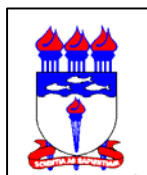


**SARAH JACQUELINE CAVALCANTI DA SILVA**

**DETECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E  
DIVERSIDADE GENÉTICA DE *BEGOMOVIRUS* QUE  
INFECTAM FAVA (*Phaseolus lunatus* L.)**



**UFAL**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
MESTRADO EM AGRONOMIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
RIO LARGO, ALAGOAS  
MARÇO, 2006**



**CECA**

**SARAH JACQUELINE CAVALCANTI DA SILVA**

**DETECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E  
DIVERSIDADE GENÉTICA DE *BEGOMOVIRUS* QUE  
INFECTAM FAVA (*Phaseolus lunatus* L.)**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre à Coordenação do Curso de Mestrado em Agronomia (Área de Concentração em Produção Vegetal), do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas.

Orientação: Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima

**RIO LARGO, ALAGOAS  
MARÇO DE 2006**

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale**

S586d Silva, Sarah Jacqueline Cavalcanti da.  
Detecção, caracterização molecular e diversidade genética de que infectam fava (*Phaseolus lunatus* L.) / Sarah Jacqueline Cavalcanti da Silva. – Rio Largo, 2006.  
xvi, 66 f. : il. tabs., graf.

Orientador: Gaus Silvestre de Andrade Lima.  
Dissertação (mestrado em Agronomia : Produção Vegetal) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2006.

Bibliografia: f. [50]-66.

1. Biologia molecular. 2. Genética molecular. 3. Variabilidade genética.  
4. *Phaseolus lunatus*. 5. Feijão-fava. I. Título.

CDU: 635.651

## TERMO DE APROVAÇÃO

SARAH JACQUELINE CAVALCANTI DA SILVA

2004M21D015S-5

### DETECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *BEGOMOVIRUS* QUE INFECTAM FAVA (*Phaseolus lunatus* L.)

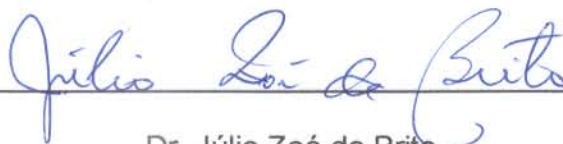
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Curso de Mestrado em Agronomia, Área de Concentração. "Produção Vegetal", do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas, pela seguinte Banca Examinadora:



Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima

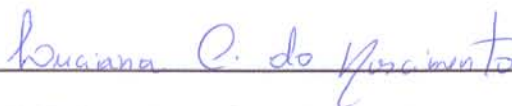
Depto. De Botânica, CCBi - UFAL

Orientador



Dr. Júlio Zoé de Brito

Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária - IPA



Prof.ª. Dr.ª. Luciana Cordeiro do Nascimento

Depto. de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias – UFPB



Iraildes Pereira Assunção

Prof.ª. Dr.ª. Depto. de Fitotecnia e Fitossanidade, CECA - UFAL

RIO LARGO, ESTADO DE ALAGOAS

29 Março de 2006

*Na Idade Média, as pessoas acreditavam que a Terra era plana, porque  
elas tinham ao menos a evidência de seus sentidos;  
Nós acreditamos que ela é redonda não porque um por cento de nós  
pudesse dar razões científicas para uma crença tão fantástica,  
mas porque a ciência moderna nos convenceu de que nada que é óbvio é  
verdadeiro, e que tudo que é mágico, improvável, extraordinário, gigantesco,  
microscópico, cruel ou excessivo é científico.*

**George Bernard Shaw.**

**DEDICO:**

*Aos meus pais: Egildo Pedro da Silva e Ivanete Cavalcanti da Silva, pela dedicação, respeito, confiança, força, suporte e amor e principalmente pelos ensinamentos básicos fundamentais à formação da minha personalidade;*

*Aos meus irmãos: Soraia Jane Cavalcanti da Silva e Eric Henrique Cavalcanti da Silva, pelos momentos felizes de convivência e pela amizade fraternal;*

*A minhas tias e madrinhas: Maria de Lourdes Cavalcanti do Nascimento e Terezinha de Jesus Camelo, pela confiança, apoio e amor que sempre transmitiram a mim;*

## **AGRADECIMENTOS**

*Á Deus, por me dar forças para concluir este trabalho e sempre estar presente na minha vida;*

*A Universidade Federal de Alagoas (UFAL), na pessoa da Coordenadora do Curso de Mestrado em Agronomia;*

*A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL), pelo financiamento concedido;*

*A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iraildes Pereira Assunção por acreditar na minha capacidade de realizar este trabalho, me aceitando como co-orientadora e principalmente pelos ensinamentos, apoio, amizade e confiança creditados a mim;*

*Ao Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima, pessoa por quem tenho uma grande admiração pelo seu empenho profissional. Muito obrigada, pelos conhecimentos, amizade, confiança e principalmente pelo apoio imprescindível para minha permanência aqui;*

*Aos professores que compõem o Curso de Mestrado em Agronomia da Universidade Federal de Alagoas, por contribuírem com minha formação profissional;*

*A Geraldo Lima, Secretário do Curso de Mestrado em Agronomia, por desempenhar sua função com excelência, estando sempre disposto a me ajudar nas inúmeras vezes que dele precisei;*

*Aos meus colegas de laboratório Izael Oliveira da Silva, Angerson de Góes Araújo Casado, Márcia Carine da Silva Barros, Ana Cecília Pires de Azevedo Lopes e Joyce Silva Lima, pela ajuda nos trabalhos de campo e laboratório;*

*A todos do Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias (CECA/UFAL) pelos bons momentos que passamos trabalhando juntos;*

*Aos colegas de turma, pelo companheirismo e experiências trocadas durante a realização do Curso;*

*A Dr<sup>a</sup>. Arlinda Pereira Eloy por ter me recebido tão bem em sua casa;*

*A Muciana Aracely da Silva Cunha, pessoa que eu aprendi a conviver e admirar e de quem vou sentir muita saudade, pela amizade, suporte e todos os momentos de descontração;*

*A Fernando José Palmeira Oliveira (Fernandinho), amigo especial que nunca vou esquecer e de quem vou sentir muita saudade, pela amizade, carinho, cumplicidade, apoio e pelos inúmeros momentos felizes que me proporcionou, tornando a passagem por esta etapa da minha vida menos árdua;*

*A Thelmo Moraes, Janice Sales, Izael Oliveira da Silva, Maria José Cavalcanti da Silva, Jessé Marques da Silva e Kirley Michelly Marques da Silva, pelo apoio, amizade e pelos momentos felizes que passamos juntos;*

*A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho;*



## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	x
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE ABREVIações</b> .....	xiv
<b>RESUMO</b> .....	xvii
<b>ABSTRACT</b> .....	xviii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	04
2.1. Aspectos gerais da cultura da fava.....	04
2.1.1. Origem, classificação e principais características.....	04
2.1.2. Importância Econômica.....	05
2.2. Família Geminiviridae.....	06
2.2.1. Taxonomia , origem e evolução dos geminivírus.....	06
2.2.2. Organização genômica e expressão de proteínas.....	09

2.2.3. Transmissão natural dos geminivírus.....	12
2.2.4. Replicação do genoma dos geminivírus.....	15
2.2.5. Movimento dos geminivírus na planta.....	17
2.2.6. Mecanismos de variabilidade genética em <i>geminivirus</i> .....	18
2.3. <i>Geminivirus</i> em <i>Phaseolus</i> spp.....	20
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>23</b>
3.1. Local de execução.....	23
3.2. Coleta das plantas testadas para infecção por <i>Begomovirus</i> .....	23
3.3. Caracterização Molecular dos Isolados.....	26
3.3.1. Extração do DNA total.....	26
3.3.2. Detecção de geminivírus em plantas de feva e <i>Macroptilium</i> spp. por meio da reação da polimerase em cadeia (PCR).....	27
3.4. Análise da diversidade genética via PCR-RFLP.....	29
3.4.1. Relacionamento filogenético entre isolados virais através dos padrões de restrição PCR-RFLP.....	30
3.5. Seqüenciamento parcial dos isolados virais.....	30
3.5.1. Comparação das seqüências obtidas com outras depositadas no GenBank.....	31
3.5.2. Análise filogenética entre os isolados seqüenciados.....	31
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
4.1. Detecção de <i>Begomovirus</i> via PCR.....	32
4.2. Análise da diversidade genética de <i>Begomovirus</i> através de PCR-RFLP.....	35

4.2.1. Relacionamento filogenético entre os isolados através dos padrões de restrição PCR-RFLP.....	39
4.3. Seqüenciamento parcial dos isolados virais.....	43
4.3.1. Análise filogenética entre os begomovírus seqüenciados.....	45
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>49</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>50</b>

## LISTA DE TABELAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1 -</b> Amostras das plantas com sintomas de infecção por geminivírus e os respectivos municípios de procedência.....	25
<b>Tabela 2 -</b> Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação de fragmentos do genoma do begomovírus caracterizado no presente estudo.....	27
<b>Tabela 3 -</b> Enzimas utilizadas nas digestões dos produtos de PCR do componente A dos begomovírus, seus respectivos sítios de clivagem e temperatura de incubação.....	29
<b>Tabela 4 -</b> Identities entre os isolados de fava geradas pelo alinhamento das seqüências nucleotídicas no programa DNAMAN.....	47

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1 -</b> Representação esquemática do genoma de um <i>Begomovirus</i> . Os círculos representam o genoma viral, dividido em dois componentes, DNA A e DNA B com aproximadamente 2600 nucleotídeos cada. As setas representam a posição dos genes virais e o sentido em que ocorre a transcrição. A região comum (RC) também está indicada.....	09
<b>Figura 2 -</b> Representação esquemática da replicação do genoma de um <i>Begomovirus</i> dentro da célula hospedeira.....	13
<b>Figura 3 -</b> Inseto adulto de <i>Bemisia tabaci</i> .....	15
<b>Figura 4 -</b> Plantas de fava e <i>Macrotium lathyroides</i> exibindo sintomas provocados por begomovírus, coletadas nos municípios de Arapiraca e União dos Palmares, respectivamente. A – vista de uma área de produção de fava com alta incidência da doença. B – detalhe de uma planta fava infectada apresentando sintomas severos de mosaico. C – planta de <i>M. lathyroides</i> apresentando sintomas severos de mosaico.....	24

<b>Figura 5 -</b>	Regiões de anelamento dos primers utilizados na detecção dos <i>Begomovirus</i> .....	28
<b>Figura 6 -</b>	Produtos de PCR amplificados a partir do DNA-A (A) ou do DNA-B (B) de plantas de fava e <i>Macroptilium</i> spp. (A). obtido de plantas de fava e <i>Macroptilium</i> .spp.. KB = 1 KB DNA Plus ladder. (-) e (+)= controles negativo e positivo, respectivamente. As linhas 1 a 13 correspondem às amostras fava e as linhas 14 a 17 às amostras de <i>Macroptilium</i> .spp., conforme Tabela 1.....	33
<b>Figura 7 -</b>	Padrão de restrição obtidos com a clivagem dos produtos de PCR dos diferentes isolados de begomovírus com a enzima <i>Pst</i> I. KB = marcador de peso molecular (1KB Plus DNA ladder). As linhas 1 a 17 correspondem às amostras de fava e <i>Macroptilium</i> spp conforme Tabela 1.....	36
<b>Figura 8 -</b>	Padrão de restrição obtidos com a clivagem dos produtos de PCR dos diferentes isolados de begomovírus com a enzima <i>Rsa</i> I. KB = marcador de peso molecular (1KB Plus DNA ladder). As linhas 1 a 17 correspondem às amostras de fava e <i>Macroptilium</i> spp conforme Tabela 1.....	37
<b>Figura 9 -</b>	Padrão de restrição obtidos com a clivagem dos produtos de PCR dos diferentes isolados de begomovírus com a enzima <i>Hin</i> fl. KB = marcador de peso molecular (1KB Plus DNA ladder). As linhas 1 a 17 correspondem às amostras de fava e <i>Macroptilium</i> spp conforme Tabela 1.....	38
<b>Figura 10 -</b>	Padrão de restrição obtidos com a clivagem dos produtos de PCR dos diferentes isolados de begomovírus com a enzima <i>Taq</i> I. KB = marcador de peso molecular (1KB Plus DNA ladder). As linhas 1 a	

	17 correspondem às amostras de fava e <i>Macroptilium</i> spp conforme Tabela 1.....	39
<b>Figura 11 -</b>	Matriz de similaridade entre os isolados de begomovírus gerada a partir dos diferentes perfis de bandas dos fragmentos de PCR- RFLP. ....	40
<b>Figura 12 -</b>	Árvore filogenética mostrando relações entre os begomovírus baseadas na similaridade dos perfis de bandas de PCR- RFLP.....	42
<b>Figura 13 -</b>	Seqüências das extremidades 5' dos genes <i>Rep</i> e da região comum do DNA-A dos três isolados de begomovírus caracterizados nesse estudo (Fava Maceió, Fava Recife e Fava União dos Palmares). As posições indicadas pela letra N podem indicar qualquer uma das bases, A, G, C, ou T. O "TATA Box" encontra-se sublinhado e a seqüência que forma o "harpin" está em azul, sendo o nonanucleotídeo, ao centro, destacado em itálico.....	44
<b>Figura 14 -</b>	Seqüências depositadas no NCBI que apresentaram maiores identidades com as seqüências dos isolados caracterizados nesse estudo. A, B e C = isolados fava Maceió, fava Recife e fava União dos Palmares, respectivamente.....	46

## LISTA DE ABREVIações

<b>1x</b> –	Uma vez
<b>ACMV</b> -	<i>African cassava mosaic virus</i>
<b>BCTV</b> -	<i>Beet curly top virus</i>
<b>BeYDV</b> -	<i>Bean yellow dwarf virus</i>
<b>BGMV</b> -	<i>Bean golden mosaic virus</i>
<b>BYGMV</b> -	<i>Bean yellow golden mosaic virus</i>
<b>°C</b> –	Graus Celsius
<b>CLCuV</b>	<i>Cotton leaf curl virus</i>
<b>CTAB</b> -	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
<b>DNA</b> –	Ácido Desoxirribonucléico
<b>dNTP's</b> –	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
<b>ECMV</b> -	<i>East african cassava mosaic virus</i>
<b>EDTA</b> –	ethylenediaminetetracetic Acid, Disodium Salt, Dihydrate-Na <sub>2</sub> EDTA
<b>Kb</b> –	Quilobases (1.000 pares de bases)
<b>LBGMV</b> -	<i>Lima bean golden mosaic virus</i>



<b>M</b> –	Molar
<b>MaGMV</b> -	<i>Macrotidium golden mosaic virus</i>
<b>μL</b> –	Microlitros
<b>μM</b> –	Micromolar
<b>μg</b> -	Microgramas
<b>MgCl<sub>2</sub></b> –	Cloreto de magnésio
<b>mL</b> –	Mililitro
<b>mM</b> -	Milimolar
<b>MSV</b> -	<i>Maize streak virus</i>
<b>NaCl</b> –	Cloreto de Sódio
<b>NCBI</b> -	National Center of Biotechnology Informacion
<b>ORF</b> -	Open Read Frame
<b>pb</b> –	Pares de Bases
<b>PCR</b> -	Polymerase Chain Reaction
<b>PVP</b> –	Polyvinylpyrrolidone
<b>RFLP</b> -	Restriction Fragment Length Polymorphysm
<b>RNAse</b> -	Ribonuclease
<b>RPM</b> –	Rotação por minuto
<b>SLCV</b> -	<i>Squash leaf curl virus</i>
<b>Taq</b> –	DNA Polimerase
<b>TE</b> –	Tris-EDTA
<b>TLCrV</b> -	<i>Tomato leaf cumpre virus</i>
<b>TLCV</b> -	<i>Tomato leaf curl virus</i>
<b>TobYDV</b> -	<i>Tobacco yellow dwarf virus</i>

- TPCTV -** *Tomato pseudo-curly top virus*
- Tris –** Tris (hidroximetil) aminometano
- TYLCV** *Tomato yellow leaf curl virus*
- U –** Unidade
- UPGMA -** Unweighted paired group method of analysis
- UV –** Ultra violeta
- V -** Volts

## RESUMO

---

A fava (*Phaseolus lunatus* L.) está entre as quatro espécies de leguminosas de grãos mais importantes no Brasil. A ocorrência de doenças tem dificultado o cultivo e afetado a qualidade dos grãos dessa cultura. Entre as doenças mais importantes, estão as viroses, destacando-se aquelas ocasionadas por *Geminivirus*. A alta severidade das doenças causadas por geminivírus, deve-se principalmente à ausência de variedades resistentes ao patógeno e também ao aumento populacional de um novo biótipo (biótipo B) do inseto vetor, vulgarmente denominado, "mosca branca" (*Bemisia tabaci*). Este biótipo transmite o vírus mais eficientemente e apresenta uma gama de hospedeiros mais ampla do que o biótipo A. O presente trabalho teve como objetivos principais a detecção, caracterização molecular e a análise da diversidade genética de isolados de *Begomovirus* que infectam plantas de fava no Estado de Alagoas e Pernambuco. A detecção foi realizada mediante a técnica de PCR utilizando como molde o DNA extraído de plantas com sintomas de infecção por geminivírus, coletadas em sete municípios de Alagoas e em um de Pernambuco. Foi diagnosticada infecção por *Begomovirus* em dezessete amostras coletadas. A análise da diversidade genética, baseada em PCR-RFLP, demonstrou que existe diversidade entre os isolados de begomovírus que estavam infectando estas plantas. A partir das diferenças nos padrões de bandas gerados através da PCR-RFLP, foram escolhidos três isolados (Fava Maceió, Fava Recife e Fava União dos Palmares), para fins de seqüenciamento. A comparação das seqüências obtidas, com outras seqüências depositadas do GenBank/NCBI permitiu a classificação desses isolados como *Bean golden mosaic virus*, sendo este o primeiro relato de infecção por esta espécie em plantas de fava, nos estados de Alagoas e Pernambuco.

Palavras chave – PCR, RFLP, variabilidade genética, *Phaseolus lunatus*, Geminiviridae.

## ABSTRACT

---

Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) is one of the four major important grain legumes in Brazil. The occurrence of diseases has diffculted its culture and has affected grain quality of this crop. Among the most important diseases are the viruses, especially those generated from *Geminivirus*. The high severity of the Geminiviruses diseases is especially due to both the absence of pathogen resistance varieties and increase in the population of a new biotype (biotype B), of the insect vector, commonly named “whitefly” (*Bemisia tabaci*). This biotype transmitis the virus more efficiently and it presents a host range larger than biotype A. The present estudy objected the detection, molecular characterization and analisys of the genetic diversity of *Begomovirus* isolates that infects lima bean plats in Alagoas and Pernambuco States. The detection was realized by PCR technique utilizing as a mold DNA extracted from plants presenting symptoms of geminivirus infection which were colleted from seven locations of Alagoas and one of Pernambuco. It was identified *Begomovirus* infection in seventeen collected samples. The analisys of genetic diversity, based in PCR-RFLP, revealed that exists diversity among the isolates of Begomovirus that were infecting these plants. According to differences in the patterns of bands generated by PCR-RFLP, it was chosen three isolates (fava Maceió, fava Recife and fava União dos Palmares), in an attempt to sequence analysis. The comparison of the obtained sequences with other deposited in GenBank/NCBI allowed the classification of these isolates as *Bean golden mosaic virus*, the last one being the first report of infection caused this species in lima bean plants in Alagoas and Pernambuco State.

Key words – PCR, RFLP, genetic variability, *Phaseolus lunatus*, Geminiviridae.

