. Após o pegamento do enxerto as presilhas foram retiradas e as plantas mantidas em casa de vegetação.

Deteção do vírus no inseto

Para detectar a presença do vírus em partes ou no corpo de *B. tabaci* biótipo B, os insetos foram colocados para se alimentar em plantas infectadas com os diferentes isolados de begomovirus durante 24 h. Em seguida foram transferidos para folhas sadias de couve ou fumo para se alimentarem durante 24 h. Esta alimentação teve como objetivo propiciar a eliminação de partículas que eventualmente poderiam estar presentes no estilete ou ainda no trato digestivo. Como controles foram usados insetos sadios e outros que adquiriram o ToYVSV ou o ToRSV em folhas de tomateiro infectados.

No caso da detecção do vírus em partes do corpo do inseto, foram usados somente os aleyrodídeos virulíferos para o isolado de São Fidelis e não virulíferos (controle). Os insetos foram colocados primeiramente em acetona para se manterem em estado relaxado durante o posterior congelamento. Depois disso foram transferidos para tampão fosfato salino (PBS: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄.2H₂O 9,1 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4) e armazenados a -20°C até o momento dos cortes. Grupos de cinco insetos de cada tratamento foram descongelados, imersos em tampão PBS e feito um corte na região do protorax anterior ao primeiro par de pernas sob um microscópio estereoscópico (lupa). Assim

foram separadas as cabeças e a região do protórax do restante do corpo. Em alguns grupos também foram separadas as asas e pernas. DNAs totais foram extraídos das diferentes partes do corpo dos insetos segundo Idris et al. (2001).

Os DNAs totais extraídos foram amplificados por RCA e em seguida amplificados por PCR para detecção do vírus.

Teste de proteção

Hastes de plantas de *Passiflora morifolia* infectadas com a forma atenuada do vírus foram enxertadas em plantas sadias de *P. edulis* f. *flavicarpa*. Trinta dias após a enxertia foi confirmada a infecção por begomovirus através de PCR e inoculação mecânica do extrato foliar destas plantas em plantas sadias de *N. benthamiana* e observada a presença de sintomas nestas plantas. Foi realizada então a inoculação de desafio, onde as cinco plantas infectadas pela forma fraca foram enxertadas com hastes de maracujazeiros infectados pela forma severa do vírus. Como forma severa do vírus foi utilizado o isolado encontrado em São Fidelis (RJ). Como controles foram mantidas plantas de maracujazeiro infectadas apenas com a forma fraca, plantas sadias enxertadas com a forma severa do vírus e plantas sadias.

As avaliações foram feitas com base nos sintomas, recuperação biológica por inoculação de plantas sadias de *N. benthamiana* e RFLP. Para o teste de recuperação biológica plantas sadias de *N. benthamiana* foram inoculadas com extratos de folhas dos ponteiros das plantas desafiadas.

RFLP

Para obter os diferentes padrões de restrição da forma fraca e severa do begomovirus, DNA total extraído de plantas infectadas foram submetidos a reação de círculo rolante (RCA). Em seguida os produtos da amplificação foram clivados com as enzimas de restrição *Bam*HI, *Xba*I, *Hind*III, *Pst*I, *Eco*RI e *Cl*I, da seguinte maneira: para uma reação de 20 µl, foram adicionados 4 µl de produto da RCA, 1 µl da enzima de restrição, 2 µl de tampão da enzima, 1 µl de BSA (soro albumina bovina) e o restante de água deionizada. Esta mistura foi incubada a 37° C por pelo menos 2 horas e em seguida aplicada em gel de agarose 1% para visualização. Foi então escolhida a enzima *Eco*RI que clivou diferentemente estes dois isolados (Figura 3).

Figura 3 – Polimorfismo de comprimento de fragmentos de produtos de RCA da forma atenuada (A) e severa (S), usando as seguintes enzimas de restrição: **1** *Bam*HI; **2** *Xba*I; **3** *Hind*III; **4** *Pst*I; **5** *Eco*RI e **6** *Cl*aI

2.5 Resultados e discussão

2.5.1 Caracterização molecular dos isolados

O DNA-A dos isolados de begomovirus encontrados em maracujazeiros nos municípios de Patos de Minas (MG) e Paragominas (PA) foram sequenciados a partir do produto da amplificação por círculo rolante (RCA), enquanto o DNA-A do isolado de São Fidelis (RJ), foi sequenciado através de clonagem. O DNA-A do isolado de Araguari (MG) foi sequenciado por ambos os processos. As sequências completas de nucleotídeos do DNA-A desses isolados estão no anexo A.

Na tabela 4 estão as porcentagens de identidades das sequências de nucleotídeos do DNA-A e dos aminoácidos presumidos do gene que codifica a proteína capsidial entre os isolados desse estudo, bem como quando comparadas com as sequências correspondentes de outros begomovirus depositados no GeneBank.

Tabela 4 - Porcentagem de identidades das sequências de nucleotídeos (nt) do DNA-A e aminoácidos (aa) presumidos da proteína capsidial entre os isolados estudados e outros begomovirus

Isolados/ espécies*	Araguari (MG)		Atenuado (SP)		Paragominas (PA)		Patos de Minas (MG)		São Fidelis (RJ)	
	Nt	aa	Nt	aa	nt	Aa	Nt	aa	Nt	Aa
Araguari (MG)	-	-	89	99	81	96	82	95	82	96
Atenuado (SP)	89	99	-	-	91	98	89	95	90	98
Paragominas (PA)	81	96	91	98	-	-	94	94	97	99
Patos Minas (MG)	82	95	89	95	94	94	-	-	94	95
São Fidelis (RJ)	82	96	90	98	97	99	94	95	-	-
AbMV	79	93	78	99	79	92	79	91	79	92
EACMV-K	63	69	64	81	64	66	63	66	64	66
PSLDV	81	86	72	94	72	87	71	84	72	87
PLLMV**	87	97	88	86	88	97	85	95	88	97
SimMV	95	97	89	100	82	96	82	95	82	97
SiMoV	80	96	87	97	90	97	88	94	90	97
SiYMV	79	96	79	91	79	90	79	88	80	91
ToSRV	76	89	77	97	76	91	75	90	76	92
ToYVSV	74	90	75	95	76	91	74	88	75	91

* AbMV = *Abutilon mosaic virus* (NC016574); EACMV-K = *East African cassava mosaic virus Kenya* (NC011583.1); PLLMV = *Passionflower little leaf mosaic virus* (AY167566.1); PSLDV = *Passionfruit severe leaf distortion* (NC012786.1); SimMV = *Sida micrantha mosaic virus* (FJ686693.1); SiMoV = *Sida mottle virus* (AY090555.1); SiYMV = *Sida yellow mosaic virus* (AY090558); ToSRV = *Tomato severe rugose virus* (JF803263.1); ToYVSV = *Tomato yellow vein streak virus* (NC010949)

** sequência parcial do gene da proteína capsidial (CP)

As sequências de nucleotídios do DNA-A dos isolados de begomovirus de maracujazeiro de Paragominas, Patos de Minas e São Fidelis apresentaram 94 a 97% de identidade entre si e 88 a 90% de identidade com a sequência do DNA-A do *Sida mottle virus* (GenBank access AY090555.1). Já a sequência de nucleotídeos do DNA-A do isolado de Araguari apresentou identidades de 81 a 82% com o DNA-A dos demais isolados brasileiros de begomovirus obtidos de maracujazeiro. No entanto, a identidade do DNA-A desse isolado com o DNA correspondente do *Sida micrantha mosaic virus* (FJ686693.1) foi de 95%.

O genoma do componente A da forma atenuada obtida por Alves (2008) também foi totalmente sequenciado a partir do produto da RCA e apresentou 90% de identidade com a sequência de nucleotídeos do DNA-A do isolado de São Fidelis (RJ), do qual originou-se; 87% e 89% de identidade com o SiMoV e SimMV, respectivamente.

Fauquet et al. (2008) sugerem que isolados com identidades inferiores a 89% sejam espécies distintas e que dentro de uma mesma espécie (identidade igual ou superior a 89%) podem haver estirpes (identidade inferior a 93%) e variantes. Por estes critérios os isolados de begomovirus encontrados em maracujazeiros em Paragominas e São Fidelis podem ser considerados estirpes do SiMoV, podendo ser

denominados SiMoV estirpe passiflora (SiMoV-P). Da mesma forma, o isolado de begomovirus de maracujazeiro de Araguari pode ser considerado uma estirpe do SimMV, sendo chamado então SimMV-P. No caso do isolado de Patos de Minas, cuja identidade da sequência de nucleotídeos com o SiMoV foi de 88%, é necessária a análise de outros parâmetros para melhor identifica-lo.

A sequência do DNA-A da forma atenuada confirmou a proximidade ao isolado de São Fidelis (90% de identidade), no entanto apresentou valores de identidade de nucleotídeos próximos ao limiar de espécie em relação ao isolado de Paragominas (91%) e também ao SimMV (89%).

Além das sequências de nucleotídeos, o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) também sugere analisar outros critérios, em especial quando são encontrados valores próximos ao limiar de 89% de similaridade nas sequências de nucleotídeos, como os obtidos para o isolado de Patos de Minas e da forma atenuada do begomovirus, por exemplo. Alguns destes critérios são a gama de hospedeiros, os sintomas causados nestes, possibilidade de pseudo recombinantes viáveis, possibilidade de trans- replicação entre os componentes genômicos e características da proteína capsidial como relações sorológicas e identidade dos aminoácidos. Sendo considerada uma nova espécie quando este último critério é inferior a 90% (KING et al., 2012). A proteção entre os vírus também pode ser um indicador de proximidade, uma vez que esta pode ser parcial ou mesmo não ocorrer quando os vírus não são relacionados (HULL, 2005). Com o intuito de melhor caracterizar o isolado fraco foi realizado teste de proteção contra isolado severo do vírus.

2.5.2 Transmissão dos isolados

Por biobalística e inoculação mecânica

Resultados de transmissão do isolado de begomovirus de maracujazeiro de São Fidelis e da forma atenuada (mantida em plantas de *N. benthamiana*) para três espécies vegetais por meio do bombardeamento das plantas com produto de RCA estão na Tabela 5.

Tabela 5 - Transmissão do SiMoV-P(isolado de São Fidelis) e da forma atenuada para plantas sadias através de biobalística

Espécie testada	N° de plantas infectadas/ n° de plantas inoculadas	
	São Fidelis	Atenuado
<i>S. rhombifolia</i>	2/13	NR
<i>P. morifolia</i>	1/6	3/5
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	0/3	0/10

NR = teste não realizado

Duas plantas de *S. rhombifolia* e uma planta de *P. morifolia* exibiram sintomas quando bombardeadas com produto de RCA do isolado de São Fidelis (figura 4) e a infecção foi confirmada através de PCR. A infecção de plantas de *S. rhombifolia* pelo isolado de São Fidelis reforça a hipótese de que este seja, na verdade, um isolado de SiMoV que se adaptou ao maracujazeiro, como demonstrou a comparação de sequências de nucleotídeos do DNA-A. O vírus não foi transmitido para *P. edulis* f. *flavicarpa*.