## 1. INTRODUÇÃO

---

A fava (*Phaseolus lunatus* L.), também conhecida como feijão-lima ou feijão fava, é uma das quatro espécies do gênero *Phaseolus* exploradas comercialmente (SANTOS *et al.*, 2002). No Brasil, a fava constitui uma cultura de relevante importância social, representando fonte de proteínas para pequenos agricultores, além de atingir relativa importância econômica em alguns Estados. No ano de 2004, foram produzidas, no país, 13.897 toneladas de grãos secos de fava, numa área plantada de 37.241 ha (IBGE, 2004). Com destaque para a Região Nordeste, onde se concentram 35.858 ha de área cultivada com esta leguminosa, tendo os Estados da Paraíba e Ceará como os maiores produtores. Em Alagoas, a área cultivada com fava é de 356 ha, com uma produção de 115 toneladas, sendo os municípios de União dos Palmares e Santana do Mundaú os que apresentam as maiores produções (IBGE, 2004).

O emprego de baixa tecnologia (SANTOS *et al.*, 2002) e a ocorrência de doenças tem dificultado o cultivo e afetado a qualidade dos grãos dessa cultura. Entre as doenças mais importantes estão as viroses, principalmente aquelas ocasionadas por geminivírus (Família Geminiviridae) (LIMA *et al.*, 2001b). As plantas infectadas apresentam um intenso mosaico amarelo, distorção foliar e redução do porte, o que

resulta em uma drástica redução da produtividade. Em Alagoas essa doença é conhecida popularmente como “papa-ovo” (LOPES et al., 2004).

A família Geminiviridae é constituída por quatro gêneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus* (VAN REGENMORTEL et al., 2000), com base na organização genômica (genoma com um ou dois componentes), tipo de inseto vetor (cigarrinha ou mosca-branca), gama de hospedeiras (mono ou dicotiledôneas) e relacionamento filogenético. Os três primeiros gêneros são compostos por vírus com genoma formado por um único componente, ao passo que os vírus pertencentes ao gênero *Begomovirus* possuem, na grande maioria das vezes, genoma bisegmentado. Dentro de cada gênero vários parâmetros podem ser utilizados para separação em espécies, mas a seqüência da extremidade 5´ do gene que codifica para capa protéica é considerada o principal critério (PADIDAM et al., 1995; MAYO & PRINGLE, 1997; FARIA et al., 2000).

O gênero *Begomovirus* conta com o maior número de espécies e é considerado o mais importante (FARIA et al., 2000; FREITAS-ASTÚA et al., 2002). Neste, estão classificados os geminivírus transmitidos por mosca-branca, que infectam dicotiledôneas e que comumente apresentam genoma bipartido (VAN REGENMORTEL et al., 2000). Severas infecções causadas por *Begomovirus* em várias culturas importantes, como tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), melão (*Cucumis melo* L.), pimentão (*Capsicum annuum* L.) e caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) têm sido descritas (FARIA et al., 2000; MORALES & ANDERSON, 2001). Entre os exemplos de *Begomovirus* economicamente importantes, estão o vírus do mosaico dourado do feijoeiro (*Bean golden mosaic virus*, BGMV), o vírus do mosaico da mandioca (*African cassava mosaic virus*, ACMV) e o vírus do enrolamento amarelo das folhas do tomateiro (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) (ZERBINI et al. 2002).

Aparentemente, o aumento da incidência das viroses ocasionadas por *Begomovirus* está mais relacionado ao surgimento e disseminação de um novo biótipo (biótipo B) do inseto vetor (mosca-branca - *Bemisia tabaci*) que a fatores intrínsecos aos vírus (ZERBINI et al, 2002). O biótipo B transmite o vírus mais eficientemente e

apresenta uma gama de hospedeiras maior que o biótipo A. Além disso, as populações resistentes a inseticidas são mais rapidamente selecionadas no biótipo B.

A identificação e caracterização de geminivírus baseada apenas na sintomatologia não são possíveis, uma vez que os sintomas variam de acordo com as condições do ambiente, idade da planta hospedeira e ocorrência de infecções mistas envolvendo duas ou mais espécies virais (PAPLOMATAS *et al*, 1994). A diagnose de geminivírus por meio da sorologia é dificultada pelo fato desses vírus atingirem baixas concentrações nas plantas, dificultando a purificação de vírions para a produção de antissoros. Os métodos mais eficientes para a diagnose são a reação da polimerase em cadeia (PCR), utilizando oligonucleotídeos universais desenhados por ROJAS *et al.* (1993), e a hibridização de ácidos nucléicos, utilizando como sonda fragmentos clonados do DNA viral (GILBERTSON *et al.*, 1991).

A utilização dessas técnicas têm permitido a realização de estudos de variabilidade genética, epidemiologia, além de fornecer suporte a programas de melhoramento genético de espécies cultivadas. Apesar da fava ter merecido pouca atenção, por ter seu cultivo limitado a pequenos produtores, já há relatos de infecção por um *Begomovirus* denominado *Lima bean golden mosaic virus* (LBGMV) o qual foi detectado, por FARIA & MAXUELL (1999), em Caruaru, Pernambuco.

Lopes *et al* (2004), já havia relatado infecção por *Begomovirus* em fava no estado de Alagoas, contudo a espécie do vírus que estava causando a sintomatologia não foi determinada. Dessa forma, presente trabalho teve como objetivos principais a detecção, a caracterização molecular e a análise da diversidade genética de *Begomovirus* que infectam plantas de fava no Estado de Alagoas e Pernambuco.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

---

### 2.1. Aspectos gerais da cultura da fava

#### 2.1.1. Origem, classificação e principais características

A fava (*Phaseolus lunatus* L.) é uma cultura amplamente distribuída através da América Tropical, encontrada especialmente em solos de baixa fertilidade da maioria das áreas úmidas (YAGUIU *et al.*, 2003). Originária da América Central e do Sul sua domesticação parece ter ocorrido em ambos locais (SAUER, 1993; ZIMMERMANN & TEIXEIRA, 1996). A primeira domesticação ocorreu no noroeste da América do Sul e produziu uma grande variedade desta espécie. Evidências para esta domesticação vieram de um sítio arqueológico Peruano (Caverna Guitarrero), onde foram encontrados grãos de fava que dataram de 6500 AC, 1000 anos antes que grãos de feijão (*Phaseolus vulgaris*) fossem encontrados no mesmo local e ainda antes do milho (*Zea mays*). As variedades Sieva Bean, Butter Bean e Baby Lima Bean foram originadas da



segunda domesticação a qual ocorreu na América Central, provavelmente na Guatemala. Embora a mais nova evidência arqueológica seja do México onde os grãos dataram de ao menos 800 DC (SAUER, 1993).

Também conhecida por feijão-fava, feijão-de-lima, fava-de-lima, a fava, é uma leguminosa pertencente à família Fabaceae ou Leguminosae. Fabaceae é uma das maiores famílias botânicas, de ampla distribuição geográfica e de importância econômica por apresentar espécies produtoras de alimentos como soja (*Glycine Max*), ervilha (*Pisum sativum*), alfafa (*Medicago sativa*) e feijão (*Phaseolus vulgaris*) (McCLEAN *et al.*, 2005). A família Fabaceae é subdividida em três subfamílias, sendo *Phaseolus* um membro da subfamília Papilionoideae. Esta é a maior subfamília, consistindo de 476 gêneros (LEWIS *et al.*, 2003).

De acordo com CASTINEIRAS (1991), são reconhecidos três grupos de fava baseados na forma e peso de 100 sementes, os quais são chamados como “papas” (sementes pequenas, com 35 a 50 g para 100 sementes), “sieva” (sementes médias e planas, com 50 a 70 g pra 100 sementes) e “big lima” (sementes grandes, com 70 a 110 g para 100 sementes). No Brasil, estudos realizados por YAGUIU *et al.*, (2003) e SANTOS *et al.*, (2002), com objetivo de distinguir variedades de fava através dos caracteres morfológicos, obedeceram às seguintes variáveis: hábito de crescimento, comprimento e largura de vagens, comprimento, largura e espessura da semente e peso de 100 sementes, coloração do hipocótilo, da flor e da semente (branca, amarela, vermelha, violeta, preta e rajada).

### **2.1.2. Importância econômica**

A fava é uma das quatro espécies do gênero *Phaseolus* exploradas comercialmente (SANTOS *et al.*, 2002). Acredita-se que as principais razões para o cultivo relativamente limitado da fava seja a tradição do consumo de feijão-comum, o paladar da fava e o seu tempo de cocção mais longo, além da falta de variedades adaptadas às condições da região (LYMMAN, 1983).

Nos Estados Unidos, um dos maiores produtores de fava do mundo, o seu consumo ainda em estado verde, na forma de conserva é muito apreciado, superando o consumo na forma de grãos secos. No Brasil, o consumo é preferencialmente na forma de grãos verdes cozidos (VIEIRA, 1992).

A fava é cultivada em quase todo território nacional, atingindo relativa importância econômica, principalmente na região Nordeste, destacando-se os estados da Paraíba e Ceará como os maiores produtores (IBGE, 2004). É uma das alternativas de renda e alimento para a população da região Nordeste, sendo cultivada por pequenos produtores que utilizam principalmente cultivares de crescimento indeterminado (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

A baixa produtividade de fava pode ser atribuída ao fato de parte da produção ser oriunda de pequenos produtores, em consórcio, sem adoção de tecnologia que vise seu aumento (SANTOS *et al.*, 2002); além da ocorrência de doenças que tem dificultado o cultivo e afetado a qualidade dos grãos. Entre as doenças mais importantes estão às viroses, principalmente aquelas ocasionadas por *Geminivirus*. As plantas infectadas apresentam um intenso mosaico amarelo e têm a produtividade drasticamente reduzida. LOPES *et al.* (2004) detectou a presença do vírus nos municípios de Maceió, Rio Largo e São Miguel dos Campos, sendo a doença popularmente conhecida como “papa ovo”.

## 2.2. Família Geminiviridae

### 2.2.1. Taxonomia, origem e evolução dos geminivírus

A família *Geminiviridae* é constituída atualmente por 110 espécies (NCBI, 2006) sendo os geminivirus classificados em quatro gêneros, *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus* e *Topocuvirus*, dependendo da organização genômica, gama de hospedeiros e tipo de inseto vetor (FAUQUET *et al.*, 2003).

Os três primeiros gêneros são compostos por vírus com genoma formado por um único componente, ao passo que os vírus pertencentes ao gênero *Begomovirus*

possuem genoma bisegmentado, na maioria das vezes. Dentro de cada gênero vários parâmetros podem ser utilizados para separação em espécies, sendo a seqüência da extremidade amino do gene que codifica para a capa protéica (Cp) um dos principais critérios (MAYO & PRINGLE, 1997; FARIA *et al.*, 2000).

De acordo com o VII relatório do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), a classificação atual dos gêneros está descrita da seguinte forma: Os geminivírus que tem genoma monopartido e são transmitidos por cigarrinhas (Homoptera: *Cicadellidae*) a plantas monocotiledôneas (com exceção do *Tobacco yellow dwarf virus* (TobYDV) e do *Bean yellow dwarf virus* (BeYDV), que infectam dicotiledôneas), estão incluídos no gênero *Mastrevirus*, o qual *Maize streak virus* (MSV) é a espécie tipo. Já os vírus que apresentam genoma monopartido e são transmitidos por cigarrinhas a plantas dicotiledôneas, pertencem ao gênero *Curtovirus*, sendo o membro típico, *Beet curly top virus* (BCTV). O gênero *Topocuvirus*, recentemente reconhecido pelo ICTV, é composto por um único membro, *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV), o qual apresenta genoma monopartido e é transmitido por cigarrinha (Homoptera: *Auchenorrhyncha*) a plantas dicotiledôneas (VAN REGENMORTEL *et al.*, 2000; FAUQUET *et al.*, 2003).

O gênero *Begomovirus*, inclui vírus que apresentam genoma bipartido (com exceção do *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), monopartido) e são transmitidos por mosca branca (*Bemisia tabaci* (Genn.)) para plantas dicotiledôneas e que tem *Bean golden mosaic virus* (BYGMV) (originalmente *Bean golden mosaic virus* – Porto Rico) como espécie tipo (FAUQUET *et al.*, 2003). Cada componente genômico, com aproximadamente 2,6 kb é encapsidado separadamente em partículas geminadas, sendo necessárias às duas moléculas de DNA para que a infecção ocorra (FARIA *et al.*, 2000). Dentre os geminivírus o gênero *Begomovirus* é aquele que conta com o maior número de espécies, apresenta maior gama de hospedeiros e é o mais disseminado (FREITAS-ÁSTUA *et al.*, 2002). O gênero inclui os mais importantes vírus de regiões tropicais e subtropicais, como o BGMV, o vírus do mosaico da mandioca da África (*African cassava mosaic virus*, ACMV) e o TYLCV (FARIA *et al.*, 2000).

Sobre a origem geminivírus, a hipótese mais aceita é aquela que propõe a origem a partir de bacteriófagos, como  $\Phi$ X174, e de plasmídeos bacterianos com

genoma composto de DNA fita simples (ssDNA) (KOONIN & ILYINA, 1992). Esta hipótese é baseada na similaridade entre seqüências e em processos como o mecanismo de círculo rolante utilizado na replicação do genoma destes organismos. Além disso, já foi demonstrado que o promotor da proteína capsidial dos geminivírus é funcional em *Escherichia coli* (PETTY *et al.*, 1986) e que o TLCV (*Tomato leaf curl virus*) é replicado eficientemente em *Agrobacterium tumefaciens* (RIDGEN *et al.*, 1996). Estas observações fornecem evidências para a teoria de que estes vírus com genoma composto por ssDNA circular evoluíram a partir de replicons epissomais de células procarióticas (FARIA & ZERBINI, 2000).

O relacionamento observado entre alguns vírus pertencentes a gêneros distintos dentro da família *Geminiviridae*, indica que a evolução desses vírus pode ocorrer via recombinação/rearranjo entre vírus distintos. De fato, eventos de recombinação já foram demonstrados *in vivo*, o que sugere um mecanismo adicional para a rápida evolução dos geminivírus (HOU & GILBERTSON, 1996). PADIDAM *et al.* (1995), sugeriu que os geminivírus derivaram de um ancestral comum a partir do gênero *Mastrevirus*. Tal ancestral infectava monocotiledôneas, tinha apenas um componente genômico e era transmitido por cigarrinhas. Uma vez que um *Mastrevirus* ancestral originou as outras espécies de geminivírus, as espécies deste gênero apresentam uma maior variabilidade genética. TobYDV e BeYDV, que são *Mastrevirus*, adquiriram a capacidade de infectar dicotiledôneas. Semelhantemente, houve mudanças na proteína capsidial (CP) para adquirir a capacidade de transmissão por moscas-brancas, e ainda mais tarde na escala evolutiva, a aquisição do segundo componente genômico. O BCTV e TYLCV possuem características em comum com os *Mastrevirus* e os *Begomovirus*, sendo considerados recombinantes entre vírus pertencentes aos dois gêneros. Um outro evento de recombinação foi identificado para o TPCTV, recentemente classificado no novo gênero *Topocuvirus* (VAN REGENMORTEL *et al.*, 2000). Este vírus surgiu provavelmente da recombinação entre uma espécie do gênero *Begomovirus* e um outro vírus também recombinante, o que sugere que outros geminivírus não relacionados com vírus pertencentes aos quatro gêneros hoje reconhecidos possam estar presentes no campo (FARIA & ZERBINI, 2000).

## 2.2.2. Organização genômica e expressão de proteínas

O genoma de um *Begomovirus* típico é formado por duas moléculas de DNA circular de fita simples (DNA A e DNA B), cada uma com aproximadamente 2600 bases, encapsidadas por uma única proteína estrutural que se arranja na forma de 22 capsômeros, formando dois icosaedros incompletos com cerca de 18x30 nm (LAZAROWITZ, 1992; BRIDDON & MARKHAM, 1995). O componente A é responsável pela replicação e encapsidamento do genoma viral, enquanto o componente B contém os genes requeridos para o movimento célula a célula e a longa distância, gama de hospedeiros e desenvolvimento de sintomas (TIMMERMANS *et al.*, 1994). Ambos os componentes são necessários para causar infecção sistêmica das plantas. Os componentes A e B são similares no tamanho, mas diferem na homologia de seqüência exceto por uma Região Comum (RC) de 200 a 250 pb, que é quase idêntica nos dois componentes (PILARTZ & JESKE, 2003). A RC, entretanto, é altamente conservada para cada espécie viral, normalmente acima de 90% de identidade, (LAZAROWITZ, 1992). O esquema da organização genômica de um *Begomovirus* bipartido está ilustrado na figura 1.

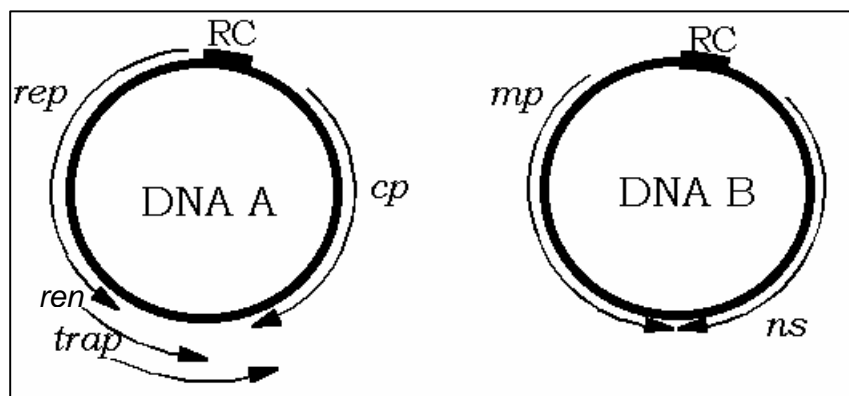


Figura 1. Representação esquemática do genoma de um *Begomovirus*. Os círculos representam o genoma viral, dividido em dois componentes, DNA A e DNA B com aproximadamente 2600 nucleotídeos cada. As setas representam à posição dos genes

virais e o sentido em que ocorre a transcrição. A região comum (RC) também está indicada.

A RC é parte de uma grande região intergênica que contém a origem de replicação e os diferentes promotores da síntese de RNA polimerase II virais (FONTES *et al.*, 1994b; PILARTZ & JESKE, 2003). Dentro da região comum localiza-se uma seqüência de nove nucleotídeos (5'-TAAATATTAC-3') conservada entre todos os geminivírus, onde se localiza o domínio funcional da origem de replicação (OROZCO & HANLEY-BOWDOIN, 1996). Este nonanucleotídeo é clivado durante o início da replicação viral e se localiza num contexto de 30 nucleotídeos capazes de formar uma estrutura em forma de grampo. Embora a seqüência de 30 nucleotídeos varie entre espécies de geminivírus, a estrutura em forma de grampo está sempre presente, sendo assim considerada um elemento conservado estruturalmente (FARIA & ZERBINI, 2000). A partir desta região intergênica divergem os genes virais, no sentido viral e complementar (HOWARTH *et al.*, 1985). A transcrição é bidirecional tanto no componente A, quanto no componente B (FARIA *et al.*, 2000).

No DNA A, apresenta uma ORF, AV2, no sentido viral, a qual corresponde ao gene *cp* codificando a proteína capsidial (CP) e três ORF's (AC1, AC2 e AC3) no sentido complementar correspondentes aos genes *rep*, *trap* e *ren*, as quais codificam respectivamente para a proteína associada à replicação (REP), a proteína ativadora da transcrição (TrAP) e a proteína que amplifica a replicação do genoma viral (REN) (HARRISON & ROBINSON, 1999; FARIA & ZERBINI, 2000).