Figura 4 - Sintomas em plantas jovens inoculadas com o isolado de São Fidelis através de biobalística, sendo (A) *Sida rhombifolia* e (B) *Passiflora morifolia*

Plantas de maracujá-amarelo bombardeadas com produto da RCA da forma atenuada do begomovirus obtida por Alves (2008) não apresentaram sintomas, mesmo após poda e desenvolvimento das novas brotações. No entanto, foi possível detectar o begomovirus através de PCR em seis destas plantas. Três plantas de *P. morifolia* apresentaram sintomas de mosaico leve, em comparação ao sintoma causado pela forma severa do vírus (figura 5). A infecção nestas plantas foi confirmada através de PCR detectando os componentes A e B. Produtos do PCR de plantas de *P. morifolia* tiveram o ácido nucleico sequenciado parcialmente, os quais apresentaram 90% de identidade com a sequência de nucleotídeos correspondente do isolado de São Fidelis. Estas plantas foram mantidas em gaiolas a prova de insetos para serem fontes de inóculo para futuro teste de proteção.

Figura 5 - Plantas de *P. morifolia* infectadas com a forma atenuada (A) e normal (B) do SiMoV – P

Os geminivirus geralmente são limitados a células próximas ao floema, o que impossibilita a sua transmissão mecânica. Alguns begomovirus bipartidos, no entanto, são capazes de infectar também outros tecidos, sendo experimentalmente transmitidos de forma mecânica (AKHTAR; BRIDDON; MANSOOR, 2011). Alves (2008) obteve transmissão mecânica do isolado encontrado em São Fidelis (RJ) para plantas sadias de *Nicotiana benthamiana*, espécie comumente utilizada em estudos de fitovirose. Assim foi tentada a transmissão mecânica dos isolados encontrados em maracujazeiros para plantas sadias de *N. benthamiana*, cujos resultados estão na tabela 6.

Tabela 6 – Transmissão de isolados de begomovirus de maracujazeiro para plantas sadias de *N. benthamiana* através de inoculação mecânica

Isolados	Nº de plantas infectadas/ nº de plantas inoculadas
Araguari (MG)	6/7
Paragominas (PA)	5/8
Patos de Minas (MG)	5/7
São Fidelis (RJ)	6/6

Estas plantas exibiram sintomas de mosaico, com pequenas diferenças entre os isolados (figura 6). As infecções dessas plantas foram confirmadas por PCR.

Figura 6 - Plantas de *N. benthamiana* inoculadas com extrato foliar de plantas infectadas de maracujazeiros pelos isolados de (A) São Fidelis, (B) Araguari, (C) Patos de Minas e (D) Paragominas

Por *B. tabaci* biótipo B

Resultados de testes de transmissão dos diferentes isolados de begomovirus de maracujazeiro por meio de *B. tabaci* biótipo B, usando como fontes de inóculo plantas infectadas de *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. morifolia* estão na tabela 7. Nenhuma das plantas de *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. morifolia* e *S. rhombifolia* exibiu sintomas. A ausência de infecção foi confirmada em todas as plantas por PCR. Por outro lado, o isolado do ToYVSV usado como controle da transmissão por *B. tabaci* biótipo B foi eficientemente transmitido de tomateiro para tomateiro em todos os testes de transmissão (total de 12 plantas infectadas/ 12 plantas inoculadas). Alves e Rezende (2009) já haviam relatado a ausência de transmissão do isolado de begomovirus de maracujazeiro de São Fidelis, por meio desse aleyrodídeo, para plantas de maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), tomateiro silvestre (*S. pimpinelifolium*) e fumo (*N. benthamiana*). Acrescenta-se ainda que insetos mantidos em *S. pimpinelifolium* infectadas com esse begomovirus, por 40 dias, não transmitiram o vírus para plantas sadias da mesma espécie.

Com o objetivo de evitar um possível efeito de preferência alimentar do inseto na transmissão foram realizadas transmissões por insetos alimentados em *P. morifolia* infectadas, espécie identificada como preferida para colonização e ovoposição de *B. tabaci* em comparação ao maracujá azedo (NUNES et al., 2008). A utilização de plantas infectadas de *P. morifolia* como fonte de inóculo e teste, no entanto não teve efeito na eficiência de transmissão.

Tabela 7 - Tentativas de transmissão de quatro isolados de begomovirus mantidos em passifloras para plantas sadias de três espécies vegetais por *B. tabaci* biótipo B

Planta fonte de inóculo	Planta-teste	Nº plantas infectadas/nº total de plantas inoculadas			
		Araguari	Paragominas	Patos de Minas	São Fidelis
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	0/10	0/10	0/15	0/10
<i>P. morifolia</i>	<i>P. morifolia</i>	0/21	0/20	0/24	0/20
<i>P. morifolia</i>	<i>S. rhombifolia</i>	NR	NR	NR	0/25

NR= teste não realizado

A ausência de transmissão de alguns begomovirus por *B. tabaci* não é um evento incomum, sendo relatada para algumas espécies como o *Abutilon mosaic virus* (AbMV), *Ipoema yellow vein virus* (IYVV), *Honeysuckle yellow vein mosaic virus* (HYMV) e para algumas estirpes, como a do *African cassava mosaic virus* originária do Kenya (ACMV-K). Esta ausência de transmissão pode estar associada a espécie vegetal fonte de inóculo, prolongada propagação vegetativa da espécie hospedeira do vírus na ausência do vetor, sucessivas transmissões mecânicas do vírus (para os que são transmitidos dessa maneira), defeitos nos componentes genômicos, entre outros (COSTA, 1955; BEDFORD et al., 1994; WU et al., 1996; LIU et al., 1997; HÖFER et al., 1997; MORIN et al., 2000).

A primeira hipótese levantada no presente trabalho para explicar a ausência total de transmissão foi a de que o inseto não estaria adquirindo o vírus. Para verificar esta hipótese procurou-se detectar o vírus no corpo de insetos que se alimentaram em plantas infectadas. Foram analisados 40 insetos por isolado, sendo detectado também DNA mitocondrial dos insetos por PCR após as extrações. Foi possível detectar o vírus nos alelodídeos alimentados em plantas infectadas com cada um dos quatro isolados, bem como o controle positivo, ToYVSV, em todos os testes realizados (Figura 7). Alguns dos fragmentos amplificados foram sequenciados, confirmando a detecção do ToYVSV e do isolado de São Fidelis.

Assim estes resultados comprovam que *B. tabaci* biótipo B foi capaz de adquirir estes isolados do begomovirus.

Figura 7 – Detecção do DNA viral por PCR em insetos que se alimentaram em tomateiro infectado com o ToYVSV (1) e plantas de maracujazeiro infectadas com os isolados de begomovirus de Paragominas-PA (2) Patos de Minas-MG (3), Araguary-MG (4) e São Fidelis - RJ (5), sendo M, marcador molecular 1Kb e (6) insetos alimentados em plantas sadias

Estes resultados corroboram outros relatos onde espécies de begomovirus são adquiridas pelo inseto e, no entanto, não são transmitidas por ele. Wu et al. (1996) detectaram através de PCR o *Abutilon mosaic virus* (AbMV) em adultos de *B. tabaci* biótipo B que não foram capazes de transmitir este vírus para plantas ornamentais. Também foi observado que estes insetos puderam reter o vírus por pelo menos sete dias após a aquisição. Ohnishi et al. (2009) observaram que mesmo uma espécie de aleyrodídeo não transmissora de begomovirus, *Trialeurodes vaporariorum*, foi capaz de adquirir o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). Neste estudo a acumulação viral no corpo do inseto foi semelhante nas espécies transmissora (*B. tabaci*) e não transmissora (*T. vaporariorum*) do vírus. Rosell, Torres-Jerez e Brown (1999) detectaram o *Squash leaf curl virus* (SCLV) em *T. vaporariorum* alimentados em plantas infectadas pelo begomovirus, bem como no vetor, *B. tabaci*. No entanto, o vírus não foi detectado em *T. vaporariorum* quando a saliva ou a hemolinfa dos insetos foram extraídas separadamente, indicando que na espécie não vetora o vírus não é capaz de circular no corpo do inseto, talvez por não transpor a barreira do mesentereon, e assim não atingiu a glândula salivar.

A não transmissão dos isolados de passiflora por *B. tabaci* biótipo B deveria então estar ligada a outras etapas da transmissão seguintes a aquisição, como o reconhecimento da capa protéica do vírus pelos receptores do vetor na passagem para a hemolinfa ou na glândula salivar. Medina et al. (2006) observaram que o isolado do *African cassava mosaic virus* não transmissível por *B. tabaci* pode ser encontrado através de microscopia eletrônica no aparelho digestivo do inseto apenas até a região da câmara filtro, diferentemente do isolado transmissível onde foi possível detectá-lo em todo o corpo do inseto, incluindo o interior da glândula

salivar. Isto indica que o epitélio do mesenteron seja a barreira de transmissão para este isolado. Ohnishi et al. (2009) demonstraram que a não transmissão de uma espécie de begomovirus (TYLCV) por *T. vaporariorum* está ligada a incapacidade do vírus em transpor o epitélio do mesenteron do inseto, e por consequência não atingir a glândula salivar que permitiria a transmissão do vírus. Para tal os autores dissecaram insetos separando as partes onde são encontradas as duas principais barreiras à transmissão de begomovirus no corpo do aleyrodídeo; o epitélio da glândula salivar (localizada no pro tórax) e do mesenteron (abdômen). O vírus foi detectado por microscopia de imunomarcagem no citoplasma de células epiteliais do mesenteron e da glândula salivar na espécie vetora, *B. tabaci*, enquanto que em *T. vaporariorum* o begomovirus aparentemente ficou restrito a superfície de células epiteliais do mesenteron, não sendo detectado no interior destas células ou na glândula salivar.

Para averiguar se o mesmo está ocorrendo em relação a *B. tabaci* biótipo B e o begomovirus do maracujazeiro, foram feitas dissecações de insetos que se alimentaram em plantas de *P. morifolia* infectadas com o isolado de São Fidelis (RJ) e testes de PCR para localizar o vírus nas diferentes partes do inseto. Foram feitos cinco experimentos, totalizando 50 insetos analisados. Foi possível detectar o begomovirus na região posterior (tórax e abdômen) dos insetos, bem como na cabeça e no protorax destes insetos (Figura 8), região onde esta localizada a glândula salivar e glândula salivar acessória. Em algumas avaliações o begomovirus foi detectado em pernas e asas dos insetos. Também foi possível detectar begomovirus nos aleyrodídeos que compunham o controle positivo (alimentados em plantas infectadas por ToSRV). Alguns desses fragmentos obtidos por PCR foram sequenciados, confirmando que os begomovirus detectados nas partes dos insetos eram o ToSRV e a estirpe passiflora do SiMoV. Também foi feito um teste de PCR utilizando primers para detecção de DNA do inseto, como um controle da extração de DNA total, sendo positivo para a extração do inseto inteiro, e para as partes separadas indicando que não houve falha nestas extrações. Este resultado demonstra que o begomovirus foi adquirido pelo inseto, e aparentemente, transpôs a barreira do mesenteron e circulou na hemolinfa, até a cabeça e protórax do inseto. Assim a não transmissão pode estar ligada a outros fatores que não a barreira do mesenteron ou circulação na hemolinfa.