A capa protéica (CP) desempenha funções relacionadas com a proteção do genoma contra degradação, aquisição e transmissão do vírus pelos insetos vetores, infectividade e movimento sistêmico (GUEVARA-GONZÁLEZ *et al.*, 1999). A CP é essencial para a transmissão e determina a especificidade do inseto vetor (HÖFER *et al.*, 1997). A importância da capa protéica na transmissão dos geminivírus foi demonstrada em experimentos envolvendo a troca do gene *cp* de um vírus transmitido por mosca-branca (ACMV) pelo correspondente do BCTV transmitido por cigarrinhas; observou-se uma mudança na especificidade do vetor, o ACMV passou a ser transmitido por cigarrinha (BRIDDON *et al.*, 1996; KARNOPP *et al.*, 2001). Também tem sido proposto que CP é necessária para o movimento sistêmico de geminivírus

bipartidos em hospedeiros os quais o vírus não está bem adaptado (SINESTERRA *et al.*, 1999).

A proteína REP é uma enzima que apresenta propriedades de ligação a ácidos nucleicos e de endonuclease (FONTES *et al.*, 1994a) Apesar de não ser uma DNA polimerase, REP é a única proteína essencial para a replicação do genoma viral (HANLEY-BOWDOIN *et al.*, 1990). A replicação do DNA viral é realizada por enzimas do hospedeiro. A função de REP é se ligar ao sítio de iniciação da replicação viral e cortar uma das fitas de DNA, iniciando o processo (LAUFS *et al.*, 1995). O sítio de ligação para REP está localizado na região comum (RC), sendo requerido não só para o reconhecimento da origem de replicação, mas também para a regulação negativa da transcrição do gene *rep* (EAGLE *et al.*, 1994). Uma outra função da proteína REP é a de induzir, indiretamente, a expressão de proteínas responsáveis pela síntese de DNA do hospedeiro em células totalmente diferenciadas, criando um ambiente que permite uma eficiente replicação viral (NAGAR *et al.*, 1995).

A proteína TRAP é um fator de transcrição, que atua *in trans* nos promotores dos genes de sentido viral (*cp* e *ns*). Portanto os transcritos correspondentes a estes genes só são observados na célula após a expressão de TrAP . O produto do gene *ren* é um fator de amplificação da replicação viral. Embora não seja essencial para que a replicação ocorra, na presença da proteína REN o acúmulo de DNA viral é muito maior (FARIA & ZERBINI, 2000).

O componente B possui duas ORF's: uma no sentido viral (BV1 correspondendo ao gene *ns*) que codifica para a proteína que controla o tráfico nuclear (Ns – “nuclear shuttle”) e outra no sentido complementar (BC1 correspondendo ao gene *mp*) que codifica para a proteína que controla o movimento célula-a-célula (*Mp* “movement protein”) (PALMER e RYBICKI, 1998). A proteína Ns é necessária para o tráfego intracelular de DNA viral do núcleo para o citoplasma, enquanto a *Mp* está envolvida no movimento do DNA viral célula-a-célula.

Os isolados que apresentam apenas um componente não possuem DNA B e suas ORFs são denominadas, respectivamente, V1, V2, C1, C2, C3 e C4. Apesar de não apresentarem DNA B, estes vírus não apresentam comprometimento do movimento nem da infectividade. Nestes casos, os produtos das ORFs V1 e C4 são

responsáveis pelo movimento e desenvolvimento de sintomas (FARIA & ZERBINI, 2000; ZERBINI et al., 2002).

### 2.2.3. Transmissão natural dos geminivírus

Os *Geminivirus* não são transmitidos via sementes ou por contato manual. Portanto, a única forma de dispersão desses vírus na natureza, ocorre via vetor (DHAR & SINGH, 1995). Os vetores de geminivírus são insetos sugadores classificados na ordem Hemiptera, subordem Homoptera, incluindo as moscas-brancas (*Aleyrodidae*) e as cigarrinhas (*Cicadellidae* e *Auchenorrhynca*) (LAZAROWITZ et al., 1992; VILLAS BÔAS et al., 1997). No caso dos begomovírus, a transmissão é realizada por mosca-branca (*Bemisia tabaci*), que se trata de uma espécie cosmopolita, cujo centro de origem supõe-se ser o Oriente ou o Paquistão, tendo sido introduzida na Europa, África e Américas, pelo homem, através de material vegetal (BROWN & BIRD, 1992 ; MELO, 1992). A mosca-branca é encontrada geralmente nos trópicos e subtropicais e em todos os continentes (FRANÇA et al., 2000). Sua distribuição está estreitamente relacionada à expansão da monocultura da maioria das espécies cultivadas, às condições dos sistemas agrícolas moderno, ao aumento da utilização de agrotóxicos e, principalmente, à grande facilidade em se adaptar aos diversos hospedeiros (BROWN et al., 1993).

Moscas-brancas são insetos diminutos, medindo de 1 a 2mm, sendo as fêmeas maiores (NATESHAN et al., 1996). Os adultos da mosca-branca têm o dorso de cor amarelo pálido e asas brancas (Figura 2). Como suas asas cobrem quase todo o corpo, a cor predominante é o branco, daí ser erroneamente denominada de mosca-branca (FRANÇA et al., 2000). Seu ciclo de vida compreende quatro fases (ovo, ninfa, pupa e adulto) e sofre influência das condições climáticas e ambientais, principalmente pela temperatura, umidade relativa do ar e planta hospedeira (NAVA-CAMBEROS et al., 2001). Quanto mais quente e seco o clima, menor é a duração entre a fase de ovo e a de adulto. Numa temperatura de 25°C, o ciclo dura 27 dias e este período aumenta quatro vezes numa temperatura de 14°C. As fêmeas podem ovipositar de 130 a 300 ovos, durante o ciclo dependendo da planta hospedeira e temperatura. (FRANÇA, et al., 2000; GUTIERREZ & FERRARI, 2002). A mosca-branca pode produzir até quinze



gerações por ano, em uma ou mais espécies hospedeiras (FERREIRA & ÁVIDOS, 1998).



Figura 2. Inseto adulto de *Bemisia tabaci*

A mosca-branca é considerada uma das mais importantes pragas da agricultura (OLIVEIRA *et al.*, 2001), e de acordo com SHUSTER *et al.* (1996), o complexo *Bemisia* spp. pode transmitir cerca de 44 viroses às plantas cultivadas.

Até por volta de 1991 era conhecido no Brasil apenas o biótipo A de *B. tabaci*, quando então ocorreu a introdução do biótipo B. Inicialmente acreditou-se que esse biótipo representasse uma nova espécie, que foi denominada *B. argentifolli*. Posteriormente, a análise de seqüências de aloenzimas e DNA, complementados por avaliações morfológicas e ensaios de cruzamento e comportamento de acasalamento intra e interespecífico demonstraram que as diferenças entre essas duas espécies não eram claras o bastante para uma distinção precisa (BELLOWS *et al.* 1994; FRANÇA *et al.*, 1996).

De acordo com BEDFORD *et al.* (1994), as fêmeas do biótipo B de *Bemisia tabaci* apresentam maiores taxas de oviposição, mortalidade baixa em novos hospedeiros e gama de hospedeiros maior que o biótipo A. Essas características fazem

com que o biótipo B predomine em regiões onde anteriormente predominava o biótipo A. Apesar da introdução dessa variante do inseto no Brasil ser recente (FERNANDES, 2001), o biótipo B tem se dispersado nos campos rapidamente, sendo considerada a espécie de mosca branca que comumente devasta os cultivos agrícolas na várias regiões geográficas do país (VILLAS-BÔAS *et al.*, 1999).

A modalidade de transmissão de begomovírus por moscas brancas, é do tipo circulativa não propagativa (BRONW, 1997; GHANIM *et al.*, 1998; MORIN *et al.*, 1999). Nesta o vírus circula na hemolinfa, mas não replica no vetor, envolvendo a passagem de partículas virais do intestino para a hemolinfa do inseto, da hemolinfa para as glândulas salivares e destas para outras plantas. Apenas para o caso do TYLCV existem evidências de replicação viral no inseto (GHANIM *et al.*, 1998). Ainda não há evidências de transmissão transovariana de *Begomovirus* (FARIA *et al.*, 2000).

Nas relações do vetor-vírus, há uma possível correlação entre a duração do período de aquisição e o de inoculação com a probabilidade de transmissão. Um período latente, ainda que curto, ocorre após a alimentação de aquisição até o vetor torna-se capaz de inocular novas plantas (KARNOPP, 2001). O período de retenção ou persistência do vírus no vetor é relativamente longo, algumas semanas ou por toda vida do inseto, já que este permanece virulífero depois das ecdises. As características da transmissão desses vírus são muito semelhantes, exceto talvez no que se refere ao período de persistência. Os vírus são adquiridos pelos insetos em períodos tão curtos quanto 10 minutos, mas a probabilidade de transmissão aumenta com o aumento dos tempos de alimentação na fonte de vírus, até 24h. Igual período mínimo de inoculação é suficiente, mas, a probabilidade de transmissão é maior com tempos mais prolongados de alimentação nas plantas-teste (LIU *et al.*, 1997a; COSTA, 1998b).

Segundo SANTOS *et al.* (2003), a relação entre os *Begomovirus* e a mosca branca, incluindo diversas características de transmissão do vírus pelo vetor, como período de aquisição, de inoculação, de latência, de retenção, passagem transovariana, entre outros, já foram estudados em alguns países, envolvendo begomovírus de curcubitáceas, como *Squash leaf curl virus* (SLCV) (COHEN *et al.*, 1989), de algodão como o *Cotton leaf curl virus* (CLCuV) (NATESHAN *et al.*, 1996) e de tomate, principalmente o *Tomato yellow leaf curl virus* (PICÓ *et al.*, 1996; GHANIM *et al.*, 1998;

MUNIAPPA *et al.*, 2000). Os estudos mostraram que estas características de transmissão variam de acordo com a estirpe viral envolvida, à região geográfica e as condições de cada pesquisa.

### 2.2.4. Replicação do genoma dos *geminivirus*

A replicação do genoma dos *Begomovirus* ocorre no núcleo das células infectadas e depende totalmente do sistema enzimático de seu hospedeiro. Segundo LAUFS *et al.* (1995), o processo de replicação (Figura 3) pode ser dividido nos três seguintes passos:

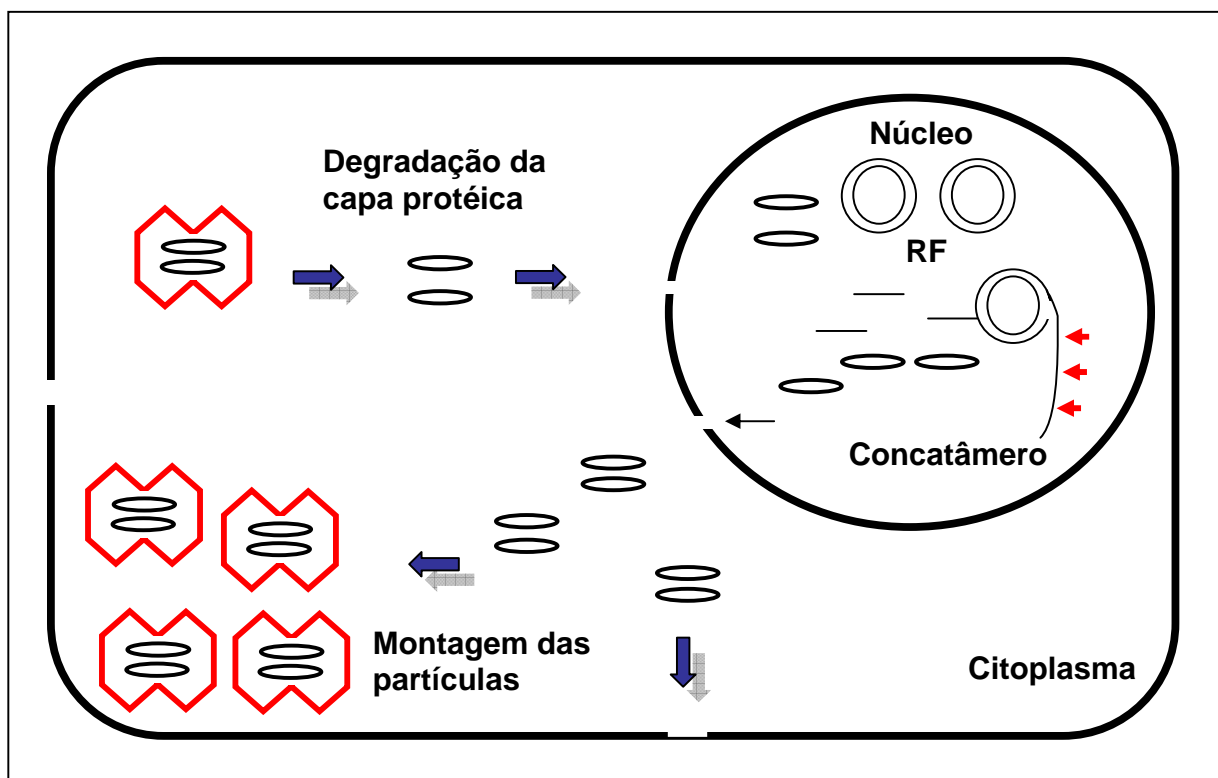


Figura 3. Representação esquemática da replicação do genoma de um *Begomovirus* dentro da célula hospedeira.

O inseto vetor ao se alimentar, deposita as partículas virais (dsDNA) nas células floemáticas do hospedeiro. A presença das partículas virais ativa o sistema enzimático do hospedeiro que libera enzimas (proteases) as quais degradam a capa protéica expondo o genoma viral. O genoma viral será transportado até o núcleo com auxílio da

proteína de tráfego nuclear (Ns). No núcleo ocorre o primeiro passo do processo que é a síntese de uma fita complementar de DNA, gerando um intermediário de fita dupla, denominado “forma replicativa” (RF), utilizando um mecanismo de círculo rolante semelhante ao utilizado pelos bacteriófagos  $\Phi$ X174 e M13 (STANLEY, 1995). Esse processo deve ser realizado por enzimas do hospedeiro, já que os vírions não possuem proteínas com função de polimerase de DNA. O RF serve como molde para a síntese dos mRNAs virais, e está presente em células infectadas em concentração superior à do próprio DNA genômico. Os mRNAs possuem um poli-A, o que sugere que a transcrição é mediada pela RNA polimerase II do hospedeiro. Quatro mRNAs são sintetizados a partir do componente A. Três desses mRNAs possuem seqüência complementar à do DNA genômico, e um mRNA possui seqüência equivalente à do DNA genômico, Ou seja, as duas fitas do RF servem como molde para a transcrição. O mesmo ocorre com o componente B do genoma, a partir do qual dois mRNAs são gerados, um a partir de cada fita de DNA do RF. No segundo passo a fita complementar de DNA serve molde para a síntese de várias cópias do DNA genômico, que forma uma longa fita simples de DNA linear contendo vários genomas unitários (concatômero). O terceiro passo é a clivagem do concatômero, gerando monômeros (DNA's genômicos) que serão ligados gerando moléculas circulares de ssDNA correspondentes ao genoma viral, as quais por sua vez serão encapsulados formando os vírions (TIMMERMANS *et al.*, 1994 ; LAUFS *et al.*, 1995).

Os *Begomovirus*, como os outros fitovírus, infectam células vegetais diferenciadas, nas quais não ocorre nova síntese de DNA. Entretanto, utilizam enzimas envolvidas na replicação do DNA da planta. Dessa forma, o vírus deve ser capaz de ativar a transcrição dos genes do hospedeiro envolvidos na síntese dessas proteínas, que não estão presentes em células diferenciadas (FARIA & ZERBINI, 2000).

Uma outra etapa do ciclo infeccioso, relacionada com a manifestação dos sintomas é o movimento célula-a-célula. Plantas transgênicas expressando a proteína MP de *Begomovirus* freqüentemente apresentam sintomas de infecção viral. Provavelmente, a atividade da proteína MP leva a um total desarranjo do transporte intercelular, via plasmodesmata, que normalmente ocorre na célula, levando ao surgimento dos sintomas da infecção (ZERBINI *et al.*, 2002).

## 2.2.5. Movimento dos geminivírus na planta

O movimento dos fitovírus no interior da planta ocorre tanto célula a célula, normalmente via plasmodesmas, quanto à longa distância, através do sistema vascular. Os vírus chegam às células mediante transmissão pelo inseto vetor e replicam e transcrevem seu genoma no núcleo. Como os *Begomovirus* se multiplicam no núcleo da célula e não no citoplasma, esses vírus necessitam de uma etapa adicional de transporte, para efetivar a sua entrada e saída do núcleo celular (PALMER & RYBICKI, 1998). Os mRNA's e o DNA viral atravessam o envelope nuclear para que os processos de tradução e empacotamento ocorram no citoplasma. O transporte através do envelope nuclear é um processo mediado pela proteína NS, a qual leva DNA viral do citoplasma para o núcleo e vice-versa. Provavelmente essa passagem se dá através dos poros da membrana nuclear, utilizando as vias normais de importação /exportação de proteínas celulares, RNAs e ribonucleoproteínas (CARRINGTON *et al.*, 1996).

Uma vez que novas partículas virais são formadas na célula inicialmente infectada, o vírus necessita atingir outras células localizadas nas proximidades do sítio inicial da infecção, bem como células localizadas em tecidos mais distantes (PICÓ *et al.*, 1996). O transporte do DNA viral para as células adjacentes é realizado via plasmodesmas e mediado pela proteína MP que aumenta o limite de exclusão do citoplasma e potencializa o movimento de dsDNA célula a célula (NOUEIRY, *et al.*, 1994 ; ZERBINI *et al.*, 2002). A velocidade de disseminação do vírus através do movimento célula a célula é lenta, sendo da ordem de 1 mm por dia, que corresponde de 8 à 10 células de parênquima. A passagem do vírus através do plasmodesma normalmente é feita na forma de partícula íntegra, apesar de já ter sido observado a migração somente do ácido nucléico no caso de alguns vírus alongados (BERGAMIM-FILHO, 1995).

O movimento viral a longa distância é passivo acompanhando o fluxo de fotoassimilados através do sistema vascular. Segundo LUCAS & GIBERTSON (1994).

A grande maioria dos vírus é transportada via floema, na forma de partícula completa, atingindo, a partir do ponto de penetração, primeiramente as raízes, em seguida as folhas jovens e posteriormente a planta toda, caracterizando uma infecção sistêmica (JEFFREY *et al.*, 1996). A velocidade de transporte do vírus neste caso é rápida, sendo de 10 a 100 vezes superior quando comparada com o movimento célula a célula. A entrada do vírus na via de transporte à longa distância é crítica para o estabelecimento da infecção sistêmica, e a falta de capacidade do vírus para entrar no floema pode resultar em sintomas leves ou atenuados, e até mesmo resistência do hospedeiro à infecção sistêmica (FARIA & ZERBINI, 2000).

### **2.2.6. Mecanismos de variabilidade genética em geminivírus**

Os *Geminivirus* são considerados um grupo emergente de vírus de plantas, devido ao grande aumento na incidência e importância econômica das doenças por eles causadas nos últimos 20 anos (POLSTON & ANDERSON, 1997). Esse aumento é, em parte, decorrente da grande variabilidade genética encontrada entre as espécies e estirpes de geminivírus, resultado da alta taxa de recombinação entre esses vírus, o que lhes confere uma extraordinária capacidade de adaptação a novos hospedeiros (FARIA & ZERBINI, 2000). Os geminivírus apresentam uma elevada taxa de evolução, o que não seria de se esperar já que vírus com genoma composto de RNA, são incapazes de corrigir a incorporação incorreta de nucleotídeos, resultando em uma alta taxa de mutações fixas na população. Uma vez que a replicação do genoma viral é realizada pela maquinaria celular do hospedeiro, é improvável que simples mutações pontuais causadas por erros da DNA polimerase sejam responsáveis pela diversidade genética dos geminivírus (FERNANDES, 2001). Embora a fixação de mutações ocorra com menor frequência para os geminivírus, a alta taxa de recombinação compensa esse fato, resultando na grande variabilidade genética verificada para esse grupo de fitovírus (FARIA & ZERBINI, 2000).