Figura 8 - Detecção do DNA de begomovirus em insetos alimentados em plantas infectadas com o ToSRV (1) , o isolado de São Fidelis (2) e em plantas saudáveis (3), sendo **C** cabeça e protórax , **T** tórax e abdômen, **P** pernas e asas e **M** marcador molecular 1Kb

A alteração de alguns nucleotídeos da sequência do gene que codifica a proteína capsidial é outro fator que pode levar a não transmissão de begomovirus. Noris et al. (1998) avaliaram a influência de alterações na sequência de aminoácidos da proteína capsidial de isolados (Sic, Sar e SicRcv) do *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) na transmissão pelo vetor. O isolado Sic foi obtido de tomateiro infectado na região da Sicília, enquanto que o isolado Sar foi obtido da região da Sardenha, Itália. O isolado SicRcv é um mutante espontâneo do isolado Sic, que é infeccioso, porém não transmitido por *B. tabaci*. Com base na análise das sequências de aminoácidos da proteína capsidial os autores construíram oito variantes a partir do isolado TYLCV-Sar com alterações dos aminoácidos nas posições 129, 134 e 152. Esses variantes, juntamente com os outros isolados, foram analisados quanto a infectividade e transmissão pelo vetor. Variantes contendo os aminoácidos prolina, histidina e aspartato (PHD) e prolina, histidina e glutamato (DHE) nas posições acima mencionadas foram infecciosos, mas não transmitidos por *B. tabaci*. Comparações de sequências de aminoácidos da proteína capsidial de diversos geminivirus transmitidos por *B. tabaci* mostraram que combinações diferentes de glutamina e aspartato (QQD) estão presentes em diversos deles, mas nunca com o aminoácido prolina (P) na posição 129, como é o caso do isolado TYLCV-SicRcv. Os autores atribuíram a não transmissão a fatores intrínsecos da interação de áreas expostas da capa proteica com certos receptores do vetor, uma vez que as características de acumulação e replicação são semelhantes aos demais clones que foram transmitidos pelo aleirodídeo. Os begomovirus de maracujazeiro apresentam o aminoácido serina (S) na posição 129, bem como o SimMV, SiMoV e outros begomovirus transmitidos por aleirodídeos.(figura 9). Höfer et al. (1997) comparam sequências deduzidas de aminoácidos da proteína capsidial de alguns begomovirus transmitidos por aleirodídeos e a sequência de um begomovirus não transmitido, o AbMV. Neste estudo não foi possível inferir se alterações destas sequências

causaram a não transmissão do AbMV, uma vez que as diferenças de aminoácidos observadas foram presentes também entre alguns vírus normalmente transmitidos pelo inseto.

Araguari	KIWMDENIKLKNHTNSVMFWLVRDRRPYGTTPMDFGQVFNMFDNE-157
PdeMinas	KVWMDENIKLMNHTNSVMFWLVRDRRPYGTTPMDFGQVFNMFDNE-157
SFidelis	KVWMDENIKLKNHTNSCMFWLVRDRRPYGTTPMDFGQVFNMFDNE-157
Paragominas	KVWMDENIKLKNHTNSCMFWLVRDRRPYGTTPMDFGQVFNMFDNE-157
SimMV	KIWMDENIKLKNHTNSVMFWLVRDRRPYGTTPMDFGQVFNMFDNE-157
SiYMV	QDMDGRKYQAQHTNSCMFWLVRDRRPYGTTPMDFGQVFNMFDNE-157
SiMoV	KIWMDENIKLKNHTNSCMFWLVRDRRPYGTTPMDFGQVFNMFDNE-157
PLLMV	KIWMDENIKLKNHTNSVMFWLVRDRRPYGTTPMDFGQVFNMFDNE-115
ToYVSV	KIWMDENIKLKNHTNSVIFWLVRRRPYGTTPMDFGQVFNMFDNE-153
ToSRV	KVWMDSEIKLKNHTNSVMFWLVRDRRPYSTPMDFGQVFNMFDNE-157
PSLDV	KVWMDENIKLKNHTNSVMFWLVRDRRPYGTTPMDFGQVFNMFDNE-163
EACMV-K	KIWMDENVKKNHTNSVMFFLVRDRRPYGPSPQDFGQVFNMFDN-163

Figura 9 – Comparação das sequências de aminoácidos presumidos da proteína capsial dos begomovírus de maracujazeiro e outros begomovírus, sendo grifados os aminoácidos das posições 129, 134 e 152 de cada vírus

A não transmissão do SiMoV-P pode estar ligada a incapacidade de transpor o epitélio da glândula salivar. Caciagli et al. (2009) estudaram mutantes do *Tomato yellow leaf curl Sardina virus* (TYLCSV) não transmitidos por *B. tabaci* através de microscopia de imunomarcção e lograram observar mutantes capazes de transpor a barreira da glândula salivar. Isto indica que mesmo a passagem por esta glândula não garante a transmissão do vírus. Estes autores atribuem a não transmissão dos mutantes a interação com outros componentes, como a saliva, no interior da glândula salivar.

A interação do begomovírus com proteínas produzidas por endossimbiontes presentes em uma população específica de aleyrodídeos também pode interferir na transmissão do vírus. Em Israel o biótipo B de *B. tabaci* transmite eficientemente o TYLCV, enquanto o biótipo Q raramente o faz. Com base nesse fato, Gottlieb et al. (2010) estudaram a interação da proteína GroEl produzida pelos endossimbiontes desses biótipos e a transmissão do vírus. O biótipo B possui *Hamiltonella* como endossimbionte secundário, enquanto o biótipo Q possui *Wolbachia* e *Arsenophonus*. Ambos biótipos possuem os endossimbiontes primários *Portiera* e *Rickettsia*. Após diferentes análises de interações entre a proteína GroEl produzidas por esses endossimbiontes e a transmissão do TYLCV os autores concluíram que a GRoEL produzida por *Hamiltonella*, presente no biótipo B e ausente no biótipo Q,

facilitaria a transmissão do vírus. Os outros endossimbiontes presentes em ambos os biótipos não parecem envolvidos na transmissão do TYLCV.

2.5.3 Proteção pela forma atenuada

Um teste de proteção pela forma atenuada foi feito em plantas de maracujazeiro. Plantas sadias de maracujazeiro foram enxertadas com hastes de *P. morifolia* infectadas pela forma atenuada. Após 30 dias não foram observados sintomas nestas plantas, sendo confirmada a infecção por begomovirus através de PCR e recuperação biológica em três plantas de *N. benthamiana*, que exibiram os sintomas fracos do vírus. Foi realizada então a inoculação de desafio, onde as plantas infectadas pela forma fraca foram enxertadas com hastes de maracujazeiro infectadas pela forma severa do vírus (isolado de São Fidelis). Vinte dias após a inoculação de desafio, duas plantas apresentaram sintomas de mosaico leve, sem deformação foliar (Figura 10) enquanto as demais plantas desafiadas (quatro) permaneceram sem sintomas. As duas plantas inoculadas apenas com a forma severa do begomovirus (controles positivos) apresentaram os sintomas típicos da infecção.

Figura 10 – Planta de maracujazeiro infectada com a forma severa do begomovirus (A) e inoculada com a forma atenuada do begomovirus e desafiada com a forma severa (B)

Extratos das folhas dos ponteiros das plantas desafiadas e assintomáticas inoculados em *N. benthamiana* induziram sintomas atenuados, indicativos da presença da forma atenuada do vírus. Análise de RFLP usando produtos de RCA

obtidos a partir do DNA total das plantas de maracujazeiro desafiadas apresentou o padrão de restrição enzimático da forma atenuada nas quatro plantas assintomáticas, indicando que houve proteção total pela estirpe fraca (Figura 10). As plantas que exibiram mosaico leve, no entanto, apresentaram o padrão de RFLP da forma atenuada e também da forma severa. Assim pode ser dito que houve proteção parcial.

Figura 11 – Polimorfismo de comprimento de fragmentos dos produtos de RCA usando a enzima de restrição *EcoRI* para análise da proteção da forma atenuada do begomovirus em plantas de maracujazeiro. Sendo: (M) marcador molecular 1 Kb, (1) isolado severo de São Fidelis, (2) forma atenuada, (3 a 7) maracujazeiros inoculados com a forma atenuada e desafiados com o isolado de São Fidelis.

A proteção por esta forma atenuada contra a forma severa do SiMoV-P fora demonstrada anteriormente em plantas de *Nicotiana benthamiana*. Alves (2008) desafiou nove plantas de *N. benthamiana*, previamente infectadas com a forma atenuada, com a estirpe severa do begomovirus, obtendo proteção total em sete plantas. Naquele experimento duas plantas apresentaram sintomas de ligeira deformação foliar, menos intenso que o sintoma severo. Plantas sadias de *N. benthamiana* inoculadas com extrato foliar destas plantas exibiram apenas os sintomas atenuados (mosqueado sem deformação foliar). A ocorrência de proteção entre a forma atenuada e o isolado de São Fidelis em *N. benthamiana* (ALVES, 2008) e em maracujazeiro no presente trabalho pode ser tomada como mais um indicativo de proximidade entre estes, uma vez que este evento ocorre entre estirpes de uma mesma espécie ou, em alguns casos, entre vírus relacionados. Por isso a ocorrência de proteção fora usada no passado como um critério na classificação de vírus (HULL, 2004).

Há poucos relatos na literatura da ocorrência de estirpes atenuadas de begomovirus bipartidos. Como exemplos podem ser citadas as estirpes fracas do *African casava mosaic virus* (ACMV) e do *East African cassava mosaic virus* (EACMV-UG) encontradas em Uganda e que são parte do complexo de begomovirus que causam a doença do mosaico da mandioca (CMD), que ocasionou

graves prejuízos a cultura durante a epidemia ocorrida em 1990 (PITA et al., 2001). Owor et al. (2004) relatam que posteriormente a esta epidemia, que praticamente devastou plantios com variedades suscetíveis, foi observado um aumento na população de plantas com sintomas fracos, possivelmente devido a seleção praticada pelos produtores. Diante desse fato, esses autores realizaram experimentos em condições de campo para quantificar o efeito da premunização com estirpes fracas desse vírus no desenvolvimento e produção das plantas, quando comparada com aquelas inicialmente sadias e infectadas com estirpes severas do vírus. As plantas premunizadas demonstraram melhor desenvolvimento e produção do que as não premunizadas. Esses resultados demonstram que a premunização pode ser uma medida interessante no manejo de begomoviroses. Da mesma forma, também a forma fraca do begomovirus de maracujazeiro poderá ser útil no futuro, caso haja maior incidência desse vírus em pomares dessa frutífera.

3 CONCLUSÕES

- Os begomovirus encontrados infectando maracujazeiros em São Fidelis (RJ) e Paragominas (PA) podem ser considerados estirpes do *Sida mottle virus*;
- O begomovirus encontrado infectando maracujazeiros em Araguari (MG) pode ser considerado uma estirpe do *Sida micrantha mosaic virus*;
- *Bemisia tabaci* biótipo B não foi capaz de transmitir os isolados de begomovirus de maracujazeiro, mesmo sendo os insetos capazes de adquirir o vírus e este aparentemente circular no corpo do inseto e
- A forma atenuada foi capaz de proteger plantas de maracujazeiro contra a infecção pela forma severa do vírus (isolado de São Fidelis).

REFERÊNCIAS

AKHAR, S.; BRIDDON, R.W.; MANSOOR, S. Reactions of *Nicotiana* species to inoculation with monopartite and bipartite begomoviruses. **Virology Journal**, London, v. 8, p. 475-484, 2011.

ALVES, A.C.C.N. **Passion flower little leaf mosaic virus**: reação de espécies silvestres de *Passiflora*, gama parcial de hospedeiros, seleção de estirpe fraca e transmissão por *Bemisia tabaci* biótipo B. 2008. 48 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2008.