No caso dos *Begomovirus*, a existência de dois componentes genômicos promove um mecanismo alternativo, conhecido como pseudo-recombinação, pelo qual a troca de material genético pode ocorrer sem necessidade de recombinação

intermolecular, ocorrendo apenas troca de componentes entre dois vírus (FARIA *et al*, 1994 : FARIA & ZERBINI, 2000).

A recombinação e a pseudo-recombinação são possibilitadas pela ocorrência freqüente de infecções mistas (LAZAROWITZ, 1991; HARRISON & ROBINSON, 1999; ROYE *et al.*, 1999). Além disso, seqüências de begomovírus podem se integrar no genoma da planta, inclusive nas células germinativas, possibilitando sua transmissão vertical e, conseqüentemente, criando oportunidades para a ocorrência de outros eventos de recombinação (BEJARANO *et al*, 1996 ; ASHBY *et al.*, 1997).

A ocorrência natural de pseudorecombinantes no campo foi verificada no México, em plantas de tomate infectadas pelo *Tomato leaf crumple virus* (TLCrV) (PAPLOMATTAS *et al.*, 1994).

Em Uganda, a análise plantas de mandioca naturalmente infectadas demonstrou diferentes combinações de DNA-A e DNA-B de begomovírus (PITA *et al.*, 2001). Os resultados sugeriram a ocorrência natural de pseudorecombinantes inter e intraespecíficos e um aumento na complexidade do mosaico dourado ocorrendo em mandioca neste país, resultando epidemia severa. Infecções mistas de *African cassava mosaic virus* (ACMV-UG) e *East african cassava mosaic vírus* (ECMV-UG) também foram detectadas. As amostras com infecções mistas sempre mostraram sintomas mais severos, sugerindo a interação sinérgica entre o ACMV-UG e EAMV-UG. A estimativa da quantidade de DNA viral em plantas naturalmente infectadas demonstrou que em infecções mistas a quantidade de DNA de cada um desses vírus era maior do que a quantidade de DNA viral em infecções isoladas. Os resultados também demonstraram claramente que o mosaico dourado da mandioca pode ser causado pelo pseudorecombinante formado pelo DNA-A do EACMV-UG2 e o DNA B do EACMV-UG3.

Pseudorecombinantes viáveis têm sido construídos *in vitro* usando clones de componentes A e B de vírus diferentes, porém relacionados entre si (GILBERTSON *et al.*, 1993b). Pseudorecombinantes formados a partir da mistura de componentes de dois isolados distintos de BGMV mostraram-se infecciosos. Quando inoculada, a mistura formada a partir do DNA-A do isolado da Guatemala (BGMV-PR/GA) e o DNA B do isolado da República Dominicana (BGMV-PR/DR) foi capaz de desenvolver os

sintomas apresentados pelo tipo selvagem, enquanto o pseudorecombinante entre o DNA-A de BGMV-PR/DR e DNA-B de BGMV-PR/GA induziu o desenvolvimento de sintomas atenuados e tardios. Estes resultados demonstram que os begomovírus com regiões comuns suficientemente similares podem formar pseudorecombinantes infecciosos (FARIA & ZERBINI, 2000). Portanto, ressaltam que os pseudorecombinantes recíprocos apresentam diferenças na eficiência de replicação e infecção sistêmica (FARIA *et al.*, 1994).

A recombinação constitui o segundo mecanismo de variabilidade em geminivírus. Nestes é relevante a participação do inseto vetor, com a transmissão simultânea de dois vírus (TIMMERMANS *et al.*, 1994). A análise filogenética de componentes completos e ORF's individualizadas de geminivírus já caracterizados, realizada por RYBICKI (1994) sugere que a origem de muitas espécies desse vírus se deve a eventos de recombinação. Um exemplo é o BCTV, que aparentemente resultou de recombinação entre um *Mastrevirus* ancestral (contribuindo com o gene da proteína capsidial) e um *Begomovirus* (contribuindo com o gene codificador da proteína associada à replicação).

### **2.3. Geminivirus em *Phaseolus* spp.**

O mosaico dourado do feijoeiro, causado pelo *Bean golden mosaic virus* (BGMV), foi inicialmente descrito por Costa em 1961 como uma doença que, inicialmente, não teria importância econômica, ocorrendo no estado de São Paulo (COSTA, 1965). No início dos anos 70, as plantações de feijoeiro nos estados de São Paulo, Paraná e Minas Gerais foram severamente atingidas pela doença. Esse fato foi atribuído ao avanço da cultura de soja e outras culturas hospedeiras da mosca branca (FARIA *et al.*, 1994). Essa doença está hoje disseminada por todas as áreas de produtoras de feijão do Brasil e em outros países das Américas, tais como Cuba, República Dominicana, Porto Rico, Jamaica, Estados Unidos, México, Belize, Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicarágua, Costa Rica, Panamá, Venezuela e Colômbia (BLAIR *et al.*, 1995 ; ARAGÃO & FARIA, 2004).



No Brasil, em condições de campo, as perdas ficam em torno de 40 a 85%, podendo chegar a 100% (GÁLVEZ & MORALES, 1989), portanto a incidência da doença e a extensão das perdas variam dependendo da população do inseto vetor, da cultivar, do estágio das plantas quando infectadas, do isolado do vírus e das condições ambientais (GARRIDO-RAMIREZ *et al.*, 2000 ; ARAGÃO & FARIA, 2004).

COSTA (1976) relatou como hospedeiros do BGMV-BR apenas *Phaseolus vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. acutifollius* Gray, *P. longepe-dunculatus* Mart., *P. polystachyus* (L). Britt, Stern & Pagg. e *Macroptilium lathyroides* L. (*Phaseolus lathyroides* L.), informando que são espécies bastante suscetíveis das quais o vetor adquire o vírus facilmente. Além do BGMV, outras espécies de *Begomovirus* causam mosaico dourado em *Phaseolus spp.*, assim como, o *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV), *Lima bean golden mosaic virus* (LBGMV) e *Macroptilium golden mosaic virus* (MaGMV).

O manejo de geminiviroses é difícil. Medidas como o controle químico do inseto vetor (mosca branca) visando à eliminação ou a redução das fontes do vírus, vêm sendo utilizadas. Portanto este tipo de controle é dificultado devido a constante migração de grandes populações do inseto de lavouras mais velhas para as mais novas, e também pela rápida resistência adquirida aos inseticidas (FARIA *et al.*, 2000). Uma outra medida usada é o controle cultural, com a eliminação de hospedeiros alternativos, que funcionam como reservatórios do vírus, além da execução do plantio em períodos menos favoráveis ao inseto vetor. Porém estas estratégias não têm demonstrado ser efetivas para controlar as doenças causadas por geminivírus.

A obtenção de imunidade ao vírus através do melhoramento para resistência varietal seria a medida de controle mais adequada e a única realisticamente eficiente (ARAGÃO & FARIA, 2004). Fontes de imunidade ou elevados graus de resistência têm sido buscadas nos bancos de germoplasma de feijão. Em cerca de 15.000 acessos de germoplasma de *Phaseolus vulgaris* e alguns de *P. lunatus*, *P. acutifollius* e *P. coccineus*, em El Salvador, Costa Rica, Guatemala, México e Brasil, encontrou-se apenas níveis baixos e moderados de resistência ou tolerância à doença (GÁLVEZ & MORALES, 1989 ; FARIA & MAXWELL, 1999). Trabalhos desenvolvidos pela Embrapa Arroz e Feijão levaram á recomendação da variedade Ônix, de grão preto, sob

moderada incidência precoce de BGMV. No Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), foram desenvolvidas as cultivares IAPAR 57, IAPAR 65 e IAPAR 72 (grupo carioca), apresentando expressão reduzida de mosaico e de deformação das vagens, sob alta incidência de BGMV (BIANCHINI, 1999; FARIA *et al.*, 2000).

Os programas de melhoramento que visam obter resistência às geminiviroses no Brasil, baseiam-se na resistência derivada do patógeno, utilizando estratégias como a proteção mediada pela capa protéica (CP), a qual não tem apresentado resultados satisfatórios. Provavelmente isso se deve ao fato da CP não ser essencial à infecção e ao desenvolvimento de sintomas em plantas infectadas por geminivírus (ARAGÃO & FARIA, 2004). No uso de RNA antisense do gene *rep* (FARIA & MAXWELL, 1999). Acredita-se que este mecanismo age a nível traducional, de forma direta ou indireta, podendo ser em nível nuclear, onde a hibridação RNA-antisense e mRNA interferindo no processamento do pré mRNA ou ainda no transporte do mRNA para o citoplasma. Esse dúplex formado seria reconhecido pela RNase H, e subsequentemente, o mRNA degradado. No nível citoplasmático, a interação RNA antisense e mRNA pode interferir na ligação de fatores de iniciação de tradução ou inibir diretamente a tradução do mRNA pelos ribossomos (ARAGÃO & FARIA, 2004). Embora os resultados destas estratégias terem sido animadores, ainda ocorre replicação viral na planta. Outra estratégia utilizada é o uso de mutantes do gene da proteína associada à replicação viral (REP). A técnica envolve a criação de uma proteína REP não funcional que interfere com a ligação do tipo normal de REP produzido pelo vírus. A mutagênese da proteína REP em BGMV mostrou que a mutação no motivo de ligação e transferência de nucleosídeo trifosfato são letais (Transdominância letal) (HANSON *et al.*, 1995). Desta forma foram obtidas plantas transgênicas de feijão contendo mutação no gene *rep*, que aparentemente inibiu completamente a replicação do vírus, conferindo completa resistência. A cultivar de feijão comum Olathe Pinto, denominada M1-4, resultante desta técnica, apresentou menor incidência da doença. Esta variedade de feijoeiro resistente ao mosaico dourado está sendo avaliada quanto à segurança alimentar e ambiental nos laboratórios da Rede Embrapa de Biossegurança (LIMA & FARIA, 2005).

### **3. METODOLOGIA**

---

#### **3.1. Local de execução**

O experimento foi realizado no Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas, no período de março de 2004 a março de 2006.

#### **3.2. Coletas das plantas testadas para infecção por *Begomovirus***

Amostras de plantas de fava (*Phaseolus lunatus* L.) apresentando sintomas indicativos de infecção por geminivírus, como mosaico, nanismo e deformação foliar (Figura 4 A e B), foram coletadas em diferentes municípios dos estados de Alagoas e Pernambuco. Foram também coletadas plantas de feijão-de-pombinha (*Macroptilium lathyroides* L., sinónímia *Phaseolus lathyroides* L.) e *Macroptilium* sp. (invasoras da

família *Fabaceae*) que apresentaram sintomas de infecção semelhante e se encontravam próximas aos campos cultivo de fava (Figura 4C).



Figura 4. Plantas de fava e *Macroptilium lathyroides* exibindo sintomas provocados por begomovírus, coletadas nos municípios de Arapiraca e União dos Palmares, respectivamente. A – vista de uma área de produção de fava com alta incidência da

doença. B – detalhe de uma planta de fava infectada apresentando sintomas severos de mosaico. C – planta de *M. lathyroides* apresentando sintomas severos de mosaico.

Em algumas situações as plantas foram inteiramente removidas do campo e transferidas para vasos plásticos contendo solo esterilizado, para manutenção dos isolados e estudos posteriores. As amostras (Tabela 1) foram encaminhadas ao Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas e Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária - IPA, para fins de identificação e diagnóstico.

Tabela 1. Amostras das plantas com sintomas de infecção por geminivírus e os respectivos municípios de procedência.

<b>nº</b>	<b>Amostra</b>	<b>Procedência</b>
1	Fava UFAL	Maceió – AL
2	Fava Recife	Recife - PE
3	Fava R. L. (Ano I)	Rio Largo – AL
4	Fava R. L. (Ano II)	Rio Largo – AL
5	Fava Maceió	Maceió – AL
6	Fava S. Miguel	São Miguel dos Campos – AL
7	Fava Atalaia	Atalaia – AL
8	Fava Arapiraca	Arapiraca – AL
9	Fava Pilar	Pilar – AL
10	Fava Estrela	Estrela de Alagoas – AL
11	Fava Belém	Belém – AL
12	Fava Mundaú	Santana do Mundaú – AL
13	Fava União	União dos Palmares – AL
14	<i>Macroptilium lathyroides</i> Palmeira	Palmeira dos Índios – AL
15	<i>Macroptilium lathyroides</i> Mundaú	Santana do Mundaú – AL
16	<i>Macroptilium lathyroides</i> União	União dos Palmares – AL
17	<i>Macroptilium spp.</i> União	União dos Palmares – AL
18	<i>Rhyncosia phaseoloides</i> Maragogi	Maragogi – AL

19 *Rhyncosia phaseoloides* Barra

Barra de São Miguel – AL

---

### 3.3. Caracterização molecular dos isolados

#### 3.3.1. Extração do DNA total

DNA total foi extraído das amostras coletadas utilizando-se o protocolo descrito por FERREIRA & GRATTAPAGLIA (1996), com algumas modificações. Foram utilizadas 200 mg de tecido foliar fresco macerado em 1 mL de tampão CTAB 4% (CTAB 4%, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM, pH = 8), PVP 1%,  $\beta$ -mercaptoetanol 2%, em almofariz de porcelana. O macerado foi transferido para tubos de microcentrifuga, ressuspendido no vórtex e incubado em banho-maria a 65°C por 20 minutos. Os tubos foram agitados a cada dez minutos. Após este tempo os mesmos foram retirados do banho-maria e deixados em repouso até resfriar o macerado de tecido vegetal. Em seguida, foram adicionados 600  $\mu$ L de CIA (clorofórmio: álcool-isoamílico) 24:1 (v/v) e os tubos contendo o macerado foram agitados em vortex por 2 minutos e centrifugados por 7 minutos a 13.400 rpm, a fim de separar a fase orgânica da fase aquosa. Após a centrifugação 400  $\mu$ L da fase aquosa foi transferida para tubos novos e adicionado 40 $\mu$ L de uma solução de ressuspensão (CTAB 10%, NaCl 1,4). Os tubos foram agitados por 2 minutos e adicionados novamente 600  $\mu$ L de CIA/24:1, após agitação, o material foi centrifugado por 7 minutos a 13.400 rpm. A solução aquosa foi transferida para novos tubos aos quais foi adicionado o mesmo volume de isopropanol gelado, para formação do pellet de DNA. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 7500 rpm por 5 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado. O pellet foi então lavado 2 vezes com etanol 70% e posto para secar em temperatura ambiente. O pellet foi ressuspendido em 30  $\mu$ L de TE + RNase e colocado em banho-maria por 30 minutos a 38 °C. Para quantificação do DNA, foram utilizados 2  $\mu$ L do DNA total em gel de agarose a 0,8 % e submetido a eletroforese a 3 V/cm por 1:30 hora, posteriormente o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5  $\mu$ g/ml). A concentração de DNA das amostras foi estimada mediante comparações com soluções de DNA do fago lâmbda com concentrações conhecidas (2,5ng/ $\mu$ L, 5,0 ng/ $\mu$ L, 10 ng/ $\mu$ L e 20 ng/ $\mu$ L).

### 3.3.2. Detecção de geminivírus em plantas de fava e *Macroptilium* spp. por meio da reação da polimerase em cadeia (PCR)

Para confirmação da presença de geminivírus nas amostras coletadas, foi realizada a amplificação de segmentos específicos do genoma viral, via PCR. Cerca de 30 ng do DNA extraído foi utilizado como molde em reações contendo os pares de oligonucleotídeos PAL1v1978/par1C496 ou PBL1v2040/PCRC1 visando à amplificação de segmentos dos componentes A ou B do genoma dos begomovírus (ROJAS *et al.*, 1993). As seqüências desses oligonucleotídeos podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 2. Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação de fragmentos do genoma do begomovírus caracterizado no presente estudo.

Oligonucleotídeo	Seqüência (5' – 3')	Tamanho aproximado do produto de PCR
PAL1v1978	gcatctgcacatygtcttyccngt	1,2 Kb
par1C496	attactgcaggccttyctracatrgg	
PBL1v2040	gctctgcagcartgrtckatcttccataca	0,6 kb
PCRC1	ctagctgcatatttacrarwatgcca	

N = A, T, C ou G; Y = C ou T; R = A ou G; K = G ou T; W = A ou T.

Os oligonucleotídeos PAL1v1978/par1C496 direcionam a amplificação de um fragmento de aproximadamente 1,2 kb do DNA A, compreendendo a região comum e as extremidades amino-terminal dos genes *Rep* e *Cp* (Figura 5). Por sua vez, os oligonucleotídeos PBL1v2040/PCRC1 direcionam a amplificação de um fragmento de aproximadamente 0,6 kb do DNA B, compreendendo a região comum e as extremidades amino-terminal dos genes *ns* e *mp*. Tanto PAL1v1978/par1C496 quanto PBL1v2040/PCRC1 geram o sítio da endonuclease de restrição *Pst* I, em ambas as extremidades do fragmento amplificado, fato que facilita o processo de clonagem.



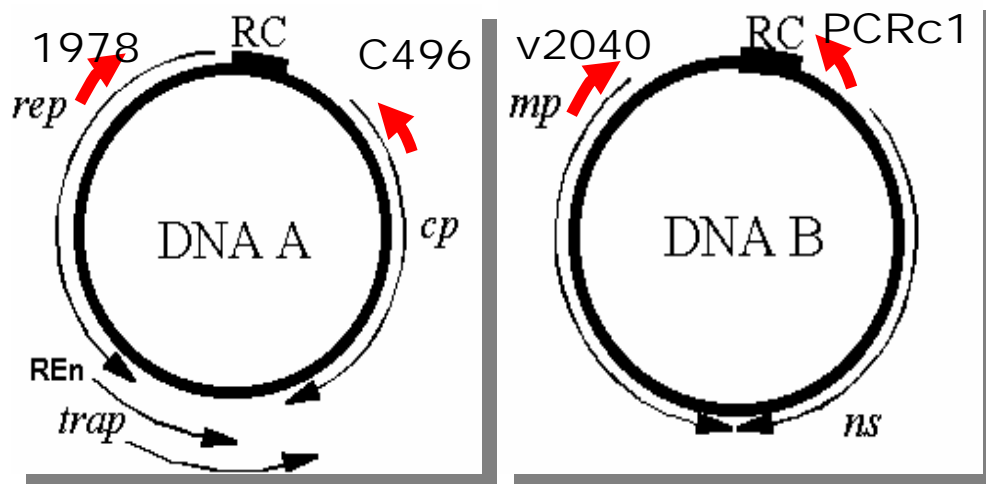


Figura 5. Regiões de anelamento dos primers utilizados na detecção dos *Begomovirus* .

O controle positivo da PCR consistiu em plasmídeos contendo fragmentos do DNA A e B do genoma do *Tomato Golden Mosaic Virus* (TGMV), caracterizado por MELLO (2002). No controle negativo, o DNA molde foi extraído de plântulas saudáveis.

A PCR foi realizada em um volume de 30  $\mu$ l, contendo tampão 10 x (Tris-HCl 100 mM, pH 8,3 e KCl 500 mM),  $MgCl_2$  75 mM, mistura de dNTPs a 4 mM, 10  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo, 1 unidade de *Taq* polimerase e 30ng de DNA e água ultrapura estéril suficiente para atingir volume final de 30  $\mu$ l. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Eppendorf modelo Mastercycler Personal, programado para 30 ciclos de desnaturação a um minuto a 94°C, anelamento por um minuto a 50°C e extensão por dois minutos a 72°C. Ao término dos ciclos, as reações foram submetidas a um período adicional de polimerização por 10 minutos a 72°C. A amplificação foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídeo, conforme item 3.3.1.