ALVES, A.C.C.N.; REZENDE, J.A.M. Tentativa de transmissão do Passion flower little leaf virus (PLLMV) por *Bemisia tabaci* biótipo B. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, p. 292-292, 2008. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 41., 2008, Belo Horizonte.

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

BRAGA, M.F.; JUNQUEIRA, N.T.V. Uso potencial de outras espécies do gênero *Passiflora*. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, p. 72-75, 2000.

BROWN, J.K.; BIRD, J. Whitefly - transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. **Plant Disease**, St. Paul, v. 76, n. 3, p. 220-225, 1992.

BROWN, J.K.; BIRD, J.; FLETCHER, D.C. First report of *Passiflora* leaf mottle disease caused by a whitefly-transmitted geminivirus in Puerto Rico. **Plant Disease**, St. Paul, v. 77, p. 1264, 1993.

_____. Introduction of an exotic whitefly (*Bemisia*) vector secondary spread of *Jatropha* mosaic virus, a geminivirus previously vectored exclusively by the *Jatropha* biotype. In: GERLING, D.; MAYER, R.T. (Ed.). **Bemisia'95**: taxonomy, biology, damage, control and management. Wimborne: Intercept Publ., 1996. p. 351-353.

BRUCKNER, C.H.; OTONI, W.C. Hibridação em maracujá. In: BORÉM, A. **Hibridização artificial de plantas**. Viçosa: Editora UFV, 1999. p. 379-399.

CACIAGLI, P.; PILES, V.M.; MARIAN, D.; VECCHIATI, M.; MASENGA, V.; MASON, G.; FALCIONI, T.; NORIS, E. Virion stability is important for the circulative transmission of *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* by *Bemisia tabaci*, but virion access to salivary glands does not guarantee transmissibility. **Journal of Virology**, London, v. 83, n. 11, p. 5784-5795, 2009.

CAMILLO, E. **Polinização do maracujá**. Ribeirão Preto: Editora Holos, 2003. 44 p.

COHEN, S.; DUFFUS, J.E.; LERSEN, R.C.; LIU, H.Y.; FLOCK, R.A. Purification, serology and vector relationships of Squash leaf curl virus, a whitefly-transmitted geminivirus. **Phytopathology**, Lancaster, v. 73, p. 1669-1673, 1983.

COSTA, A.M.; TUPINAMBÁ, D. O maracujá e suas propriedades medicinais: estado da arte. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados. 2005. p. 475- 506.

COSTA, A.S. Studies on Abutilon mosaic in Brazil. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 24, p. 97-112, 1955.

_____. Comparação de machos e fêmeas de *Bemisia tabaci* na transmissão do mosaico dourado do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 99-101, 1976.

DE BARRO, P.J.; TRUEMAN, J.W.H.; FROHLICH, D.R. *Bemisia argentifolii* is a race of *B. tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae): the molecular genetic differentiation of *B. tabaci* populations around the world. **Bulletin of Entomological Research**, Cambridge, v. 95, p. 193-203, 2005.

DE BARRO, P.J.; LIU, S.; BOYKIN, L.M.; DINSDALE, A.B. *Bemisia tabaci*: a statement of species status. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 56, p. 1-19, 2011.

ESCOBAR, L.A. **Flora de Colombia**. 10. *Passifloraceae*. Bogotá: Universidad Nacional de Colômbia, 1988. 138 p.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. 678 p.

FARIA, J.C.; ZERBINI, F.M. Família *Geminiviridae* – taxonomia, replicação e movimento. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 8, p. 27-57, 2000.

FAUQUET, C.M.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; MORIONES, E.; STANLEY, J.; ZERBINI, M.; ZHOU, X. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. **Archives of Virology**, Chichester, v. 153, p. 783-821, 2008.

FERREIRA, S.S.; BARROS, D.R.; ALMEIDA, M.R.; ZERBINI, F.M. Characterization of Passionfruit severe leaf distortion virus, a novel begomovirus infecting passionfruit in Brazil, reveals a close relationship with tomato-infecting begomoviruses. **Plant Pathology**, London, v. 59, n. 2, p. 221- 230, 2009.

FIRMINO, A.C.; YUKI, V.V.; MOREIRA, A.G.; REZENDE, J.A.M. Tomato yellow vein streak virus: relationship with *Bemisia tabaci* biotype B and host range. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 6, p. 793-799, 2009.

FISCHER, I.H.; REZENDE, J.A.M. Diseases of passion flower (*Passiflora* spp.). **Pest Technology**, Guilford, v. 2, n. 1, p. 1-19, 2008.

FISCHER, I.H.; REZENDE, J.A.M.; NALDI FILHO, N.; SILVA, J.R. Ocorrência de *Nectria haematococca* em maracujazeiros no Estado do Rio de Janeiro e resistência de *Passiflora mucronata* ao patógeno. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 671, 2005.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Maracujá. In: _____. **Agrianual 2011**: anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo: Argos Comunicação, 2001. p. 345-350.

FREITAS, B.M.; OLIVEIRA FILHO, J.H. Ninhos racionais para mamangava (*Xylocopa frontalis*) na polinização do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 6, p. 1135-1139, 2003.

FROHLICH, D.R.; TORRES-FEREZ, I.; BEDFORD, I.D.; MARKHAM, P.G.; BROWN, J.K. A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 8, p. 1683-1691, 1999.

GHANIM, M.; CZOSNEK, H. *Tomato yellow leaf curl geminivirus* (TYLCV-Is) is transmitted among whiteflies (*Bemisia tabaci*) in a sex-related manner. **Journal of Virology**, London, v. 74, p. 4738-4745, 2000.

GHANIM, M.; SOBOL, I.; GHANIM, M.; CZOSNEK, H. Horizontal transmission of begomovirus between *Bemisia tabaci* biotypes. **Arthropod-Plant Interactions**, London, v. 1, p. 195-204, 2007.

GHANIM, M.; ROSELL, R.C.; CAMPBELL, L.R.; CZOSNEK, H.; BROWN, J.K.; ULLMAN, D.E. Digestive, salivary and reproductive organs of the *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) B type. **Journal of Morphology**, Davis, v. 248, p. 22-40, 2001.

GIORIA, R.; BOSQUE, G.G.; REZENDE, J.A.M.; AMORIM, L.; KITAJIMA, E.W. Incidência de viroses de maracujazeiro na Alta Paulista – SP e danos causados pelo “*Passion fruit woodiness virus*”. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 182-189, 2000.

GLOBAL Invasive Species Database - GISD. Disponível em: <<http://www.issg.org/database>>. Acesso em: 20 fev. 2012.

GOTTLIEB, Y.; ZCHORI-FEIN, E.; MOZES-DAUBE, N.; KONTSEDALOV, S.; SKALJAC, M.; BRUMIN, M.; SOBOL, I.; CZOSNEK, H.; VAVRE, F.; FLEURY, F.; GHANIM, M. The transmission efficiency of *Tomato yellow leaf curl virus* by the whitefly *Bemisia tabaci* is correlated with the presence of a specific symbiotic bacterium species. **Journal of Virology**, London, v. 84, n 18, p. 9310-9317, 2010.

GULLAN, P.J.; CRANSTON, P.S. **The insects**: an outline of entomology. 3rd ed. Davis: Blackwell, 2005. 505 p.

HARRIS, K.F.; ESBROECK, P.V.; DUFFUS, E. Morphology of the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci* (Homoptera: aleyrodidae) relative to virus transmission. **Zoomorphology**, London, v. 116, p. 143-156, 1996.

HARRIS, K.F.; SMITH, O.P.; DUFFUS, J.E. **Virus – insect- plant interactions**. San Diego: Academic Press, 2001. 376 p.

HÖFER, P.; BEDFORD, I.D.; MARKHAM, P.G.; JESKE, H.; FRISCHMUTH, T. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. **Virology**, New York, v. 236, p. 288-295, 1997.

HOGENHOUT, S.A.; AMMAR, E.D.; WHITEFIELD, A.E.; REDINBAUGH, M.G. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. **Annual Review of Phytopathology**, New York, v. 46, p. 327-359, 2008.

HULL, R. **Comparative plant virology**. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 2005. 376 p.

_____. **Matthew's plant virology**. 4th ed. Amsterdam: Elsevier, 2004. 1001 p.

HUNTER, W.B.; HIEBERT, E.; WEBB, E.; TSAI, J.H.; POLSTON, J.E. Location of geminiviruses in the whitefly *Bemisia tabaci*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, n. 10, p. 1147-1151, 1998.

IDRIS, A.M.; SMITH, S.E.; BROWN, J.K. Ingestion, transmission and persistence of chilo del tomate virus (CdTV), a New World begomovirus, by an Old and New World biotypes of the whitefly vector *Bemisia tabaci*. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 139, p.145-154, 2001.

INOUE-NAGATA, A.K.; ALBUQUERQUE, L.C.; ROCHA, W.B.; NAGATA, T. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi 29 DNA polymerase. **Journal of Virological Methods**, London, v. 116, p. 209-211, 2004.

JONES, D.R. Plant viruses transmitted by whiteflies. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 109, p. 195-219, 2003.

JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; FALEIRO, F.G.; PEIXOTO, J.R.; BERNACCI, L.C. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 81-108.

KHAN, J.A.; DIJKSTRA, J. **Plant viroses as molecular pathogens**. Binghamton: Food Products Press, 2002. 536 p.

KIATAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.W.; CRESTANI, O.A. Enfermidades de etiologia viral e associadas a organismos do tipo micoplasma em maracujazeiro no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 11, p. 409-432, 1986.

KING, A.M.Q.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B.; LEFKOWITZ, E.J. **Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses**: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Virus. London: Elsevier; Academic Press, 2012. 1259 p.

LIMA, J.S.; CARNAÚBA, J.P.; SILVA, S.C.; NASCIMENTO, L.D.; ASSUNÇÃO, I.P.; LIMA, G.S.A.; AMORIM, E.P.R. Occurrence of begomovirus on yellow passion fruit in Alagoas state. **Virus Review & Research**, São Paulo, v. 10, p. 140, 2005.

LIU, S.; BEDFORD, I.D.; BRIDDON, R.W.; MARKHAM, P.G. Efficient whitefly transmission of African cassava mosaic geminivirus requires sequences from both genomic components. **Journal of General Virology**, London, v. 78, p. 1791-1794, 1997.

LORENÇÃO, A.L.; NAGAI, H. Surtos populacionais de *B. tabaci* no estado de São Paulo. **Bragantia**, Campinas, v. 53, n.1, p. 53-59, 1994.

MACIEL, S.C.; NAKANO, D.H.; REZENDE, J.A.M.; VIEIRA, M.L.C. Screening of *Passiflora* species for reaction to *Cowpea aphid-borne mosaic virus* reveals an immune wild species. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 3, p. 414-418, 2009.

MANSON, G.; CACIAGLI, P.; ACCOTTO, G.P.; NORIS, E. Real-time PCR for the quantification of Tomato yellow leaf curl *Sardina* virus in tomato plants in *Bemisia tabaci*. **Journal of Virological Methods**, London, v. 147, n.2, p. 282-289, 2007.

MANSOUR, A.; AL-MUSA, A. *Tomato yellow leaf curl virus*: host range and virus-vector relationships. **Plant Pathology**, London, v. 41, p. 12-125, 1992.

MARKHAM, P.G.; BEDFORD, I.D.; LIU, S.; FROLICH, D.; ROSELL, R.; BROWN, J.K. The transmission of geminiviruses by biotypes of *Bemisia tabaci*. In: GERLING, D.; MAYER, R. T. (Ed.). **Bemisia'95**: taxonomy, biology, damage, control and management. Windborne: Intercept Publ., 1996. p. 69-75.

MARUTHI, M.N.; COLVIN, J.; SEAL, S.; GIBSON, G.; COOPER, J. Co-adaptation between cassava mosaic geminiviruses and their local vector populations. **Virus Research**, London, v. 86, p. 71-85, 2002.

MEDINA, V.; PINNER, M.S.; BEDFORD, I.D.; ACHON, M.A.; GEMMENO, C.; MARKHAM, P.G. Immunolocalization of Tomato yellow leaf curl *Sardina* virus in natural hosts plants and its vector *Bemisia tabaci*. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 88, n. 3, p. 299-308, 2006.

MELETTI, L.M.M. Maracujá-amarelo: cultivares IAC conquistam a preferência nacional. **O Agrônomo**, Campinas, v. 53, n. 2, p. 23-25, 2001.

METHA, P.; WYMAN, J.A.; NAKHLA, M.K.; MAXWELL, D.P. Polymerase chain reaction detection of viruliferous *Bemisia tabaci* (Homoptera: *Aleroydidae*) with two tomato-infecting geminiviruses. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 87, p. 1285-1290, 1994.

MOREIRA, A.G.; ALVES, A.C.C.N.; CAMARGO, L.E.A.; OTTONI, J.R.; REZENDE, J.A.M. Ocorrência de Begomovirus em maracujazeiro no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 215, 2006. Suplemento.

MORIN, S.; GHANIM, M.; SOBOL, I.; CZOSNEK, H. The GroEL protein of the whitefly *Bemisia tabaci* interacts with the coat protein of transmissible and nontransmissible begomovirus in the yeast two-hybrid system. **Virology**, New York, v. 276, p. 404- 416, 2000.

NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ. 2002. 213 p.

NASCIMENTO, A.V.S.; SANTANA, E.N.; BRAZ, A.S.K.; ALFENAS, P.F.; PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G.P.; CARVALHO, M.G. de; ZERBINI, F.M. *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. **Archives of Virology**, Chichester, v. 151, n. 9, p. 1797-1809, 2006.

NAVAS-CASTILLO, J.; FIALLO-OLIVÉ, E.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 49, p. 219-248, 2011.

NORIS, E.; VAIRA, A.M.; CACIAGLI, P.; MASENGA, V.; GRONENBORN, B.; ACCOTTO, G.P. Amino acid in the capsid protein of *Tomato yellow leaf curl virus* that are crucial for systemic infection, particle formation and insect transmission. **Journal of Virology**, London, v. 72, n. 12, p. 10050-10057, 1998.

NOVAES, Q.S.; ASTUA, J.F.; YUKI, V.A.; KITAJIMA, E.W.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. Partial characterization of a bipartite begomovirus infecting yellow passion flower in Brazil. **Plant Pathology**, London, v. 52, p. 648-654, 2003.

NOVAES, Q.S.; FREITAS-ASTUA, J.; SÃO JOSÉ, A.R.; YUKI, V.A.; KITAJIMA, E.W.; REZENDE, J.A.M. Infecção mista de maracujazeiro com o *Passion fruit woodiness virus* e um begomovirus no estado da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 6, p. 648, 2002.

NUNES, E.S.; BROWN, J.K.; MOREIRA, A.G.; WATSON, G.; LOURENÇÃO, A.L.; PIEDADE, S.M.S.; REZENDE, J.A.M.; VIEIRA, M.L.C. First report and differential colonization of Passiflora species by the B biotype of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: aleyrodidae) in Brazil. **Neotropical Entomology**. Londrina, v. 37, n. 6, p. 744-746, 2008.

OHNISHI, J.; KITAMURA, T.; TERAMI, F.; HONDA, K. A selective barrier in the midgut epithelial cell membrane of the nonvector whitefly *Trialeurodes vaporariorum* to *Tomato yellow leaf curl virus* uptake. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 75, p. 131-139, 2009.

OWOR, B.; LEGG, J.P.; OKAO-OKUJA, G.; OBONYO, R.; KYAMANYWA, S.; OGENGA-LATIGO, M.W. Field studies of cross protection with Cassava mosaic Geminiviruses in Uganda. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, p. 243-249, 2004.

PASSARIN, D.M.M. **Transformação genética de cana-de-açúcar por biolística e *Arobacterium tumefaciens*, visando estudar o mecanismo de morte celular programada**. 2009. 147 p. Tese Doutorado (Fisiologia e Bioquímica de plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

PEIXOTO, M. Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 457-465.

PEREIRA, M.A. Maracujazeiro (*Passiflora* sp.). In: CASTRO, P.R.; KLUGE, R.A.; SESTARI, I. **Manual de fisiologia vegetal: fisiologia de cultivos**. São Paulo: Editora Ceres, 2008. p. 606.

PERRING, T.M. The *Bemisia tabaci* species complex. **Crop Protection**, Guildford, v. 20, p. 725-737, 2001.

PICÓ, B.; DIEZ, M.J.; NUEZ, F. Viral disease causing the greatest economic losses to the tomato crop. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 67, n. 1, p. 151-196, 1996.

PITA, J.S.; FONDONG, V.N.; SANGARE, A.; OTIM-NAPE, G.W.; FAUQUET, C.M. Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of cassava mosaic disease in Uganda. **Journal of General Virology**, London, v. 82, p. 655-665, 2001.

REZENDE, J.A.M.; KITAJIMA, E.W. Viroses e fitoplasmose do maracujazeiro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 6., 2003, Campos dos Goytacazes. Campos dos Goytacazes: Cluster Informática, 2003. 1 CD-ROM.

ROCHA, K.C.G.; MARUBAYASHI, J.M.; NAVAS-CASTILLO, J.; YUKI, V.A.; WILCKEN, C.F.; PAVAN, M.A.; KRAUSE-SAKATE, R. Only the B biotype of *Bemisia tabaci* is present on vegetables in São Paulo State, Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, n. 1, p. 120-123, 2011.

RONCATTO, G.; OLIVEIRA, J.C.; RUGGIERO, C.; NOGEURIA FILHO, G.C.; FERREIRA, F.R. Comportamento de maracujazeiros (*Passiflora* spp) quanto à morte prematura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 26, n. 3, p. 552-554, 2004.

ROSELL, R.C.; TORRES-JEREZ, I.; BROWN, J.K. Tracing the geminivirus-whitefly transmission pathway by polymerase chain reaction in whitefly extracts, saliva, hemolymph and honeydew. **Phytopathology**, Lancaster, v. 89, p. 239-246, 1999.

SALOMÃO, T.A.; ANDRADE, V.M.M. Botânica. In: RUGGIERO, C. (Ed.). **Cultura do maracujazeiro**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 1987. p. 20-39.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3 v.

SANTOS, C.D.G.; ÁVILA, A.C.; RESENDE, R.O. Estudo da interação de um begomovirus isolado de tomateiro com a mosca-branca. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 664-673, 2003.

SINISTERRA, X.H.; MCKENZIE, C.L.; HUNTER, W.B.; POWELL, C.A., SHATTERS JR., R.G. Differential transcriptional activity of plant-pathogenic begomovirus in their whitefly vector (*Bemisia tabaci*, Gennadius: *Hemiptera Aleyrodidae*). **Journal of General Virology**, London, v. 86, p. 1525-1532. 2005.

SOUZA, J.S.I.; MELETTI, L.M.M. **Maracujá**: espécies, variedades, cultivo. Piracicaba: FEALQ, 1997. 179 p.

SSERUWAGI, P.; LEGG, J.P.; MARUTHI, M.N.; COLVIN, J.; REY, M.E.C.; BROWN, J.K. Genetic diversity of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) populations and presence of the B biotype and non-B biotype that can induce silverleaf symptoms in squash, in Uganda. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 147, p. 253-265, 2005.

STADEN, R. The Staden sequence analysis package. **Molecular Biotechnology**, Cambridge, v. 5, p. 233-241, 1996.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997.

VALLE, G.E.; LORENÇÃO, A.L.; ZUCCHI, M.I.; PINHEIRO, J.B.; ABREU, A.G. MtDNA variability in whitefly (*Bemisia tabaci*) populations in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 3, p. 2155-2164, 2011.

VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. Cambridge: The MIT Press, 1996. 224 p.

WU, Z.C.; HU, J.S.; POLSTON, J.E.; ULLMAN, D.E.; HIEBERT, E. Complete nucleotide sequence of a nonvector-transmissible strain of abutilon mosaic geminivirus in Hawaii. **Phytopathology**, Lancaster, v. 86, p. 608-613, 1996.

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

ZHANG, Y.; UYEMOTO, J.K.; KIRKPATRICK, B.C. A small procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 71, p. 45-50, 1998.