### 3.4. Análise da diversidade genética via PCR-RFLP

Para detectar a variabilidade genética dos diferentes isolados de begomovírus, os produtos de PCR obtidos foram clivados com diferentes endonucleases de restrição (Tabela 3).

Tabela 3. Enzimas utilizadas nas digestões dos produtos de PCR do Componente A dos begomovírus, seus respectivos sítios de clivagem e temperatura de incubação.

Enzima	Sítio de clivagem	Tampão	Temperatura
<i>Bam</i> HI	5' – G ↓GATCC C– 3' 3' – C CTAGG ↑ G– 5'	REACT 3	37°C
<i>Eco</i> RI	5' – G ↓AATT C – 3' 3' – C TTAA↑ G – 5'	REACT 3	37°C
<i>Hin</i> FI	5' – G ↓ANT C – 3' 3' – C TNA ↑ G – 5'	REACT 2	37°C
<i>Pst</i> I	5' – C CTGAC ↓ G – 3' 3' – G↑ GACTG C – 5'	REACT 2	37°C
<i>Pvu</i> II	5' – CAG ↓ CTG – 3' 3' – GTC ↑ GAT – 5'	REACT 6	37°C
<i>Rsa</i> I	5' – T ↓CG A – 3' 3' – A GC ↑T – 5'	REACT 1	37°C
<i>Taq</i> I	5' – GT ↓AC – 3' 3' – CG ↑TG – 5'	REACT 2	65°C
<i>Xba</i> I	5' – T ↓CTAGA A – 3' 3' – A GATCT ↑ T – 5'	REACT A	37°C

As reações de clivagem consistiram de: 20 U da enzima, 2  $\mu$ L do respectivo tampão 10X, 200 ng do produto de PCR e 8  $\mu$ L de água ultrapura (Mili Q). As reações foram incubadas a 37 °C overnight, com exceção das clivagens com *TaqI*, que foram incubadas a 65 °C por 6 horas. Os produtos das clivagens foram analisados por meio de eletroforese em géis de agarose (1,5%) corado com brometo de etídeo conforme item 3.3.1.

### **3.4.1. Relacionamento filogenético dos isolados virais através dos padrões de restrição PCR-RFLP**

Para analisar o relacionamento filogenético entre os isolados virais foi feita uma matriz de similaridade, a partir dos padrões de clivagem obtidos pela restrição dos fragmentos com as enzimas (*PstI*, *RsaI*, *HinfI* e *TaqI*). Utilizou-se o programa Freetree, sendo a distância estatística calculada pelo coeficiente de Jaccard. A partir dos dados gerados na matriz, foi construída uma árvore filogenética pelo método UPGMA e bootstrap de 1000 repetições através do programa Treeview.

### **3.5. Sequenciamento parcial dos isolados virais**

Com base no padrão de bandas geradas pela clivagem dos fragmentos de PCR com endonucleases de restrição (PCR-RFLP), foram selecionados três isolados, Fava Maceió, Fava Recife e Fava União dos Palmares para fins de caracterização molecular. Foram seqüenciados os fragmentos amplificados por PCR dos três isolados, sendo necessário inicialmente proceder à purificação do produto da amplificação, utilizando-se o Kit GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit. Os fragmentos purificados foram quantificados em gel de agarose 2% empregando-se o Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) como referência.

A reação para sequenciamento foi efetuada num termociclador MJ Research, modelo PTC 200, no Centro de Estudos do Genoma Humano, da Universidade de São Paulo (USP). A composição da reação foi a seguinte: produto de PCR 2  $\mu$ L (25-30 ng), premix de sequenciamento 4  $\mu$ L, primer 5 uM 0,6uL, água milliQ 3,4  $\mu$ L, totalizando 10

μL. O fragmento foi seqüenciado de ambas as extremidades, utilizando-se os oligonucleotídeos PAL1v1978 e PAR1c496, separadamente, em um aparelho MegaBace 1000 (GE Healthcare).

### **3.5.1. Comparação da seqüência obtida com outras seqüências depositadas no Genbank**

As seqüências obtidas de uma região do componente A com aproximadamente 1,2 Kb que compreende a região comum e as extremidades 5' dos genes *Rep* e *Cp* foram editadas e comparadas com outras seqüências depositadas no GenBank, utilizando-se o programa Blastn.

### **3.5.2. Análise filogenética entre os isolados sequenciados**

As seqüências dos isolados fava Maceió, fava Recife e fava União dos Palmares foram salvas no formato Fasta e comparadas, duas a duas, mediante alinhamento no programa DNAMAN versão 4.0. Com o alinhamento das seqüências foi obtida a porcentagem de identidade entre os isolados.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### 4.1 Detecção de begomovírus via PCR

Detectou-se a presença de begomovírus em 17 das 19 amostras de DNA extraído de plantas de fava, *Macroptilium* spp. e *Rhynchosia phaseoloides* nos diferentes municípios dos Estados de Alagoas e Pernambuco (Figura 6). As exceções foram às amostras 18 (*Rhynchosia phaseoloides* Maragogi) e 19 (*Rhynchosia phaseoloides* Barra), para as quais não se observou nenhum produto de amplificação. Nesses casos é possível que os sintomas observados sejam decorrentes da infecção por outros vírus, uma vez que sintomas de mosaico, amarelecimento e deformação do limbo foliar podem ser ocasionados por muitos vírus diferentes (ZERBINI *et al.*, 2002). Os sintomas também podem ter sido causados por fatores abióticos, como por exemplo, deficiência nutricional ou fitotoxidez.

O par de oligonucleotídeos PAL1v1978/par1C496 direcionou a amplificação de um fragmento com aproximadamente 1,2 kb, a partir do DNA-A, enquanto que na presença dos primers PBL1v2040/PCRC1 foi amplificado um fragmento com aproximadamente 0,6 kb, a partir do DNA-B (Figura 6). Tais resultados sugerem que

geminivírus com genoma bipartido, portanto pertencente ao gênero *Begomovirus* (VAN REGENMORTEL *et al.*, 2000), estavam infetando as plantas avaliadas.

Outro dado que corrobora essa hipótese foi à observação em campo da constante associação da mosca-branca (*Bemisia tabaci*) às plantas sintomáticas, uma vez que este inseto transmite apenas geminivírus pertencentes ao gênero *Begomovirus* (FARIA & ZERBINI, 2000). Em alguns casos os produtos de amplificação apresentaram tamanhos ligeiramente diferentes, sugerindo a ocorrência de variações genéticas entre os isolados estudados. Essas variações foram mais evidentes para os produtos de PCR amplificados a partir do DNA-B (Figura 6). Resultados similares foram obtidos por outros autores para begomovírus de plantas cultivadas (KARNOPP, 2001; AMBROZEVICIUS *et al.* 2002; FERNANDES, 2001; LOPES, 2005) ou de plantas invasoras (LISTIK, 2004).

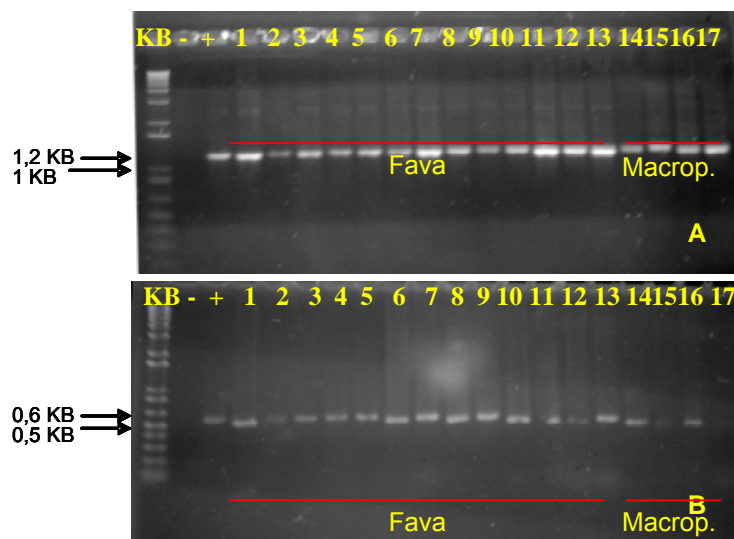


Figura 6. Produtos de PCR amplificados a partir do DNA-A (A) ou do DNA-B (B) de plantas de fava e de *Macroptilium*. KB = 1 Kb DNA Plus Ladder. - e + = controles negativo e positivo, respectivamente. As linhas 1 a 13 correspondem às amostras fava e as linhas 14 a 17 às amostras de *Macroptilium* spp., conforme Tabela 1.

No presente trabalho foi constatada a presença de begomovírus em quatro amostras de *Macroptilium* spp (Figura 6). Essas invasoras têm sido freqüentemente associadas aos cultivos de feijão, tomate, caupi, entre outros e há muitos relatos de sua infecção natural por begomovírus (COSTA, 1976; LIMA *et al.* 2000; LIMA *et al.*, 2001a; LIMA *et al.*, 2001b; IDRIS *et al.* 2003; LISTIK, 2004). No entanto poucos trabalhos foram conduzidos para investigar se os begomovírus de *Macroptilium* spp. podem ser transmitidos para plantas cultivadas, podendo ser citados as pesquisas de BIRD & MARAMOROSCH (1978) e de COSTA & BROWN (1991). Em ambas as situações foi confirmado que o vírus de *Macroptilium* sp. podia ser transmitido por mosca-branca e causar doença no feijoeiro. Contudo, não há dados sobre esse aspecto no Brasil.

O papel de outras plantas invasoras como reservatório de begomovírus tem sido estudado em alguns casos. Por exemplo, COSTA (1965) relatou que o *Euphorbia mosaic virus* (isolado de *Euphorbia prunifolia*) podia ser transmitido para o feijoeiro, utilizando-se o inseto vetor. Posteriormente COSTA (1975), relatou que o *Abutilon mosaic virus* (AbMV), era transmitido por mosca-branca de *Sida* spp. para o feijoeiro. FRISCHMUTH *et al* (1997) demonstraram que, em condições experimentais, o *Sida golden mosaic virus* (SiGMV) pode ser transmitido por moscas-brancas para plantas de feijoeiro. CONTRIM *et al.* (2004), determinaram que 10% das amostras de tomateiro com sintomas de mosaico coletadas na região Centro-Oeste de São Paulo estavam infectadas com *Sida mosaic virus* (SiMov).

A demonstração de que plantas invasoras estão funcionando como hospedeiros alternativos para *Begomovirus* que infectam plantas cultivadas poderá fazer com que uma das medidas de controle para geminivirose seja a eliminação desses hospedeiros. Desta forma, seria importante determinar se os begomovírus obtidos de *Macroptilium* spp. são capazes infectar plantas de fava ou de outras Fabaceae cultivadas, através de testes de transmissão utilizando a mosca-branca.

## 4.2. Análise da diversidade genética de *Begomovirus* através de PCR-RFLP

Os fragmentos de PCR de 1,2 kb, gerados a partir do DNA-A dos isolados estudados, foram clivados com diferentes enzimas de restrição, a fim de detectar polimorfismos. Quando foram utilizadas as enzimas *Bam*HI, *Eco*RI, *Pvu*II e *Xba*I o tamanho do fragmento de DNA não foi alterado, demonstrando a inexistência de qualquer sítio de reconhecimento para essas enzimas, ou que esses sítios estariam localizados na(s) extremidade(s) da seqüência e assim, a alteração no tamanho seria tão pequena que não foi percebida no gel de agarose. Para as demais enzimas, foi observado um ou mais sítios de clivagem na maioria dos isolados (Figura 7).

A clivagem dos fragmentos de PCR com a enzima *Pst*I resultou em dois padrões de bandas distintos. Um padrão, observado para 12 dos 17 isolados testados exibiu uma banda única que aparentemente não sofreu clivagem, pois manteve seu tamanho original. No outro padrão de bandas, exibido pelos isolados 5, 7, 12 e 17 foi observado um único fragmento com tamanho estimado em 600 pb. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de o sítio de reconhecimento da enzima se localizar proximamente ao meio da seqüência, resultando em dois fragmentos de tamanhos semelhantes, os quais se sobrepõem durante a eletroforese (Figura 7). O isolado *M. lathyroides* de União dos Palmares (amostra 16) apresentou duas bandas, uma com aproximadamente 1,2 kb e a outra com cerca 0,6 kb. Isso pode ser consequência de dois fatos distintos. Primeiro a ocorrência de uma infecção mista ou então a ocorrência de digestão parcial.

Relatos de infecções mistas por *Begomovirus* têm sido freqüentes tanto para o caso de plantas cultivadas quanto para plantas invasoras. Por exemplo, FARIA & MAXWELL (1999) relatam a infecção simultânea de uma planta de feijoeiro com o BGMV e com o *Abutilon mosaic virus*. A presença de mais de um isolado numa mesma planta é um fator que colabora com a alta variabilidade genética de *Begomovirus*, uma vez que há a possibilidade do surgimento de pseudo-recombinantes (isolados com genoma formado pela combinação do DNA-A de um isolado e DNA-B de outro isolado



ou vice-versa) ou mesmo recombinantes verdadeiros (troca de material genético do mesmo componente genômico).

A respeito dos pseudo-recombinantes GARRIDO-RAMIREZ *et al.* (2000) relataram sua ocorrência em plantas de feijoeiro naturalmente infectadas por *Begomovirus*. Esse fenômeno pode ser facilmente demonstrado, seqüenciando-se a região comum dos dois componentes do genoma, que normalmente apresenta identidade superior a 95 %. Adicionalmente, vários pseudo-recombinantes viáveis têm sido obtidos em condições de laboratório. Esses pseudo-recombinantes são muito importantes para experimentos que têm por objetivo esclarecer o papel de seqüências específicas do genoma viral (HÖFFER *et al.*, 1997; LIU *et al.*, 1997; BROWN *et al.*, 2002; GARRIDO-RAMIREZ *et al.*, 2000).

Por outro lado, o surgimento, em condições de campo, de novas espécies de *Begomovirus* mediante recombinação entre espécies previamente conhecidas já foi demonstrado em situações envolvendo uma planta invasora – *Ageratum* sp., (Asteraceae) (SAUDERS *et al.*, 2001) e uma planta cultivada – a mandioca (ZHOU *et al.*, 1997). Em ambas as situações os autores concluem que os recombinantes são melhores adaptados que as espécies ancestrais.

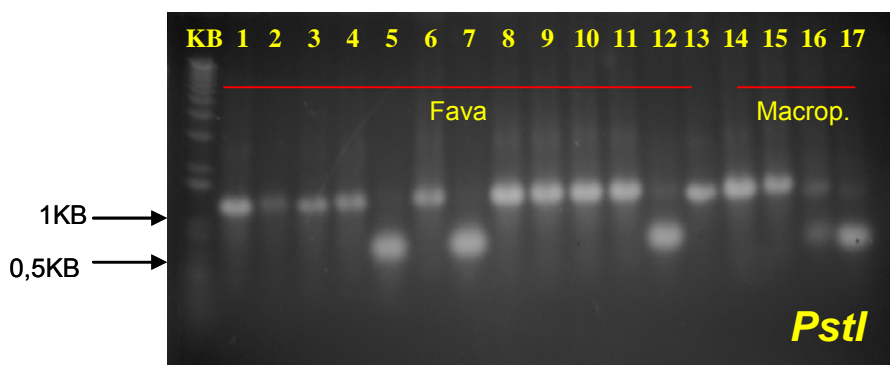


Figura 7. Padrões de restrição obtidos com a clivagem dos produtos de PCR dos diferentes isolados de begomovírus com a enzima *PstI*. KB = marcador de peso

molecular (1KB Plus DNA ladder). As linhas 1 a 17 correspondem às amostras de fava e *Macroptilium* spp., conforme Tabela 1.

A clivagem dos produtos de PCR com a enzima *RsaI* resultou em vários padrões de restrição (Figura 8). O isolado *M. lathyroides* de Santana do Mundaú (amostra 15) foi o único que não apresentou sítio de clivagem para esta enzima. As amostras 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16 e 17 exibiram uma banda de cerca de 800 pb e três bandas de baixo peso molecular. As amostras 5 e 7 apresentaram uma banda de aproximadamente 400 pb (provavelmente resultante da superposição de dois fragmentos de tamanhos similares) e três pequenos fragmentos, semelhantes aos observados nas demais amostras. A amostra 13 pode representar uma infecção mista, pois o somatório dos fragmentos excede o tamanho original do produto de PCR (Figura 8).

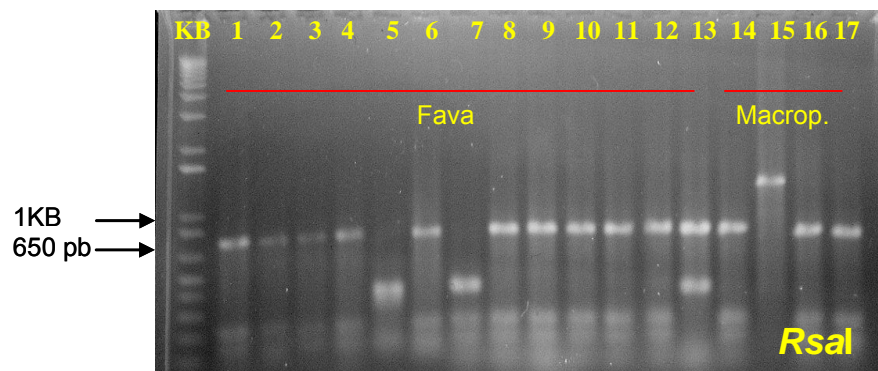


Figura 8. Padrões de restrição obtidos com a clivagem dos produtos de PCR dos diferentes isolados de begomovírus com a enzima *RsaI*. KB = marcador de peso molecular (1KB Plus DNA Ladder). As linhas 1 a 17 correspondem às amostras de fava e *Macroptilium* spp., conforme Tabela 1.

Pelo menos sete padrões de bandas foram obtidos com a clivagem dos fragmentos de PCR com a enzima *Hinf I* (Figura 9). A maior parte das amostras (10 das

17) testadas apresentaram duas bandas, uma de 650 pb e outra de 450 pb (Figura 9). Os isolados de *Macroptilium* spp. (amostras 15, 16 e 17) apresentaram padrões distintos dos isolados de fava.

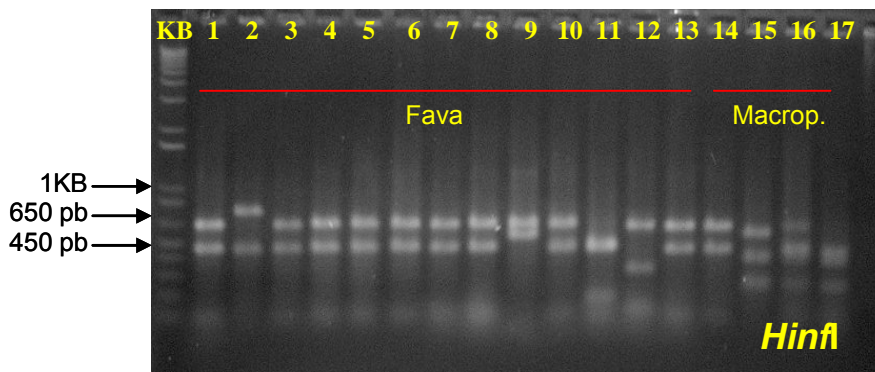


Figura 9. Padrões de restrição obtidos com a clivagem dos produtos de PCR dos diferentes isolados de begomovírus com a enzima *HinfI*. KB = marcador de peso molecular (1KB Plus DNA Ladder). As linhas 1 a 17 correspondem às amostras de fava e *Macroptilium* spp., conforme Tabela 1.

A digestão dos fragmentos de PCR com a enzima *Taq I*, também gerou padrões de bandas distintos. O padrão mais comum, encontrado em oito das amostras avaliadas, foi representado por duas bandas principais com aproximadamente 600 e 400 pb e outras bandas menores (Figura 10). Dois isolados de *Macroptilium* spp. provenientes do município de União dos Palmares (linhas 16 e 17), mostraram padrões idênticos entre si e diferentes dos demais. Por outro lado, os isolados de *Macroptilium* sp. de Palmeira dos Índios e de Santana do Mundaú (linhas 14 e 15) apresentaram padrões mais similares a isolados de fava que aos outros isolados de *Macroptilium*.

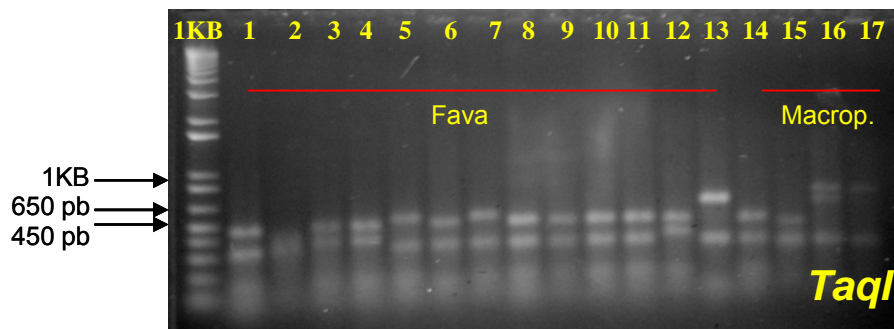


Figura 10. Padrões de restrição obtidos com a clivagem dos produtos de PCR dos diferentes isolados de begomovírus com a enzima *TaqI*. KB = marcador de peso molecular (1KB Plus DNA Ladder). As linhas 1 a 17 correspondem às amostras de fava e *Macroptilium* spp., conforme Tabela 1.

#### 4.2.1. Relacionamento filogenético entre os isolados através dos padrões de restrição PCR-RFLP

Os diferentes padrões de clivagem obtidos a partir da restrição dos fragmentos de PCR com as enzimas *PstI*, *RsaI*, *HinfI* e *TaqI* foram utilizados para gerar uma matriz de similaridade entre os isolados de begomovírus através do programa FreeTree. (Figura 11). Para elaboração dessa matriz foi atribuído o valor 1 para a presença da banda e o valor 0 para a ausência.

	Fava UFAL	Fava Recife	Fava Santana do Mundaú	Fava União dos Palmares	Fava São Miguel dos Campos	Fava Arapiraca	Fava Estrela de Alagoas	Fava Maceió	Fava Atalaia	Fava Palmeira dos Índios	M. lathyroides (Palmeira dos Índios)	M. lathyroides (Recife)	M. lathyroides (Santana do Mundaú)	M. lathyroides (União dos Palmares)	M. sp. Ur		
Fava UFAL	1,00000	0,57143	1,00000	1,00000	0,50000	1,00000	0,50000	1,00000	0,71429	1,00000	0,83333	0,50000	0,62500	1,00000	0,44444	0,55556	0,33333
Fava Recife	0,57143	1,00000	0,57143	0,57143	0,22222	0,57143	0,22222	0,57143	0,37500	0,57143	0,66667	0,22222	0,50000	0,57143	0,33333	0,44444	0,37500
Fava Santana do Mundaú	1,00000	0,57143	1,00000	1,00000	0,50000	1,00000	0,50000	1,00000	0,71429	1,00000	0,83333	0,50000	0,62500	1,00000	0,44444	0,55556	0,33333
Fava União dos Palmares	1,00000	0,57143	1,00000	1,00000	0,50000	1,00000	0,50000	1,00000	0,71429	1,00000	0,83333	0,50000	0,62500	1,00000	0,44444	0,55556	0,33333
Fava São Miguel dos Campos	0,50000	0,22222	0,50000	0,50000	1,00000	0,50000	0,50000	0,50000	1,00000	0,33333	0,37500	0,50000	0,44444	0,50000	0,30000	0,27273	0,33333
Fava Arapiraca	1,00000	0,57143	1,00000	1,00000	0,50000	1,00000	0,50000	1,00000	0,71429	1,00000	0,83333	0,50000	0,62500	1,00000	0,44444	0,55556	0,33333
Fava Estrela de Alagoas	0,71429	0,37500	0,71429	0,71429	0,33333	0,71429	0,33333	0,71429	1,00000	0,83333	0,50000	0,62500	0,50000	0,71429	0,44444	0,40000	0,20000
Fava Maceió	1,00000	0,57143	1,00000	1,00000	0,50000	1,00000	0,50000	1,00000	0,71429	1,00000	0,83333	0,50000	0,62500	1,00000	0,44444	0,55556	0,33333
Fava Atalaia	0,50000	0,22222	0,50000	0,50000	1,00000	0,50000	0,50000	0,50000	1,00000	0,33333	0,37500	0,50000	0,44444	0,50000	0,30000	0,27273	0,33333
Fava Palmeira dos Índios	1,00000	0,57143	1,00000	1,00000	0,50000	1,00000	0,50000	1,00000	0,71429	1,00000	0,83333	0,50000	0,62500	1,00000	0,44444	0,55556	0,33333
M. lathyroides (Palmeira dos Índios)	0,83333	0,66667	0,83333	0,83333	0,37500	0,83333	0,37500	0,83333	0,57143	0,83333	1,00000	0,83333	0,50000	0,83333	0,50000	0,44444	0,37500
M. lathyroides (Recife)	0,50000	0,22222	0,50000	0,50000	0,50000	0,50000	0,50000	0,50000	0,50000	0,50000	0,37500	1,00000	0,30000	0,50000	0,18182	0,27273	0,33333
M. lathyroides (Santana do Mundaú)	0,62500	0,50000	0,62500	0,62500	0,44444	0,62500	0,44444	0,62500	0,44444	0,62500	0,50000	0,30000	1,00000	0,62500	0,27273	0,66667	0,30000
M. lathyroides (União dos Palmares)	1,00000	0,57143	1,00000	1,00000	0,50000	1,00000	0,50000	1,00000	0,71429	1,00000	0,83333	0,50000	0,62500	1,00000	0,44444	0,55556	0,33333
M. lathyroides (Maceió)	0,44444	0,33333	0,44444	0,44444	0,30000	0,44444	0,30000	0,44444	0,44444	0,44444	0,50000	0,18182	0,27273	0,44444	1,00000	0,36364	0,30000
M. lathyroides (Atalaia)	0,55556	0,44444	0,55556	0,55556	0,27273	0,55556	0,27273	0,55556	0,40000	0,55556	0,44444	0,27273	0,66667	0,55556	0,36364	1,00000	0,55556
M. sp. Ur	0,33333	0,37500	0,33333	0,33333	0,33333	0,33333	0,33333	0,33333	0,33333	0,20000	0,33333	0,37500	0,33333	0,30000	0,33333	0,30000	0,55556

Figura 11. Matriz de similaridade entre os isolados de begomovírus gerada a partir dos diferentes perfis de bandas dos fragmentos de PCR-RFLP.

Como verificado na Figura 11, a similaridade entre os isolados de begomovírus variou entre 18,1% a 100%. Foi observada 100% de similaridade entre as amostras fava UFAL, fava Rio Largo-I, fava Rio Largo-II, fava São Miguel dos Campos, fava Arapiraca, fava Estrela de Alagoas, e também com um isolado de *M. lathyroides* proveniente de Palmeira dos Índios, sugerindo que possivelmente estas amostras foram infectadas por um vírus da mesma espécie.

As amostras fava Recife, fava Santana do Mundaú e fava União dos Palmares, foram menos similares (22% e 66%) quando comparadas com o restante das amostras de fava. Quando se comparou a amostra de fava Recife com fava Maceió, fava Atalaia

e fava Santana do Mundaú foram obtidas similaridade de apenas 22%, demonstrando que esses isolados podem ser muito diferentes entre si.

Baixos graus de similaridade, respectivamente 18,1% e 30%, foram obtidos para amostras de fava Santana do Mundaú e *M. lathyroides* Santana do Mundaú e fava União dos Palmares e *Macroptilium sp.* União dos Palmares. O que não era de se esperar, uma vez que as amostras pertencem ao mesmo município e foram coletadas em áreas muito próximas. Portanto, isso pode ser explicado pelo fato de begomovírus diferentes estarem infectando essas plantas. O mesmo não ocorreu quando foram comparadas as amostras de fava e *M. lathyroides*, ambas provenientes do município de União dos Palmares, onde a similaridade foi de 66%.

As amostras de *Macroptilium sp.* União dos Palmares e *M. lathyroides* Santana do Mundaú, apresentaram as menores similaridades, em média 33% e 44%, respectivamente, sendo consideradas as mais divergentes dentre as amostras estudadas.

Duas hipóteses podem explicar a baixa similaridade encontrada entre os isolados presentes nesse estudo; a primeira é que vírus de espécies diferentes estão infectando essas amostras. A outra é a existência de variabilidade genética entre esses isolados pode ser atribuída a inserções, substituições e/ou deleções de pequenas regiões genômicas compreendidas entre os sítios de restrição das enzimas utilizadas, impossibilitando o reconhecimento das mesmas.

Quando não se dispõem de seqüências do genoma, a clivagem de produtos de PCR com endonucleases de restrição (PCR-RFLP) tem sido muito utilizada para estimar a diversidade genética de *Begomovirus* (AMBROZEVICIUS, 2000; FERNANDES *et al.*, 2001; LISTIK, 2004) e de outros fitopatógenos. No entanto essa técnica permite que apenas o sítio de reconhecimento da enzima seja analisado. Portanto, qualquer alteração fora dessa região não pode ser determinada. PCR-RFLP também apresenta a limitação de não indicar a espécie do vírus envolvido, fornece apenas uma noção da variabilidade dos isolados. O sequenciamento total ou parcial do genoma é o procedimento mais recomendado para estudos de diversidade e para identificação ao nível de espécie (PADIDAM *et al.*, 1995).

A partir da matriz de similaridade foi gerada uma árvore filogenética com a finalidade de agrupar as amostras através de seu relacionamento filogenético. A topologia da árvore variou de acordo com as similaridades obtidas entre os isolados de begomovírus, podendo ser observado cinco cladros distintos (Figura 12). O clado A com 10 isolados consistiu de amostras que apresentaram graus de similaridade entre 55 e 100%.

Os isolados de fava e *M. lathyroides* oriundos do município de União dos Palmares, mais relacionados entre si, constituíram o clado B, provavelmente por pertencerem à mesma espécie. O clado C, foi composto pelas amostras fava Atalaia, fava Maceió e fava Santana do Mundaú, que apresentaram as menores similaridades (<50%) com as demais amostras de fava. Os cladros D e E foram ocupados cada um por uma única amostra, *M. lathyroides* Santana do Mundaú e *Macroptilium* sp. União dos Palmares, respectivamente, por apresentar as menores similaridades com as demais amostras.

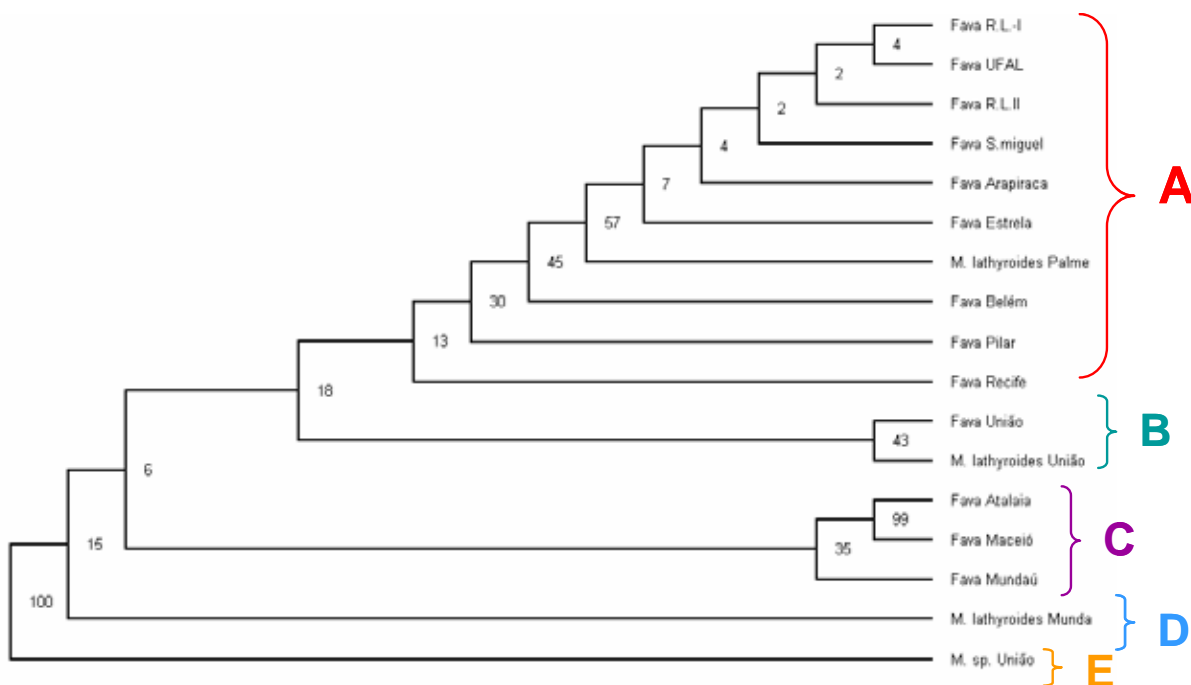


Figura 12. Árvore filogenética mostrando relações entre os begomovírus baseadas na similaridade dos perfis de bandas de PCR-RFLP.

### 4.3. Sequenciamento parcial dos isolados virais

Os produtos de PCR correspondentes aos isolados fava Maceió, fava Recife e fava União dos Palmares foram seqüenciados, nos dois sentidos. Contudo, as seqüências escolhidas para caracterização dos isolados foram àquelas obtidas com o primer PAR1c496, por apresentarem melhor qualidade. O tamanho dos fragmentos variou entre 1037 a 1112 nucleotídeos, sendo que em várias posições não foi possível determinar com segurança a base correspondente. Nesses casos, a posição foi representada pela letra N (Figura 13).

Analisando-se as seqüências obtidas verifica-se a presença de elementos envolvidos na replicação do genoma viral (Figura 13). Esses elementos são conservados no genoma de begomovírus e localizam-se na região comum. Particularmente importante é o nonanucleotídeo GTAATATTA, presente em todos os geminivírus que infectam dicotiledôneas, com exceção do *Mungobean yellow mosaic virus* – MYMV (ARGÜELLO-ASTORGA *et al.*, 1994). Essa seqüência é clivada pela proteína REP, sendo esse evento imprescindível para o início da replicação viral, por meio do mecanismo de círculo rolante (LAUFS *et al.*, 1995). O nonanucleotídeo é flanqueado, em ambas as extremidades, por seqüências complementares de 11 nucleotídeos. Em conjunto, o nonanucleotídeo e as seqüências que o flanqueiam formam uma estrutura em forma de grampo (“harpin”), sendo que o nonanucleotídeo corresponde à alça, enquanto as seqüências complementares a haste (LAUFS *et al.*, 1995). Contudo, ao contrário de muitos begomovírus caracterizados (LAUFS *et al.*, 1995; FERNANDES, 2001; KARNOPP, 2001) as seqüências flanqueadoras não são perfeitamente complementares.

Localizado proximamente à região que forma o “harpin” encontra-se a seqüência “TATA box” (Figura 13), que corresponde ao elemento de ligação da DNA polimerase da planta durante o início da replicação (ALBERTS *et al.*, 1996).



**Fava Maceió**

TGCAGCTTNGACCAGTCTGCGGCTTTTGTGTNTCTCGAGCCATTNTCCACGTAAGTGTGGAGAATAATNTGGNG  
 CGAGCGGCTAAGTGCTTAGCCGATATCCTGCCATGTGGCGCACTATGGGGCATCACGCGTTGAACCATTGTGAA  
 GTTCAAAGCAGGTTGTGAGGTGTCGAATTGTAATATATAAGCCGGTGTGAGGTCAACTATGAGGGGCCAAGTTA  
 GGAGAGAAATAAATAAGTTTCGACACGAACTGGTATTGATTGGCACAGTCCGAATAACTTGACTATATAATCTTAA  
 ATTAACGAGGCAGGCCCATGAGGCCAATAAGAGATGTACCCCAAGAAAATCGGG**ACGGCATCCG****GTAATATT**  
**ATAACGGATGGC**TACACGTGTCCCTTAAGCCCTTAGGAACCTTATAC**TATATA**TGTCCCCATTACCCCAATTCATA  
 AGGACATTTTTGAGCGAGAGCTCAATCGGGGTACACACGNCTTATTTACAAGTATGCCACCATCTGAAGCGTTTC  
 GAAATAAGGCGCTAAGAATTATTTCTACAGCATTCCACAAGTGCTCCATTACAAAAGAGTGTGCACTTGAGCAA  
 CTTCAACACATAGAAACACCCGGTCAACAAGAAATACATCGACATCTGCAAGAGAAGTTTCAACGCATAATGGGG  
 AACCACCATCTGCTTGACATTATNCAATTCCACAGGAAAGTTCCAGGTGCACGAATTGCAGATTCTCCGAGCTC  
 AAGACATCCAAAACCTACCGTCTTCCATGCCAATTAATAACCAGGGGCTGGGCACACAATNCATCNCCCCTGGA  
 CNGGTGCACAGGTCCCTAACATCCGAAGAAACGGACGGGGACATACCATCCGAAATGGGGGGACACCATCCAA  
 AGCCGCAGGAAAGAANCNGTAAAAGGAGGTGCGAACAACGCCATGGAGCGCTCAANGCCGACACGNTCTCCCA  
 GAAGAACACAGNCNATCAACAGAAACGCGGAAGTNTCCCCANAAACACCCACCCANGGAAAATTACACAGGCAG  
 AAGGCNCCCGCACCCCATCANAGGC

**Fava Recife**

GCATGANTACCATCAGCGGCTGTTGTATTTAGACCCATTACACCACGAGGAGAAAAATTAGTAGAAGCGGCTAAT  
 ATTCTGGAGCGATACCAGCCATGGTGGCGCCATTGAGCATCACGCTTAGGCATTTTGAATTAAGGATATGGTCA  
 AGTTCTACATTAATTTATAGTTTAGTAAAGAAGTGGACACCAAGTTCAAATTAACATAACCACAAGTACTAAA  
 GTCATTGGTCAGCAGACATCACTTTCTTTAATTTCAAATAAAGAACGGCCCAAGAGGCCCAAAAAGAATGGGCCT  
 TAAAAAATCG**CGCGGCATCCG****GTAATATTAGCGGATGGC**CGCCACGTGTCGACAGATCCTTAAAGAAGT  
 TCTTAC**TATATA**GGGCACCATTACCCGATTCATAGAGACTTTTGAACGAGAGCTCAATCGGGGTACACCCTCTT  
 ATTTACAAATATGCCACCACCAAGCGTTTTAAATAAACGCAAAGAAGTATTTCTGACATACCACAATGTTCAA  
 TTACAAAAGAGAGTGCAATTGAACAACCTCAAACCTACAAACACCAGTGAACAAGAAATACATCAGAATTTGCAG  
 GGAAATTTGCAANATGGGGAAACCCACNATCTACATTGCTCTTATTCAAATTTCCAAGGCAAATGTTCCCAA  
 TGCACAAATTTGCCAGAATTGTTGACTCAAAAATNCAACAACCTCTTCCGGTCTCCCATGCCATATTACCAGG  
 AAGGCAAAATCATCCCCTCTGGAAGGTCCACAAGTCCCTACCATCGCAGAAAAGACCCGGGTGAACCTCACTGNA  
 ANGGGGTCACTTCACAACGTGACGGGAGAACTGGTCAAAAAGGAGGCAACAACACGGCGANTGGANGCGGGA  
 CCCGAAGACTNAANGCGTTTCAAAAAGAANCNGGATAATCAGAGACAAGGGAAAGTCTCACACAAAANCCNGACC  
 GGAAAAACAAAAGGCGACAGAGCCCGACTCCTCAAGCAAAAAGGAATGGGGCG