ANEXO

ANEXO A

1. Sequência de nucleotídeos do DNA-A do isolado de Araguari (MG) obtido através de RCA (2675nt)

ACCGGATGGCCGCGCGATTTCCTCCCCCTTACGTGGCGCGCTGGTGGTCGTG
 CGATCTCTCTCCCCCTCTCGCGCGACGTGGAGCTCTGGTGTCCGCGCGTTC
 CCCCCGCGCGTTCTGCCTTTAATTTAAATTAAGGAAATAACTTTTCATCAGGAT
 CAATGAAATTGCGTCTTTTAAGTCTAGATATCTGCGAAAGACTTGGGCCCTAAGT
 TGTTTTATGGCTATAAAATTAAGTCATTCATGACGTCAGGAAATAATTTCGAAATGC
 CCAAGCGGGATCCTTCATGGCGCCAGATGGCGGGAACCTCAAAGGTTAGCCGC
 TCTTCTAACTTTTCCCCTCGTGGTGGTGGAGGCCCAAATAACAAGGCCTCG
 GAATGGGTGAACAGGCCCATGTATAGGAAGCCCAGGATATACAGGATGGTAAG
 GACTCCGATGTTCCAAGAGGCTGTGAAGGGCCCTGTAAGGTCCAGTCCTACGA
 GCAGCGTCATGACATATCACATGTCGGGAAGGTCATGTGCATCTCGGACGTCAC
 ACGTGGTAACGGTATAACCCACCGTGTCTGGTAAGCGTTTCTGCGTTAAGTCTCT
 GTACATTTTAGGGAAGATATGGATGGACGAGAACATCAAGCTCAAGAACCACAC
 GAACAGTGTCTGTTCTGGTTGGTCAGAGACCGTAGACCGTATGGTACTCCTAT
 GGACTTTGGTCAGGTGTTCAACATGTTTGACAACGAGCCCAGCACTGCTACGGT
 TAAGAACGATCTCCGTGATCGTTATCAGGTTATGCACAAGTTCTACGCCAAGGT
 CACTGGTGGTCAATATGCCAGCAATGAACAGGCTCTGGTCAAGAGGTTCTGGA
 GGGTCAACAATCATGTGGTGTACAATCACCAGGAAGCTGGCAAGTATGAGAATC
 ACACGGAGAATGCTTTGTTACTGTATATGGCATGTACTCATGCCTCTAACCCTGT
 GTATGCAACGCTTAAGATTCGATCTACTTCTACGATTCGATAACCAATTAATAA
 AATTTGAATTTTATATCATGATCTTCAAGTACATAGTTTACATAGGCTTTGTCAGT
 GGCAAAGCGAACAGCTCTAATTACATTGTTAAGGGAAATTACACCTAATTGATCT
 AAGTACAACATTACAAGGCGTCTAAGCCTAATCAAATAAGTTGTTCCAGAAGCTG
 TCAGAGAAGTCGTCCAGACTTGGAAGTTCAGGTAGGCCTTGTGGAGACCCAAT
 GCTTTCCTGAGGTTGTGGTTGAACCTTATCTGTATGTGGTACACTCTGGTCCGC
 GTGTACGGTGGATCCTCTACGTTGTACATCTTGAAATACAGGGGATTTGTTATCT
 CCCAGATATAGACGCCATTCTCTGCCTGAGGTGCAGTGATGAATTCGCCGGTGC
 GTGAATCCATGCCCGGTGCAGTTGAGGTGTTGGTATATGGAGCAGCCGCACTC
 GAGGTCCACTCGTCTACGCCTGATGGCTCTCTTCTTGGCAATCCTGTGTCTCGG
 TTTGATAGAGGGGGGGCGTCGAGGAAGATGAATTTAGCATTGTGGAGTGTCCAG
 CCTCTCAATGCCGCATTTTCCTCTTTGTCTAGGAAGTCTTTATAGCTGGCCCCCT
 CCCCAGGATTGCACAACACGATTGAAGGGACCCACCTTCAATCAAACGAGGCT
 TTCCGTACTTGCAGTTTGTTTGCCATTTCTGCTGGGCCCTATTAGTTCTTTCCA
 GTGTTTCAACTTTAGGTAATGCGGAGCGACGTCATCAATGACGTTATACTCCACT
 TGATCGGAATAGACCTTTGAGTTGAAATCTAGATGGCCACTGAAGTAATTATGTG
 GGCCTAATGCTCTAGCCACATCGTCTTACCAGTTCGAGAACCACCTTCAACAA
 TTAACTTATGGGCCTCAATGGCCGCGCAGCGGAACCCCTCCCCAAAAAATCAT
 CGGCCCACTCTTGATCTCGTCTGGCACGTTAGTGAATGAGGAGAGACGAAAC
 GGAGGGGGCCCATGGCTCCGGAGCCTTAGCAAAGATCCTATCTAAATTACTATTT
 AGATTGTGAACTGGAATAGGAATTTTCCGGCAACTTCTCTCGGATTATCTGCA
 AGGCGACTTCTTTGGAAGGGGCGTTCAAGGCTTCTGCGGCAGCGTCGTTAGCT
 GTCTGGCAACCGCCTCTAGCACTTCTACCGTCGATTTGGAATTCCCCCACTCG
 AGAGTATCTCCGTCCTTGTGATGTAGGACTTGACGTCGGACGATGATTTAGCT
 CCCTGTATGTTAGGATGGAAATGTGTTGACCTGGTTGGGGATACCAGGTGGAAG
 AGTCTGTTATTCGTGCATTGGAATTTCCCTGGAAGTGTATAAGGACGTGGAGA
 TGAGGCTCCCATTTTCGTGGAGCTCTCTGCAGATTTTGATGAACTTCTTGTTAA
 CTGGTATCGATAAGCTCTGTAATTGGGAAAGTGTCTCCTCTTTGGTTAAGGAGC

ACTGGGGATAAGTCAAGAAATAATTCTTTGCACTTATTTTAAAACGCTTTGGCGG
 TGGCATTTTTGTAAATAAGGGGTGTACCCCAATTGAGAGCTCGCTCTATAAGTCA
 TATGAATTGGGGTAATGGGGACAATATATAGTAGAAGATCCTAAGGGGCTTTAA
 GCGGCCATCCGCACTAATATT

2. Sequência de nucleotídeos do DNA-A do isolado de Paragominas (PA) obtido através de RCA (2669 nt)

ACCGGATGGCCGCGCGATTTCACGTCGCTCTGGTGGCCG
 CTCGATCGCCCTTCCCGCTCCAGTGGAGTCCCCCGCTCGCGCTATGTTCTC
 CTTTAATTTAAATTAAGGATTTAACTTTTATCTAACCAATAATAGTGCGCCTGAG
 GAGCTTAGATATCTGTGTAATACTTCGTCCCAAGTTTTATAACCCCTATAAAAC
 AAAAGCACTAATGACGTCATACTGTAATTCAGAATGCCTAAGCGGGATCCCTCAT
 GGCGCCAGATGGCGGGAACCTCAAAGGTAAGCCGCACTTCCAATTTCTCACCT
 CGTGGAGGTGGAGGCCCAAATTCAACAAGGCCTCAGAATGGGTCAACAGGCC
 CATGTACAGGAAGCCCAGGATATATCGGACGTTGAGAACGCCTGATGTTCTAG
 AGGCTGTGAAGGGCCCTGTAAGGTCCAGTCGTACGAGCAACGTCACGATATCT
 CCCATGTTGGGAAGGTGATGTGTATATCTGATATTACTCGTGGTAACGGTATTAC
 CCACCGTGTAGGTAAGCGTTTTTGTGTTAAGTCTGTGTACATTTTAGGGAAGGT
 GTGGATGGACGAGAACATCAAGCTCAAGAACCACACGAACAGTTGCATGTTCTG
 GTTGGTCAGGGACCGTAGACCGTATGGCACACCTATGGATTTTGGCCAGGTGTT
 CAACATGTTGACAACGAGCCTAGCACTGCAACTGTGAAGAACGACCTGCGTGA
 TCGTTTCCAAGTCATGCATAAGTTCTATGCCAAGGTCACTGGTGGACAGTATGC
 CAGCAACGAGCAGGCGCTGGTCAAGCGTTTCTGGAAGGTCAACAATCATGTGG
 TCTACAATCATCAAGAGGCTGGCAAGTACGAGAATCACACGGAGAACGCATTAT
 TATTGTATATGGCATGTACTCATGCATCTAACCCTGTGTACGCAACGCTGAAGAT
 TCGAATCTATTTCTACGATTCGATCACGAATTAATAAATTTTGAATTTTATTGAAT
 GATTTTCCAGTACATATCTGACATATGATCTGTCAGTCGCAAAACGAACAGCTCT
 AATTACATTGTTAATCGTAATAACGCCTAGTTGGTCTAAATACAGCATGACTAAC
 CGCCTAAACCTAATCAAATAAGTCGTTCCAGAAGCTGTCAGAGATGTCGTCCAG
 ACTTGGAAGTTCAGGAATGCCTTGTGGAGACCCAATGCTCTCCTGAGGTTGTGG
 TTGAACCGTATCTGTACGTGGTACACTCTGGTCGTCGTGTACAACAGGTCCTCT
 ACGTGGTATATCTTGAAATACAGGGGATTTGTTATCTCCCAAATATAGACGCCAT
 TCTCTGCTTGAGGCACAGTGATGAGTTCCCCGGTGCGTGAATCCATTGTTGCTG
 CAGCTGATGTGGACGTATATGGTGCACCCGCACACTAGATCAATCCTTCTACGG
 CGAGTTCCTCTCTTCTTCGCCGCCCTGTGTCTGGTTTGATAGAGGGGGGAGT
 CGAGGAAGATGAATTTAGCATTGTGGAGTGTCCACGACTTTAGACATGCATTCT
 CTTCTTTGTGCGAGGAACCTTTATAACTGACTCCCTCCCCAGGATTGCAGAGCA
 CGATTGATGGGATCCCACCTTTAATTTGAACTGGCTTTCCGTATTTGCAATTTGA
 CTGCCAGTCTTTTTGAGCACCAATCAATTCTTTCCAGTGCTTTAACTTTAGATATT
 GGGGTGTGACATCATCAATGACGTTATACTCCACTTCGTTTGAGTAGACCCTTG
 GGTTGAAGTCCAGATGTCCACTGAGATAATTATGTGGGCCTAACGCACGAGCCC
 ACATCGTCTTGCCTGTCCTTGAATCACCTTCGACTATCAAACCTCATAGGTCTCAA
 CGGCCGCGCAGCGGAACCCCTCCCAAATAATCATCCGCCCACTCTTGATCT
 CGACGGGAACGTTAGTGAAGGAGGAAAGTGAAAACGGCGGTGTCCATGGCTCC
 GGAGCCTTTGAGAAAATCCTATCTAAATTAGAAATTTAGATTGTGAACTGAAAAA
 GATATTTCTCAGGCAACTTCTCCCTAATGATTTGGAGAGCCGTGTGTTTATCCGG
 AGCATTTAACGCCTCAGCAGCAGCGTCATTAGCTGTCTGTTGACCTCCCCTCGC
 ACTTCTTCCGTCGACCTGGAATCCCCCATTCCACTGTATCTCCGTCCTTGTGCG
 ATGTATGCCTTGACGTCGGAGCTTGATTTAGCTCCCTGAATGTTCCGATGGAAA

TGTGCTGACCTAGTGGGGGAGACCAGGTCTGAACAATCTGTTATTCGTGCATTGG
 AATTTCCCTTCGAACTGGAGAAGGACGTGGAGATGAGGCTCCCCATCTTCGTGA
 AGCTCTCTGCAGATCTTGATGAATTTCTTGTTACCCGGTGTTTTTATGTTAAGAAA
 TTGGGAAAGTGTTTCTTCTTTGGTTAACGAACACCGGGGATATGTTATGAAATAG
 TTTTGGCTTTTATACAGAAAGAACCCTTCCGTGGCATTTTTGTAAATAAGGCTG
 TGTACCCCCAATAGCTCTCCGCTCTAAAACTCATATGAATTGGGGGTACTGGGG
 GTACATTTATACTAGAAGTTCCTAAGGCTCTAAATGGGGTACGTGGCGGCCATC
 CGTCTAATATT

3. Sequência de nucleotídeos do DNA-A do isolado de Patos de Minas (MG) obtido através de RCA (2670nt)

ACCGGATGGCCGCGCGATTCCCCCCCCCTACGTGGCGCTCTGGTGGCCGC
 CCGATCCCCCTCCCCGCTCTCGTGGAGCCCCCCCCGCTCGCGCGATGTTCTCC
 TTTAATTCAAATTAAGGATTTAACTTTGGATCTGACCAATTATAGTGCGCCTGAG
 GAGCTTAGATAACTGTGTTAATACTTGGTCCCTAAGTTTTATGGCCCCCTATAAAA
 CTAAAGCAAGCATGACGTCAGTCTATAATTCGAAATGCCTAAGCGGGATCCCTC
 ATGGCGCCAGATGGCGGGAACCTCAAAGGTAAGCCGCTCTACCAACTTTTCCC
 CTCGTGGAGGAGGAGGCCCAAAGTACAACAAGGCCTCGGAATGGGTAAACAGG
 CCCATGTATAGGAAGCCCAGGATATATCGGACTATCAGGACTCCTGATGTTCCA
 AGAGGCTGTGAAGGGCCCTGTAAGGTCCAGTCCTACGAGCAGCGTCACGACAT
 CTCACATGTGCGCAAGGTCATGTGCATATCTGATGTCACACGTGGCAACGGTAT
 AACCCACCGTGTCGGTAAGCGTTTCTGCGTTAAGTCTGTGTATATTCTAGGGAA
 GGTGTGGATGGATGAGAACATCAAGCTGATGAACCACACGAACAGTGTGATGTT
 CTGGTTGGTCAGAGACCGTAGACCGTATGGTACTCCTATGGACTTTGGGCAGGT
 GTTCAACATGTTTGACAACGAGCCCAGTACTGCAACCGTGAAGAACGATCTGCG
 CGATCGTTACCAAGTGATGCACAAGTTCTACTCCAAGGTGACTGGTGGTCAGTA
 TGCCAGCAACGAGCAGGCACTTGTGCGTCGTTTCTGGAAGGTCAACAATCATGT
 GGTGTACAACCACCAAGACTCTGGCAAGTATGAGAACCACACGGAGAACGCAC
 TGTTATTGTATATGGCATGTACTCATGCCTCTAACCCTGTGTATGCGACTCTTAA
 GATTCGGATCTACTTCTACGATTCGATATCGAATTAATAAAGATTCAATTTTATTG
 AATGATTTTCGAGAACATAATTTACATATGATGTGGCTGTTGCAAAACGAACAGC
 TCTAATTACATTGTTAATTGTAATAACACCTAACTGATCTAAGTACATCATGACAA
 GACGTCTAAATCTATTCAAATAAGTCGGTCCAGAAGCTGGCAGAGAAGTCGTCC
 AGACTTGGAAGTTCAGGTAGGCCTTGTGGAGACCCAATGCTCTCCTGAGGTTGT
 GGTTGAACCGTATCTGTACGTGGTACACTCTGGTCGTGCTGTACAACAGGTCCT
 CTACGTGGTATATCTTGAAATACAGGGGATTTGTTATCTCCCAAATATAGACGCC
 ATTCTCTGCTTGATGCACAGTGATGAGTTCCCCGGTGCGTGAATCCATTGTTGC
 TGCAGCTGATGTGGACGTATATGGTGCACCCGACACTAGATCAATCCTTCTAC
 GCGGAGTTCCTCTCTTCTTCGCCGCTCGGTGCTGCACTTTGATACAGGGGGGA
 GTCGAGGAAGATGAATTTAGCATTGTGGAGTGTCCACGACTTTAGACATGCATT
 CTCTTCTTTGTCGAGGAACCTTTATAACTGACTCCCTCCCCAGGATTGCAGAGC
 ACGATTGATGGGATCCCACCTTTAATTTGAACTGGCTTTCCGTATTTGCAATTTG
 ACTGCCAGTCTTTTTGAGCACCAATCAATTCTTTCCAGTGCTTTAACTTTAGATAT
 TGGGGTGTGACATCATCAATGACGTTATACTCCACTTCGTTTGAGTAGACCCTTG
 GGTGAAGTCCAGATGTCCACTGAGATAATTATGTGGGCCTAACGCACGAGCCC
 ACATCGTCTTGCTGTCTTGAATCACCTTCGACTATCAAACCTCATAGGTCTCAA
 CGGCCGCGCAGCGGAACCCCTCCCAAATAATCATCCGCCCACTCTTGATCT
 CGACGGGAACGTTAGTGAAGGAGGAAAGTGAAAACGGCGGTGTCCATGGCTCC
 GGAGCCTTTGAGAAAATCCTATCTAAATTAGAAATTTAGATTGTGAAACTGAAAAA

GATATTTCTCAGGCAACTTCTCCCTAATGATTTGGAGAGCCGTGTGTTTATCCGG
 AGCATTTAACGCCTCAGCAGCAGCGTCATTAGCTGTCTGTTGACCTCCCCCTCGC
 ACTTCTTCCGTCGACCTGGAATTCCTCCCTGATCTCCGTCCTTGTCTG
 ATGTATGCCTTGACGTCGGAGCTTGATTTAGCTCCCTGAATGTTCCGATGGAAA
 TGTGCTGACCTAGTGGGGGAGACCAGGTCGAACAATCTGTTATTCGTGCATTGG
 AATTTCCCTTCGAACCTGGAGAAGGACGTGGAGATGAGGCTCCCCATCTTCGTGA
 AGCTCTCTGCAGATCTTGATGAATTTCTTGTTACCCGGTGTTTTTATGTTAAGAAA
 TTGGGAAAGTGTTTCTTCTTTGGTTAACGAACACCGGGGATATGTTATGAAATAG
 TTTTTGGCTTTTATACAGAAAGAACCCTTCCGTGGCATTTTTGTAAATAAGGCTG
 TGTACCCCAATAGCTCTCCGCTCTAAACTCATATGAATTGGGGGTACTGGGG
 GTACATTTATACTAGAAGTTCCTAAGGCTCTAAATGGGGTACGTGGCGGCCATC
 CGTCTAATATT

4. Sequência de nucleotídeos do DNA-A do isolado atenuado obtido em Piracicaba (SP) obtido através de RCA (2616nt)

CCCCCCCCCACGTGGCGCTCTGGTGGCCGCTCGATCGCCCTTCCCGCTCCA
 GTGGAGTCCCCCGCTCGCGCTATGTTCTCCTTTAATTTAAATTAAGGATTTA
 ACTTTTATCTAACCAATAAGTGCGCCTGAGGAGCTTAGATATCTGTGTAATAC
 TTCGTCCCCAAGTTTTATAACCCCTATAAAACAAAAGCACTAATGACGTCATACT
 GTAATTCAGAATGCCTAAGCGGGATCCCTCATGGCGCCAGATGGCGGGAACCT
 CAAAGGTAAGCCGCACTTCCAATTTCTCACCTCGTGGAGGTGGAGGCCCAAAT
 TCAACAAGGCCTCAGAATGGGTCAACAGGCCCATGTACAGGAAGCCCAGGATA
 TATCGGACGTTGAGAACGCCTGATGTTCTAGAGGCTGTGAAGGGCCCTGTAA
 GGTCAGTCGTACGAGCAACGTCACGATATCTCCCATGTTGGGAAGGTGATGT
 GTATATCTGATATTACTCGTGGTAACGGTATTACCCACCAACCGTGTCCGTAAG
 CGTTTCTGCGTTAAGTCTGTGTACATTTTAGGGAAGATATGGATGGACGAGAAC
 ATCAAGCTGAAGAACCACACGAACAGTGTCATGTTCTGGTTGGTCAGAGACCGT
 AGACCGTATGGTACTCCTATGGACTTTGGCCAGGTGTTCAACATGTTTGACAAC
 GAGCCCAGCACTGCTACGGTGAAGAACGATCTCCGTGATCGTTATCAAGTTATG
 CACAAGTTCTACGCCAAGGTCAGTGGTGGTCAATATGCCAGCAACGAGCAGGC
 GCTGGTCAAGCGTTTCTGGAAGGTCAACAATCATGTGGTCTACAACCATCAGGA
 GGCTGGCAAGTACGAGAATCACACGGAGAATGCGTTGTTACTGTATATGGCATG
 TACTCATGCCTCTAACCCGTGTGTATGCAACGCTTAAGATTCGGATCTACTTTTAC
 GATTTCGATAACCAATTAATAAAATTTGAATTTTATATCATGATCTTCAAGTACATG
 GTTTACATAGGCTTTGTGAGTGGCAAAGCGAACAGCTCTAATTACATTGTTAAGG
 GAAATTACACCTAATTGATCTAAGTACATCATTACAAGGCGTCTAAGCCTAATCA
 AATAAGTCGTTCCAGAAGCTGTCAGAGAAGTCGTCCAGACTTGGAAGTTCAGGT
 AGGCCTTGTGGAGACCCAATGCTTTCTGAGGTTGTGGTTGAACCGTATCTGTA
 CGTGGTACACTCTGGTCGTCGTGTACAACAGGTCCTCTACGTTGTATATCTTGA
 AATATAGGGGATTTGTTATCTCCAGATATAGACGCCATTCTCTGCCTGAGGTG
 CAGTGATGAATCCCCGGTGCGTGAATCCATGTCCGGTGCAGTTGAGGTGTTG
 GTATATGGAGCACCCGCACTCTAGGTCAATCCTTCTACGGCGAGTTCCTCTCTT
 CTTGCGCCGCCCTGTGTCGTGGTTTGATAGAGGGGGGAGTCGAGGAAGATGAAT
 TTAGCATTGTGGAGTGTCCACGACTTTAGACATGCATTCTCTTCTTTGTCGAGGA
 ACTCTTTATAACTGACTCCCTCCCCAGGATTGCAGAGCACGATTGATGGGATCC
 CACCTTTAATTTGAACTGGCTTTCCGTATTTGCAATTTGACTGCCAGTCTTTTTGA
 GCACCAATCAATTCTTTCCAGTGCTTTAACTTTAGATATTGGGGTGTGACATCAT
 CAATGACGTTATACTCCACTTCGTTTGAGTAGACCCTTGGGTGGAAGTCCAGAT
 GTCCACTGAGATAATTATGTGGGCCTAACGCACGAGCCACATCGTCTTGCCTG

TCCTTGAATCACCTTCGACTATCAAACCTCATAGGTCTCAACGGCCGCGCAGCGG
 AACCCCTCCCAAATAATCATCCGCCACTCTTGCATCTCGACGGGAACGTTAG
 TGAAGGAGGAAAGTGAAAACGGCGGTGTCCATGGCTCCGGAGCCCTTGCAATA
 TTCTATCTAAATTACTATTTAGATTGTGAAACTGAAATAAGAACTTTTCCGGCAGC
 TTCTCCCGGATTATCTGCAAGGCGACGTCTTTGGAAGGTGCGTTCAAGGCGTCT
 GCGGCAGCGTCGTTAGCTGTCTGGCAACCGCCTCTAGCACTTCTGCCGTGAC
 CTGGAATTCACCCCATTTCTACTGTATCTCCGTCTTGTGCGATATAGGACTTGACG
 TCGGACGATGATTTAGCTCCCTGTATGTTAGGATGGAAATGTGCTGACCTGGTT
 GGGGATACCAGGTGCAAGAGTCTGTTATTCGTGCATTGGAATTTCCCTTGGAAC
 TGGATAAGGACGTGGAGATGAGGCTCCCCATTTTCATGGAGCTCTCTGCAGATT
 TTGATGAATTTCTTGTTAACTGGTGTGCTAAGCTCTGTAATTGGGAAAGTGTCT
 CCTCTTTGGTTAAGGAGCACTGGGGATATGTCAAGAAATAATTCTTGGCACTTAT
 TTTAAAACGCTTTGGCGGTGGCATTTTTGTAATAAGGGGTGTACCCCAATTGAG
 AGCTCGCTCTATAAGTCATATGAATTGGGGTAAAGGGGACAATATATAGTAGAA
 GATCCTAAGGGGCTTT