**Fava União dos Palmares**

GCTGTGACCACTCAGCGGCTTATTGTACTCGACCCATTTCCACTACGTGGAGAATATTGGTCGAGCGGCTAATCT  
 TGGCCGTACCTGCCATGTGGCGCCATGGGGCATCGCGCTTGAACCATTTTGAAGGTTGTGAGTTCTA  
 ATTGTAAATTTATAGTCGTTAGTCAACTTGAGGGTCAAGTTGGAAAAATAAATAGGCTCGCCACAACGGTGTGA  
 TTGGACAGTCCAACCTAAGTGAATTTAATTTAAATTAACAAAAGAGGCCCGATGAGGCCAATAAAGATATACTCC  
 CAAAAATCGGG**ACGGCATCCG****GTAATATTAGCGGATGGC**CTACACGTGTCCTTAAAGCCCTTAGGAAGT  
 TATAC**TATATA**TGTCCCTTTAACCCAATTCATAGAGACTTATGAGCGAGAGCTCAATCGGGGTACTACTACTTA  
 TTTAACAAGTATGCCAACACCGAAGCGTTTTAAGATAAGCGCTAAGAATTTTTCTCACATTTCCACAATGCTCC  
 CATTACCAAACAGAGTGTGCACTTGAGCAACTTCAACACATAACAAAACACCCCGTCAAAAAGNAAATAACATCC  
 AGGAAACTCTGGCAGGAAATTTGCACGAACNAAATGGGGGAACCAAAATCCTGCNATGCCCTTTAATTTCTCAAT  
 TCGAAGCGAAAAGTTCCAGTGCACAAATTTGGAAGATTTTTCAGACTCCNAAGATCCATCACAATTCAAATGCCC  
 CGGTGCTTCCCCTAATGGCCCAATTAATTAACACGAAGTGCCANAAAGTCAANACCCCTCGGACTGGGCCAAN  
 GTNCCCTCAACNTCNCCAGGAAAAAGGGACCGGGGGAATCACCAGACCGACAATGGGGGGGGTATACACA  
 ATCNAACGCGAANAAACATTGCGTCAACAGAAAGGGCGAAACAAGCACATAGAAGGTGCGCATCAATGAACGGA  
 AAGGGNACTATAAGAAAACAACNCCAGGAAATAAATAAGAAGAAACANGNGGGAAAATAGTTCCAAAAGTAAA  
 CACCCACCTAAAAGGGAATATTACCGCGCACGAGCNGAGTCTAGAGCCACCCCATCA

Figura 13. Seqüências das extremidades 5’ dos genes *Rep* e *Cp* e da região comum do DNA-A dos três isolados de begomovírus caracterizados nesse estudo (Fava Maceió, Fava Recife e Fava União dos Palmares). As posições indicadas pela letra N podem indicar qualquer uma das bases A, G, C ou T. O “TATA Box” encontra-se em verde e a seqüência que forma o “harpin” está em amarelo e azul, sendo o nonanucleotídeo, ao centro, destacado em azul.

### 4.3.1. Análise filogenética dos isolados sequenciados

As seqüências de nucleotídeos dos produtos de PCR correspondentes às extremidades 5` dos genes *Rep* e *Cp* e à região comum do DNA-A dos três isolados caracterizados nesse estudo, foram comparadas com outras seqüências depositadas no banco de dados do NCBI, através do programa BLASTn (nucleotídeo x nucleotídeo). Como observado na Figura 14, os três isolados caracterizados mostraram maiores identidades com um mesmo isolado do *Bean golden mosaic virus*, proveniente do estado de Goiás e caracterizado por FARIA & MAXWELL (1990). Tal isolado é apontado por esses mesmos autores como o representante tipo da espécie no Brasil.

Outras seqüências de elevadas identidades foram encontradas para begomovírus que infectam plantas cultivadas como feijão caupi, tomate e batata e plantas invasoras como *Sida micrantha*, *Macroptilium* sp. e *Abutilon* sp. (Figura 14).

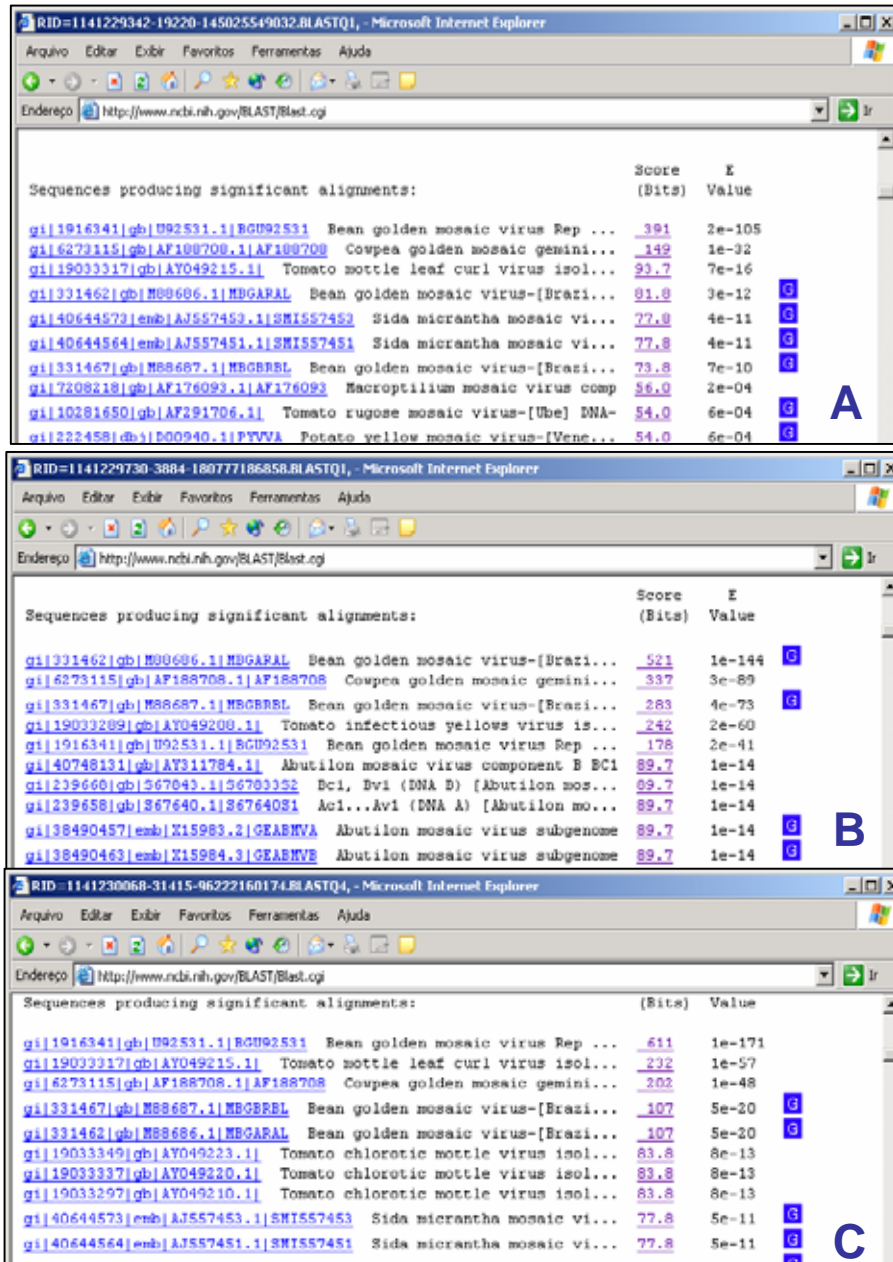


Figura 14. Seqüências depositadas no NCBI que apresentaram maiores idêntidades com as seqüências dos isolados caracterizados nesse estudo. A, B e C = isolados fava Maceió, fava Recife e fava União dos Palmares, respectivamente.

A comparação das seqüências nucleotídicas dos isolados Fava Maceió, Fava Recife e Fava União dos Palmares com as seqüências depositadas no NCBI permitiu a classificação dos mesmos na espécie *Bean golden mosaic virus*, uma vez que de acordo com as recomendações do ICTV (International Committee for Taxonomy of viruses) isolados de *Begomovirus* que apresentam seqüências de nucleotídeos com identidade igual ou superior a 90% devem ser agrupados na mesma espécie (PADIDAM *et al.*, 1995; VAN REGENMORTEL *et al.*, 2000; FAUQUET *et al.*, 2001).

O presente trabalho constitui no primeiro relato de infecção de fava pelo BGMV nos estados de Alagoas e Pernambuco. Em Alagoas LOPES *et al.* (2004) já haviam comunicado a ocorrência de infecção de fava por geminivírus, contudo os autores se restringiram à identificação ao nível de gênero, no caso *Begomovirus*. Contudo, o BGMV é um vírus muito comum na cultura do feijoeiro no Brasil, tendo sido relatado no estados de São Paulo, Goiás, Paraná, Minas Gerais, Bahia e Mato Grosso (FARIA & MAXWELL, 1999).

Comparações dois a dois revelaram altos níveis de identidades entre os isolados caracterizados nesse estudo e entre esses isolados e o BGMV, conforme ilustrado na Tabela 4. As identidades variaram de 90 a 94,4 %, indicando que todos os isolados são estirpes de uma mesma espécie (BGMV). FARIA & MAXWELL (1999) estudaram os begomovírus que infectam o feijoeiro no Brasil. Analisando vinte isolados provenientes de seis estados brasileiros concluíram que todos se tratavam do BGMV e que de um modo geral a identidade entre eles era superior a 95%.

Tabela 4. Identidades (%) entre os isolados de fava geradas pelo alinhamento das seqüências nucleotídicas no programa DNAMAN.

<b>Isolados</b>	<b>Fava Maceió</b>	<b>Fava Recife</b>	<b>Fava União</b>	<b>BGMV</b>
<b>Fava Maceió</b>	100 %	90,3 %	94,4 %	92,0 %
<b>Fava Recife</b>	90,3 %	100 %	92,0 %	93,0 %
<b>Fava União</b>	94,4 %	92,0 %	100%	90 %

Apesar das tentativas não foi possível obter seqüências com qualidade dos isolados provenientes de *Macrottilium* spp. para compará-los com os isolados de fava. No entanto, a partir dos padrões de restrição é provável que pelo menos dois desses isolados (*Macrottilium* Santana do Mundaú e *Macrottilium* União dos Palmares) pertençam a uma espécie distinta do BGMV. Os dados obtidos por IDRES et al. (2003) reforçam essa hipótese, pois sequenciando dois begomovírus de *Macrottilium* da Flórida e de Porto Rico os autores verificaram baixas identidades entre esses isolados e também entre esses isolados e o BGMV (de 76 a 81 %). Concluíram então que se tratavam de novas espécies e propuseram os nomes *Macrottilium yellow mosaic Florida virus* (MaYMFV) e *Macrottilium yellow mosaic Puerto Rico virus* (MaYMPRV), respectivamente.

Os dados do presente trabalho vêm confirmar os trabalhos de FARIA & MAXWELL (1999), que ressaltam a ampla distribuição do BGMV no Brasil. Contudo, esses autores trabalharam com o feijoeiro e no presente trabalho a hospedeira investigada foi a fava. Porém ambas as hospedeiras são muito relacionadas, classificando-se inclusive no mesmo gênero (*Phaseolus*). A ampla disseminação do BGMV em plantas de fava no estado de Alagoas e, no Brasil de um modo geral, pode ser explicada pela alta capacidade de dispersão do inseto vetor, o qual pode ser transportado de uma área para outra pelo vento AMBROZEVICIUS et al. (2002).

## 5. CONCLUSÕES

---

Os dados obtidos permitiram concluir que:

Os *Begomovirus* estão amplamente distribuídos em plantas de fava (*Phaseolus lunatus*) no estado de Alagoas;

Os dados de PCR-RFLP sugerem que infecções mistas estejam ocorrendo em algumas amostras estudadas nesse trabalho;

Dentre os isolados que infectam *Macroptilium* spp. incluídos no estudo é provável que alguns pertençam a espécie BGMV e portanto, possam infectar a fava;

As análises com as endonucleases de restrição revelaram alta diversidade genética entre os begomovírus, sendo separados cinco clados distintos;

Com base na seqüência de DNA foi possível identificar o begomovírus infectando plantas de fava como *Bean golden mosaic virus* (BGMV), um vírus muito comum na cultura do feijoeiro;

Este é o primeiro relato de *Bean golden mosaic virus* infectando plantas de fava nos estados de Alagoas e Pernambuco;

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. & WATSON, J.D. **Molecular Biology of the Cell**. 3 ed. New York: Garland Publishing, Inc., 1996.

AMBROZEVICIUS, L.P. Caracterização parcial de uma nova espécie de Begomovirus, e diversidade genética de geminivírus associados ao tomateiro no Sudeste do Brasil. (Dissertação Mestrado).Viçosa: UFV, 81p., 2000.

AMBROZEVICIUS, L. P.; CALEGÁRIO, R. F.; FONTES, E. P. B.; CARVALHO, M. G.; ZERBINI, F. M. Genetic diversity of begomovirus infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p.372-377, 2002.

ARAGÃO, F.J.L & FARIA, J.C. Obtenção de feijoeiro resistente ao vírus do mosaico dourado. Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia e Embrapa Arroz e Feijão (Trabalho). Brasília, 13 p, 2004. (Disponível em: [www.cnpaf.embrapa.br](http://www.cnpaf.embrapa.br), acesso 10 de dezembro de 2005).

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

ASHBY, M.K., WARRY, A.; BEJARANO, E.R., KHASHOGGI, A; BURRELL, M.; LICHTENSTEIN, C.P. Analysis of multiple copies of geminiviral DNA in the genome of four closely related *Nicotiana* species suggests a unique integration event. **Plant Molecular Biology**, v. 35, p. 313-321, 1997.

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

BEJARANO, E.R., KHASHOGGI, A; WITTY, M.; LICHTENSTEIN, C.P. Integration of multiple repeats of geminiviral DNA into the nuclear genome of tobacco during evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA, v.93, p.759-764, 1996.

BELLOWS, T.S.Jr; PERRING, T.M.; GILL, R.J.; HEADRICK, D.H. Description of species of *Hemisia* (Homoptera: Aleyrodidae). **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 87, p.195-206, 1994.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, 919p. 1995.

BIANCHINI, A. Resistance to Bean goleen mosaic virus in bean genotypes. **Plant Disease**, v. 83, p. 615-620, 1999.

BIRD, J.; MAROMOROSK, K. Viruses and virus disease associated with whiteflies. **Advances in Virus Research**, v. 22, p. 55-110, 1978.



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

BRIDDON, R.W.; MARKHAM, P.G. Family Geminiviridae. In: MURPHY, F.A., FAUQUET, C.M. BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.A.; JARVIS, A.W.; MARTELLI, G.P., MAYO, M.A., SUMMERS, M.D. Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on the Taxonomy of viruses. **Archives of Virology**, v. 10 (Supplementum), p.158-185, 1995.

BRIDDON, R.W.; BEDFORD, I.D.; TSAI, J.H.; MARKHAM, P.G. Analysis of the sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, Tomato pseudo-curly top virus, suggests a recombinant origin. **Virology**, v.219, p.378-394, 1996.

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

BROWN, J.K.; IDRIS, A.M.; FLETCHER, D.C. *Sinaloa tomato leaf curl virus*, a newly described geminivirus of tomato and pepper in west coastal Mexico. **Plant Disease**.v. 77, p. 1262, 1993.

BROWN, J.K. The **biology and molecular epidemiology of the Geminiviridae subgroup III**. G. STACEY and N. T. KEEN, EDS. *Plant Microbe Interactions*. New York. ITP. v.2, pp. 125-195, 1997.

BROWN, J.K.; PALMIERI, M.; DOYLE, M.M.; IDRIS, A.M.; MARTYN, R.D. Diversity of begomoviruses from vegetables, cotton and weeds in Guatemala and Honduras by viral coat protein sequence analysis (Abstr.) **Phytopathology** 92 (suppl.): S116, 2002.

CARRINGTON, J.C.; KASSCHAU, K.D.; MAHAJAN, S.K.; SCHAAD, M. Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. **Plant Cell**. v.8, p. 1669-1681, 1996.

CASTINEIRAS, L. Variabilidad de la semilla de *Phaseolus lunatus* L. en Cuba. **Revista del Jardín Botánico Nacional**. v.12, p.109-114, 1991.

COHEN, S.; DUFFUS, J.E.; LIU, H.Y. Acquisition, interference, and retention of cucurbit leaf curl viruses in witheflies. **Phytopathology**. v.79, p. 109-113, 1989.

CONTRIM, M.A.A.; KRAUSE-SAKATE, R.; NOBUIOSHI, N.; ZERBINI, F.M.; KOBORI, R.F.; PAVAN, M.A. Análise da diversidade genética de begomovírus em tomateiro no Centro-Oeste Paulista. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.S109, 2004.

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

COSTA, A.S. Increase in the populational density of *Bemisia tabaci*, a threat of widespread virus infection of legumes crops in Brazil. In Bird J. Maramorosch K. (eds) **Tropical diseases of legumes**. Academic Press, New York, p. 27-49. 1975.

COSTA, A.S. Whitefly-transmitted plant diseases. **Ann. Rev. Phytopathol.** V. 14, p. 429-449, 1976.

COSTA, C.L. Transmissão de Geminiviridae. In: Vetores de vírus de plantas-1. Insetos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v.6, p.133-134, 1998b.

COSTA, H.S.; BROWN, J.K. Variation in biological characteristics and in esterase patterns among populations of *Bemisia tabaci* (Genn.) and the association of one populations with silverleaf symptom development. **Entomology Experimental Applied**, v. 61, p.211-219, 1991.

DHAR, A.K.; SINGH, R.P. Geminivirus. In: SINGH, U.S.; SINGH, R.P.; KHOMOTO, K. (Eds). **Pathogenesis and host specificity in plant diseases**. Virus & Viroids. St. Paul: APS Press, p.289-309,1995.

**DNAMAN.6**. FARIA, J.C. Lynnon biosolt copyright Embrapa-CNPAP. DEMO. Brasil. 2005. Site: <http://www.lynnon.com/pc/framepc.html>. Visitado em 10 de janeiro de 2006.

EAGLE, P.A.; OROZCO, B.M.; HANLEY-BOWDOIN, L. A DNA sequence required for geminivirus replication also mediates transcriptional regulation. **Plant Cell**.v.6, p. 1157-1170, 1994.

FARIA, J.C.; GILBERTSON, R.L., HANSON, S.F., MORALES, F.J.; AHLQUIST, P.G.; LONIELLO, A.O., MAXWELL, D.P. Bean golden mosaic geminivirus Type II isolates from Dominican Republic and the Guatemala: Nucleotides sequences, infectious pseurecombinants, and phylogenetic relationships. **Phytopathology**. v.84, p. 321-329, 1994.

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

FARIA, J.C.; BEZERRA, I.C.; ZERBINI, F.M; RIBEIRO, S.G.; LIMA, M.F. Situação atual das geminiviroses no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, n.2, p.125-137,junho, 2000.