5. Sequência de nucleotídeos do DNA-A do isolado de Araguari (MG) obtido através clonagem bacteriana (2675 nt)

ACCGGATGGCCGCGCGATTTCCTCCCCCTACGTGGCGCGCTGGTGGTCGTG
 CGATCTCTCTCCCCCTCTCGCGCGACGTGGAGCTCTGGTGTCCGCGCGTTC
 CCCCCCGCGCGTTCTGCCTCTAATTTAAATTAAGGAAATAACTTTCATCAGGA
 TCAATGAAATTGCGTCTTTTAAGTCTAGATATCTGCGAAAGACTTGGGCCCTAAG
 TTGTATTATGGCTATAAAATTAAGTCATTTCATGACGTCAGGAAATAATTCGAAATG
 CCCAAGCGGGATCCTTCATGGCGCCAGATGGCGGGAACCTCAAAGGTTAGCCG
 CTCTTCTAACTTTTCCCCTCGTGGTGGTGGAGGCCCAAATACAACAAGGCCTC
 GGAATGGGTGAACAGGCCCATGTATAGGAAGCCCAGGATATACAGGATGGTAA
 GGAATCCTGATGTTCCAAGAGGCTGTGAAGGGCCCTGTAAGGTCCAGTCCTAC
 GAGCAGCGTCATGACATCTCACATGTCCGGAAGGTCATGTGCATCTCGGACGT
 CACACGTGGTAACGGTATAACCCACCGTGTCCGTAAGCGTTTCTGCGTTAAGTC
 TCTGTACATTTTAGGGAAGATATGGATGGACGAGAACATCAAGCTCAAGAACCA
 CACGAACAGTGTGATGTTCTGGTTGGTCAGAGACCGTAGACCGTATGGTACTCC
 TATGGACTTTGGTCAGGTGTTCAACATGTTTGACAACGAGCCCAGCACTGCTAC
 GGTAAAGAACGATCTCCGTGATCGTTATCAGGTTATGCACAAGTTCTACGCCAA
 GGTCATGTTGGTCAATATGCCAGCAATGAACAGGCTCTGGTCAAGAGGTTCTG
 GAGGGTCAACAATCATGTGGTGTACAATCACCAGGAAGCTGGCAAGTATGAGAA
 TCACACGGAGAATGCTTTGTTACTGTATATGGCATGTACTCATGCCTCTAACCT
 GTGTATGCAACGCTTAAGATTTCGGATCTACTTCTACGATTTCGATAACCAATTAAT
 AAAATTTGAATTTTATATCATGATCTTCAAGTACATAGTTTACATAGGCTTTGTCA
 GTGGCAAAGCGAACAGCTCTAATTACATTGTTAAGGGAAATTACACCTAATTGAT
 CTAAGTACAACATTACAAGGCGTCTAAGCCTAATCAAATAAGTTGTTCCAGAAGC
 TGTCAGAGAAGTCGTCCAGACTTGGAAGTTCAGGTAGGCCTTGTGGAGACCCA
 ATGCTTTCCTGAGGTTGTGGTTGAACCTTATCTGTATGTGGTACACTCTGGTCCG
 CGTGTACGGTGGATCCTCTACGTTGTACATCTTGAAATACAGGGGATTTGTTATC
 TCCAGATATAGACGCCATTCTCTGCCTGAGGTGCAGTGATGAATTCCTCCGGTG
 CGTGAATCCATGCCCGGTGCAGTTGAGGTGTTGGTATATGGAGCAGCCGCACT
 CGAGGTCCACTCGTCTACGCCTGATGGCTCTCTTCTTGGCAATCCTGTGTCTCG
 GTTTGATAGAGGGGGCGTCGAGGAAGATGAATTTAGCATTGTGGAGTGTCCAG
 CCTCTCAATGCCGCATTTTCCTCTTTGTCTAGGAAGTCTTTATAGCTGGCCCCCT

CCCCAGGATTGCACAACACGATTGAAGGGACCCACCTTCAATCAAACGAGGCT
 TTCCGTA CTTCAGTTTTGTTTGCCATTTCTGCTGGGCCCCCTATTAGTTCTTTCCA
 GTGTTTCAACTTTAGGTAATGCGGAGCGACGTCATCAATGACGTTATACTCCACT
 TGATCGGAATAGACCTTTGAGTTGAAATCTAGATGGCCACTGAAGTAATTATGTG
 GGCTAATGCTCTAGCCACATCGTCTTACCAGTTCGAGAACCACCTTCAACAA
 TTAAACTTATGGGCCTCAATGGCCGCGCAGCGGAACCCCTCCCAAAAAAATCAT
 CGGCCCACTCTTG CATCTCGTCTGGCACGTTAGTGAATGAGGAGAGACGAAAC
 GGAGGGGGCCCATGGCTCCGGAGCCTTAGCAAAGATCCTATCTAAATTACTATTT
 AGATTGTGAAACTGGAATAGGAACTTTTCCGGCAACTTCTCCCGGATTATCTGCA
 AGGCGACTTCTTTGGAAGGGGGCGTTCAAGGCTTCTGCGGCAGCGTCGTTAGCT
 GTCTGGCAACCGCCTCTAGCACTTCTACCGTCGATTTGGAATCCCCCACTCG
 AGAGTATCTCCGTCCTTGTGATGTAGGACTTGACGTCGGACGATGATTTAGCT
 CCCTGTATGTTAGGATGGAAATGTGTTGACCTGTTGGGGATAACCAGGTGGAAG
 AGTCTGTTATTCGTGCATTGGAATTTCCCCTGGAAGTGTATAAGGACGTGGAGA
 TGAGGCTCCCCATTTTCGTGGAGCTCTCTGCAGATTTTGATGAACTTCTTGTTAA
 CTGGTATCGATAAGCTCTGTAATTGGGAAAGTGTCTCCTCTTTGGTTAAGGAGC
 ACTGGGGATAAGTCAAGAAATAATTCTTTGCACTTATTTTAAAACGCTTTGGCGG
 TGGCATTTTTGTAATAAGGGGTGTACCCCAATTGAGAGCTCGCTCTATAAGTCA
 TATGAATTGGGGTAATGGGGACAATATATAGTAGAAGATCCTAAGGGGGCTTTAA
 GCGGCCATCCGCACTAATATT

6. Sequência de nucleotídeos do DNA-A do isolado de São Fidelis (RJ) obtido através de clonagem bacteriana (2675 nt)

ACCGGATGGCCGCGCGATTTCCCCCCCCCTACGTGGCGCTCTGGTGGCCGC
 CCGATCCCCCTCCCCGCTCTCGTGGAGCCCCCCCCCGCTCGCGCGATGTTCTCC
 TTTAATTCAAATTAAGGATTTAACTTTTGATCTGACCAATTATAGTGCGCCTGAG
 GAGCTTAGATAACTGTGTTAATACTTGGTCCCTAAGTTTTATGGCCCCCTATAAAA
 CTAAAGCAAGCATGACGTCAGTCTTTAATTGAAATGCCTAAGCGGGATCCCTC
 ATGGCGCCAGATGGCGGGAACCTCAAAGGTAAGCCGCTCTTCTAATTTCTCTCC
 TCGTGGAGGTGGAGGGCCCAAATTCAACAAGGCCTCAGAATGGGTCAACAGGC
 CCATGTACAGGAAGCCCAGGATATATCGGACGTTGAGAACGCCTGATGTTCTTA
 GAGGCTGTGAAGGGCCCTGTAAGGTCCAGTCGTACGAGCAACGTCACGATATC
 TCCCATGTTGGGAAGGTGATGTGTATATCTGATATTACTCGTGGTAACGGTATTA
 CCCACCGTGTAGGTAAGCGTTTTTGTGTTAAGTCTGTGTACATTTTAGGGAAGGT
 GTGGATGGACGAGAACATCAAGCTCAAGAACCACACGAACAGTTGCATGTTCTG
 GTTGGTCAGGGACCGTAGACCGTATGGCACACCTATGGATTTTGGCCAGGTGTT
 CAACATGTTGACAACGAGCCTAGCACTGCAACCGTGAAGAACGACCTGCGTG
 ATCGTTTCCAAGTCATGCATAAGTTCTATGCCAAGGTCACTGGTGGACAGTATG
 CCAGCAACGAGCAGGCGCTGGTCAAGCGTTTCTGGAAGGTCAACAATCATGTG
 GTCTACAATCATCAAGAGGCTGGCAAGTACGAGAATCACACGGAGAACGCATTA
 TTATTGTATATGGCATGTACTCATGCATCTAACCCTGTGTACGCAACGCTCAAGA
 TTCGAATCTATTTCTACGATTCGATCACGAATTAATAAATTTTGAATTTTATTGAAT
 GATTTTCCAGTACATATCTGACATATGATCTGTCAGTCGCAAACGAACAGCTCT
 AATTACATTGTTAATCGTAATAACGCCTAACTGATCTAAATACATCATGACTAATC
 GTCTAAACCTAATCAAATAAGTCGTTCCAGAAGCTGTCAGTGATGTGTCGCCAGA
 CTTGGAAGTTGAGGAATGCCTTGTGGAGACCCAATGCTCTCCTGAGGTTGTGGT

TGAATCGTATCTGTACGTGGTACACTCTGGTCGTTGTGTACAGGAAGTCCTCTA
CGTGGTATATCTTGAAATACAGGGGATTTGTTATCTCCCAGATATAGACGCCATT
CTCTGCCTGAGGCGCAGTGATGAGTTCCCCTGTGCGTGAATCCATGATTGCTGC
AGTTGATGTGGACGTATATGGTGCACCCGCACACTAGATCAATCCTTCTACGGC
GAGTTCCTCTCTTCTTCGCCGCCCTGTGTGCTGGTTTGATAGAGGGGGGAGTC
GAGGAAGATGAATTTAGCATTGTGGAGTGTCCACGACTTTAGACCTGCATTCCC
TTCTTTGTGCGAGGAACCTCTTTATAACTGACTCCCTCCCCAGGATTGCAGAGCAC
GATTGATGGGATCCCACCTTTAATTTGAACTGGCTTTCCGTATTTGCAATTTGAC
TGCCAGTCTTTTTGAGCACCAATCAATTCTTTCCAGTGCTTTAACTTTAGATATTG
GGGTGTGACATCATCAATGACGTTATACTCCACTTCGTTTGAGTAGACCCTTGG
GTTGAAGTCCAGATGTCCACTGAGATAATTATGTGGGCCTAACGCACGAGCCCA
CATCGTCTTCCCTGTCTTGAATCACCTTCGACTATCAAACCTCATAGGTCTCAAC
GGCCGCGCAGCGGAACCCCTCCCAAATAATCATCCGCCCACTCTTGCATCTC
GACGGGAACGTTAGTGAAGGAGGAAAGTGAAAACGGCGGTGTCCATGGCTCCG
GAGCCTTTGAGAAAATCCTATCTAAATTAGAATTTAGATTGTGAACTGAAAAAG
ATATTTCTCAGGCAACTTCTCCCTAATGATTTGGAGAGCCGTGTGTTTATCCGGA
GCATTTAACGCCTCAGCAGCAGCGTCATTAGCTGTCTGTTGACCTCCCCTCGCA
CTTCGTCCGTGACCTGGAATTCCCCCATTCCACTGTATCTCCGTCTTGTGCG
ATGTATGCCTTGACGTCGGAGCTTGATTTAGCTCCCTGAATGTTCCGGATGGAAA
TGTGCTGACCTAGTGGGGGAGACCAGGTGGAACAATCTGTTATTCGTGCATTGG
AATTTCCCTTCGAACTGGAGAAGGACGTGGAGATGAGGCTCCCCATCTTCGTGA
AGCTCTCTGCAGATCTTGATGAATTTCTTGTTACCGGTGTTTTTATGTTAAGAAA
TTGGGAAAGTGTTTCTTCTTTGGTTAACGAACACCGGGGATATGTTATGAAATAG
TTTTTGGCTTTTATACAGAAAGAACCCTTCCGTGGCATTTTTGTAAATAAGGCTG
TGTAACCCCAATAGCTCTCCGCTCTAAACTCATATGAATTGGGGGTACTGGGG
GTACATTTATACTAGAAGTTCCTAAGGCTCTAAATGGGGTACGTGGCGGCCATC
CGTCTAATATT