FARIA, J.C.; ZERBINI, F.M. Família Geminiviridae: Taxonomia, replicação e movimento. In: (LUZ, W.C.; FERNADES, J.M.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C.).**Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo: RAPP, 2000b. v.8, p.27-57.

FAUQUET, C. M.; BISARO, D. M.; BRIDDON, R. W.; BROWN, J.; HARRISON, B. D.; RYBICKI, E. P.; STENGER, D. C.; STANLEY, J. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the *Geminiviridae* family, and new updated list of *Begomovirus* species. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 2685-2692, 2001.

FAUQUET, C.M.; BISARO, D.M.; BRIDDON, R. W.; BROWN, J.; HARRISON, B. D.; RYBICKI, E. P. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the *Geminiviridae* family, and an updated list of *begomovirus* species, **Archives Virology**, v.148, p.405-421, 2003.

FERNANDES, J.J. **Caracterização e diversidade genética de geminivírus associados ao tomateiro na região do Triângulo Mineiro**. Viçosa, 2001. Tese (Doutorado em Fitopatologia). 163f. Universidade Federal de Viçosa, 2001.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. 2ª ed. Brasília: EMBRAPA-Cernagen, 220p. 1996.

FERREIRA, L.T. & ÁVIDOS, M.F.D. Mosca-branca: Presença indesejada no Brasil. **Biociência**, v. 4, p. 22-26, 1998.

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

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

FRANÇA, F.H.; VILLAS BÔAS, G.L. BRANCO, M.C. Ocorrência de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera: Aleyrodidae) no Distrito Federal. **An. Soc. Entomol. Brasil.**, v.25, n.2, p.369-372, 1996.

FRANÇA, F.H.; VILLAS BÔAS, G.L. BRANCO, M.C; MEDEIROS, M.A. Manejo integrado de pragas. In: **Tomate para processamento industrial**, Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, Embrapa Hortaliças, 2000, 168p.;il.

**FREETREE.** PAVLICEK, A, HRDA, S. & FLEGR, J.. Program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrapjackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Folia Biol (Prague)* 45, 1999.

FREITAS-ASTÚA, J.; PURCIFULL, D. E.; POLSTON, J.E. & HIEBERT, E. Traditional and transgenic strategies for controlling tomato-infecting begomoviruses. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.437-449, 2002.

FRISCHMUTH, T.; ENGEL, M.; LAUSTER, S.; JESKE, H. Nucleotide sequence evidence for the occurrence of tree distinct withefly-transmitted Sida-infecting bipartite geminiviruses in Central America, **J. Gen. Virol**, p. 2675-2682, 1997.

GÁLVEZ, G.E.; MORALES, F.J. Withefly-transmitted viruses. In : Schwartz, H.F. & PASTOR-CORRALES, M.A. (Ed.) **Bean production problems in the tropics**. 2 ed. Cali, CIAT, p.379-406, 1989.

GHANIM, M.; MORIN, S.; ZEIDAN, M., CZOSNEK, H. Evidence for transovarial transmission of *Tomato yellow leaf curl virus*. **Virology**. v. 240, p.295-303, 1998.

GARRIDO-RAMIREZ, E.R.; SUDARSHANA, M.R., GILBERTSON, R.L. *Bean golden yellow mosaic virus* from Chiapas, México: Characterization pseudorecombination with other bean-infecting geminiviruses and germplasm screening. **Phytopathology**.v. 90, p. 1224-1232, 2000.

GILBERTSON, R.L.; FARIA, J.C.; HANSON, S.F.; MORALES, F.J.; AHLQUIST, P; MAXWELL, P.; RUSSELL, D.R. Cloning of the complete DNA genomes of four bean-infecting geminiviruses and determining their infectivity by electric discharge particle acceleration. **Phytopathology**, v.81, n.9, p.980-985, 1991.

GILBERTSON, R.L.; HOU, Y.M.; GRIECO, P.D.; NOUEIRY, A. Análise molecular do movimento de vírus nas plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.1, 1993b.

GUEVARA-GONZÁLEZ, R.G.; RAMOS, P.L.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. Complementation of coat protein mutants of *Pepper huasteco geminivirus* in transgenic tobacco plants. **Phytopathology**, v.89, n.7, p.540-545, 1999.

GUTIERREZ,A.S.D.; FERRARI, P.R. Como vencer a mosca-branca no tomate. Centro de Qualidade em Horticultura do CEAGESP (Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo). São Paulo, Circular Técnica, n.1, outubro, 2002.

HANLEY-BOWDOIN, L.; ELMER, J.S.; ROGERS, S.G. Expression of functional replication protein from *Tomato golden mosaic virus* in transgenic tobacco plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**. v. 87, p.1446-1450, 1990.

HANSON, S.F.; HOOGSTRATEN, R.A.; AHLQUIST, P.; GILBERTSON, R.L.; RUSSELL, D.R.; MAXWELL, D.P. Mutational analysis of a putative NTP-binding domain in the replication-associated protein (AC1) of Bean Golden Mosaic Geminivirus. **Virology**, n.211, p. 1-9, 1995.

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

HÖFFER, P.; BEDFORD, I.D.; MARKHAM, P.G.; JESKE, H.; FRISCHMUTH, T. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. **Virology**, v.236, n.2, p. 288-295, 1997.

HOU, Y.M.; GILBERTSON, R.L. Increased pathogenicity in a pseudorecombinant bipartite geminivirus correlates with intermolecular recombination. **Journal of Virology**. v.70, p. 5430-5436, 1996.

HOWARTH, A.J.; CATON, J.; BOSSERT, M.; GOODMAN, R.M. Nucleotide sequence of Bean golden mosaic virus and a model for gene regulation in Geminiviruses. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA. v., 82, p. 3572-3576, 1985.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola Municipal: Culturas temporárias e permanentes., Rio de Janeiro, v.31, p.1-133, 2004. Disponível, (<http://www.ibge.gov.br/home/estatística/economia/pam/2004/pam2004pdt>, acesso em janeiro 2006).

IDRIS, A.M.; HEIBERT, E.; BIRD, J.; BROUWN, J.K. Two newly described begomoviruses of *Macroptilium* and common bean. **Phytopathology**, v.93, p.774-783, 2003.

JEFFREY, J.L.; POOMA, W.; PETTY, I.T.D. Genetic requirements for local and systemic movement of *Tomato golden mosaic virus* in infected plants. **Virology**, v.233, p.208-218, 1996.

KARNOPP, L. M. **Caracterização molecular, seqüenciamento de geminivírus em tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) e estudo de marcadores para a resistência à virose.** Recife, 2001. Tese (Doutorado em Genética). 94f. Universidade Federal de Pernambuco, 2001.

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

LAUFS, J.; JUPIN, I; DAVID, C.; SCHUMACHER, S.; HEYRAUD-NITSCHKE, F.; GRONENBORN, B. Geminivirus replication: genetic and biochemical characterization of Rep protein function, a review. **Biochimie**, v.77, p.765-773, 1995.

LAZAROWITZ, S.G.; LAZDINS, I.B. Infectivity and complete nucleotide sequence of the cloned genomic components of a bipartite squash leaf curl geminivirus with a broad host range phenotype. **Virology**. v.180, p. 58-69, 1991.

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

LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B.D.; MACKINDER, B.A.; LOCK, J.M. **Legumes of the world**, Royal Botanic Gardens, Kew, United Kingdom, 2003.

LIMA, J.A.; GONÇALVES, M.F.B.; OLIVEIRA, V.B.; TORRES FILHO, J.; MIRANDA, A.C.M.M. Serological and PCR detectoin of a Begomovirus infecting tomato fields in Ibiapaba Moutain, Ceará. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, n.1, p. 104-108, março, 2000.

LIMA, M.F.; BEZERRA, I.C., RIBEIRO, S.G., AVILA. A.C. Distribuição de geminivírus nas culturas de tomate e pimentão em doze municípios de Submédio do Vale do São Francisco. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 81-85, 2001a.

LIMA, G. S. A; SILVA, C. A; VIANA, T. H. P.; ASSUNÇÃO, I. P.; RESENDE, L. V.; GALLINDO, F.; FREITAS, N. S. Detection and partial characterization of geminiviruses associated to weeds in the state of Pernambuco. **Virus Reviews & Reaserch**, v.6, p. 158, 2001b.

LIMA, J.S. & FARIA, J.C. Feijoeiro expressando o gene *Rep* do vírus do mosaico dourado apresenta menor incidência da doença. VIII CONAFE – Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão. Goiânia, 18 a 20 outubro de 2005, nº 0055. Disponível ([www.cnpaf.embrapa.br/conafe/pdf/conafe](http://www.cnpaf.embrapa.br/conafe/pdf/conafe) 2005).



LISTIK, A.F. Detecção e análise da diversidade genética de *Begomovirus* que infectam plantas invasoras na região Nordeste. Rio Largo, 2004. (Dissertação Mestrado), 44f. Universidade Federal de Alagoas, 2004.

LIU, L.; VAN TONDER, T.; PIETERSEN, G.; DAVIES, J.W.; STANLEY, J. Molecular characterization of a subgroup I geminivirus from a legume in South Africa. **Journal of General Virology**, v.78,n.8, p.2113-2117, 1997 a.

LOPES, A.C.P.A.; BARROS, M.C.S.; SILVA, S.J.C, ASSUNÇÃO, I.P.; LIMA, G. S. A., DENISE. SILVA, D.M.W; RAMALHO NETO, C.E. Ocorrência de *Begomovirus* em fava no Estado de Alagoas. Anais: VII REUNIÃO NACIONAL DA SBBp e 2<sup>nd</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM IN BIOCHEMISTRY OF MACROMOLECULES AND BIOTHECHNOLOGY – SBBq, Recife: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular / Secretaria Regional de Pernambuco,UFPE, período 17 a 19/11/2004, p. 62.

LUCAS, W.J.; GILBERTSON. R.L. Plasmodesmata in relation to viral movement within leaf tissues. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, p. 387-411, 1994.

LYMMAN, J.M. Adaptation studies on lima bean accessions in Colombia. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 108, n.3, p. 369-373, 1983.

McCLEAN, P.; KAMU, J.; GEPTS, P. Genomics and genetic diversity in common bean. In: Legume Crop Genomics, AOCS Press, Champaign, Illinois. Cap. 4, p. 61-82, 2005.

MAYO, M.A., PRINGLE, C.R. Virus taxonomy: **Journal of General Virology**, v.79, p.649-657, 1997.

MELLO, R.N. **Begomovírus em soja no Brasil, e ferramentas moleculares para sua identificação**. Viçosa, 2002. Tese. (Doutorado em Fitopatologia). 64f. Universidade Federal de Viçosa. 2002.

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

MORALES, F.J.; ANDERSON, P.K. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. **Archives of Virology**, New York, v.146, n.3, p. 415-441, 2001.

MORIN, S., GHANIM, M; ZEIDAN, M; CZOSNEK, H; VERBEEK, M. & VAN DEN HEUVELT, F.J.M. A Groel homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl. **Virology**, v. 256, p. 75-84, 1999.

MUNIYAPPA, V.; VENKATESH, H.M.; RAMAPPA, H.K.; KULKARNI, R.S.; ZEIDAN, M.; TARBA, C.Y.; GHANIM, M.; CZOSNEK, H. Tomato leaf curl virus from Bangalore (ToLCV-Band 4): sequence comparison with Indian isolates, detection in plants and insects, and vector relationships. **Archives of Virology**, v. 145, p. 1583-1598, 2000.

NAGAR, S.; PEDERSEN, T.J.; CARRICK, K.M. HANLEY-BOWDOIN, L. ROBERTSON, D. A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plan cells. **Plant Cell**. v. 7, p. 705-719, 1995.

NATESHAN, H.M.; MUNIYAPPA, V.; SWANSON, M.M.; HARRINSON, B.D. Host range, vector and serological relationships of cotton leaf curl virus from southern India. **Annual Applied Biology**, v.28, p. 233-244, 1996.

NAVA-CAMBEROS, U.N.; RILEY, D.G.; HARRIS, M.K. Temperature and host plant effects on development, survival, and fecundity of *Bemisia argentifolli* (Homoptera: Aleyrodidae). **Enviromental Entomology**, Lanhan, v.30, p.55-63, 2001.

NCBI. National Center of Biothecnology Information. Disponível (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Acesso em 5 de janeiro de 2006.

NOUEIRY, A.O.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. **Cell**. v. 76, p. 925-932, 1994.

OLIVEIRA, M.R.V.; HENNEBERRY, T.J.; ANDERSON, P. History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*, **Crop Protection**, Surrey, UK, v. 20, p. 709-723, 2001.

OLIVEIRA, A.P.; ALVES, E.U.; ALVES, A.U.; DORNELAS, C.S.M.; SILVA. J.A.; PÔRTO, M.L.; ALVES, A.V. Produção de feijão-fava em função de doses de fósforo em um Neossolo Regolítico. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n.3, p. 543-546, jul-set 2004.

OROZCO, B.M.; HANLEY-BOWDOIN, L. A DNA structure is required for geminivirus replication origin function. **Journal of Virology**, v. 70, p.148-158, 1996.

PADIDAM, M.; BEACHY, R.N.; FAUQUET, C.M. Classification and identification of Geminiviruses using sequence comparisons. **Journal of General Virology**, v.76, n.2, p.249-263, 1995.

PALMER, K.E. & RYBICKI, E.P. The molecular biology of mastreviruses. **Advances in Virus Research**, v. 50, p. 183-234, 1998.

PAPLOMATAS, E.J.; PATEL, V.P.; HOU, Y.M.; NOUEIRY, A.O; GILBERTSON, R.L. Molecular characterization of a new sap-transmissible bipartitr genome geminivirus infecting tomatoes in Mexico. **Phytopathology**, v. 84,n.10,p.1215-1224, 1994.

PETTY, I.T.D.; COURTS, R.H.A.; BUCK, K.W. Geminivirus coat protein promoter sequences can function in *Escherichia coli*. **Nucleic acids Reasearch**, v.14, p. 5113-5125, 1986.

PICÓ, B.; DÍEZ, M.J.; NUEZ, F. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The *Tomato yellow leaf curl virus* – A review. **Scientia Horticulturae**. v. 67, p. 151-196, 1996.

PILARTZ, M & JESKE, H. Mapping of Abutilon mosaic geminivirus minichromosomes. **J. Virol.**, v. 77, p. 10808-10818, 2003.

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

POLSTON, J.E.; ANDERSON, P.K. The emergence of whitefly-transmitted Geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Disease*, v.81, p.1358-1369, 1997.

RIDGEN, J.E.; DRY, I.B.; KRAKE, L.R.; REZAIAN, M.A. Plant virus DNA replication processes in *Agrobacterium*: insight into the origins of Geminiviruses? **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.93, p. 10280-10284, 1996.

ROJAS, M.R.; GILBERTSON, R.L.; RUSSELL, D.R.; MAXWELL, P. Use of degenerated primers in the Polymerase Chain Reaction to detect whitefly-transmitted Geminiviruses. *Plant Disease*, v.77, n.4, p. 340-347, 1993.

ROYE, M.E.; WERNECKE, M.E.; MCLAUGHLIN, W.A., NAKHLA, M.K., MAXWELL, D.P. *Tomato dwarf leaf curl virus*, a new bipartite geminivirus associated with tomatoes and peppers in Jamaica and mixed infection with *Tomato yellow leaf curl virus*. **Plant Pathology**. v. 48, p. 370-378, 1999.

RYBICKI, E.P. A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of Geminiviridae. **Arch. Virol.**, v.139, n. 1-2, p.49-77, 1994.

SANTOS, D.; CORLETT, F.M.F.; MENDES, J.E.M.F.; WANDERLEY JÚNIOR, J.S.A. Produtividade e morfologia de vagens e sementes de variedades de fava no Estado da Paraíba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 37, n. 10, p. 1407-1412, out. 2002.

SANTOS, C.D.G.; ÁVILA, A.C.; RESENDE, R.O. Estudo da interação de um begomovírus isolado de tomateiro com a mosca branca. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n.6, p. 644-673, nov-dez, 2003.

SAUDERS, K.; BEDFORD, I.D.; STANLEY, J. Pathogenicity of a natural recombinant associated with Agerantum yellow vein diseases: Implications for Geminivirus evolution and disease aetiology. **Virology**, v. 282, p. 38-47, 2001.

SAUER, J.D. Historical geography of crop plants – a select roster. CRC Press, Boca Raton, Florida. 1993. Disponível em : <[http:// www.museums.org.za](http://www.museums.org.za)>, acesso 24 de novembro de 2005).

SCHUSTER, D.J.; STANSLY, P.A.; POLSTON, J.E. Expressions of plants damage by *Bemisia*., p. 153-165. In: GERLING, D. & MAYER, R.T. (eds.), *Bemisia* : Taxonomy, biology, control and management, Andover, Intercept, 648 p., 1996.

SINESTERRA, X.H.; POLSTON, J.E.; ABOUZID, A.M.; HIEBERT, E. Tobacco plants transformed with a modified coat protein of tomato mottle begomovirus show resistance to vírus infection. **Phytopathology**, v.89, n.8, p.701-706, 1999.

STANLEY, J. Analysis of *African cassava mosaic virus* recombinants suggests strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. **Virology**. v. 206, p. 707-712, 1995.

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

**TREEVIEW X**. RODERIC, D. M. Tree drawing software for Apple Macintosh and Microsoft Windows. Division of Environmental and Evolutionary Biology Institute of Biomedical and Life Sciences University of Glasgow, Glasgow G12 8QQ, Scotland, UK. 2000. Site <http://darwin.zoology.gla.ac.uk/%7Erpage/treeviewx/> Visitado em 10 de janeiro de 2006

VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; McGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R.B. **Virus taxonomy: seventh report of the International Committee of Taxonomy of Viruses**. Amsterdam:Academic Press, 2000. 809p.

VIEIRA, R.F. A cultura do feijão-fava. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 16, n.174, p. 30-37, 1992.

VILLAS-BÔAS, G. L.; FRANÇA,F.H.; ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C. Manejo Integrado da Mosca Branca, *Bemisia argentifolii*. Brasília. EMBRAPA-CNPQ. Circular Técnica, n.9, 1997.

VILLAS-BÔAS, G. L.; FRANÇA,F.H.; NEWTON, M.; ELIAS, M.F. Predominância do biótipo B de mosca branca (*Bemisia argentifolii*) em diversos hospedeiros e regiões do Brasil. Anais, 8º Encontro Latino-Americano e do Caribe Sobre Moscas Brancas e Geminivirus, Recife, 1999. p. 150.

YAGUIU, A.; MACHADO-NETO, N.B.; CARDOSO, V.J.M. Grouping of Brazilian accesses of lima beans (*Phaseolus lunatus* L.) according to SDS-PAGE patterns and morfological characters. **Acta Scientiarum Agronomy**. Maringá, v. 25, n. 1, p. 7-12, 2003.

SILVA, S. J. C. Detecção, caracterização molecular e diversidade genética de *Begomovirus* que infectam fava (*Paseoulus*.....

ZERBINI, F.M.; CARVALHO, M.G.; MACIEL-ZAMBOLIN, E. **Introdução à Virologia Vegetal**. Viçosa:Editora UFV, 2002. 145p.

ZHOU, X.F.; LIU, Y.L.; ROBINSON, D.I.; HARRISON, B.D. Four DNA-a variants among Pakistani isolates of cotton leaf curl virus and their affinities to DNA-A of Geminivirus isolates from okra. **Journal of General Virology**, v.79, p. 915-928, 1997.

ZIMMERMANN, M.J.O; TEIXEIRA, M.G. Origem e evolução. In: ARAÚJO, R.S.; RAVA, C.A.;STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J.O.(Coord.). **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: Potafos,. p. 57-70,1996.