

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR PARCIAL DE BEGOMOVÍRUS
INFECTANDO *Manihot esculenta* E PLANTAS DANINHAS
ASSOCIADAS À CULTURA**

ADRIANA FIUZA DOS SANTOS SILVA

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
JANEIRO - 2014**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR PARCIAL DE BEGOMOVÍRUS
INFECTANDO *Manihot esculenta* E PLANTAS DANINHAS
ASSOCIADAS À CULTURA**

ADRIANA FIUZA DOS SANTOS SILVA

AGRÔNOMA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA, 2011

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Dr. Eduardo Chumbinho de Andrade

Coorientador: Dr. Paulo Ernesto Meissner Filho

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

JANEIRO - 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

S586 Silva, Adriana Fiuza dos Santos.

Identificação molecular parcial de begomovírus infectando *Manihot esculenta* e plantas daninhas associadas à cultura. / Adriana Fiuza dos Santos Silva. – Cruz das Almas, BA, 2014.

62 f.: il.

Orientador: Eduardo Chumbinho de Andrade.

Coorientador: Paulo Ernesto Meissner Filho

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1. Begomovírus 2. Mandioca 3. Vírus I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia II. Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas III. Título.

CDD 571.9 (21 ed.)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
Adriana Fiuza dos Santos Silva

Dr. Paulo Ernesto Meissner Filho
Embrapa Mandioca e Fruticultura
(Co-Orientador)

Dr. Emanuel Felipe Medeiros Abreu
Embrapa Mandioca e Fruticultura

Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira
Embrapa Mandioca e Fruticultura

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
JANEIRO - 2014

“É melhor ser sábio que ser forte, e o conhecimento vale mais que a força. É com estratégias que se faz a guerra, e a vitória depende do número de conselheiros.”

(Sabedoria 24, 21)

" ... O mundo está nas mãos daqueles que tem a coragem de sonhar e correr o risco de viver seus sonhos ..."

(Paulo Coelho)

À Deus, à minha Família e ao meu esposo,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo Dom da vida, por ter sido minha força em todo o caminho percorrido me carregando no colo nos momentos mais difíceis do percurso.

Ao programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos no decorrer do curso de Mestrado.

Aos professores do Mestrado em Microbiologia Agrícola, por compartilhar os seus conhecimentos e experiências profissionais, me orientando nessa nova etapa da vida.

Ao Dr. Eduardo Chumbinho de Andrade, meu orientador, pelos ensinamentos passados durante todo esse tempo de pesquisa, fundamentais para minha formação. Obrigada pela paciência, atenção, confiança e compreensão.

Ao Emanuel, por ter me adotado e pelo conhecimento transmitido, fazendo de mim uma profissional ainda melhor e, em vários momentos me ajudando a alcançar esse sonho.

Ao Dr. Paulo Meissner pela disponibilidade e atenção comigo sempre que precisava, sanando dúvidas e me orientando em algumas questões administrativas do programa de Pós-Graduação.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura pela concessão do espaço e toda infraestrutura necessária ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu esposo, Ednaldo, por todo amor, carinho, dedicação, compreensão e paciência. Por está ao meu lado nos diversos momentos de decisão, me incentivando a seguir em frente e me mostrando o quanto eu sou capaz de vencer. Obrigado pela força nos momentos de fraqueza e pelas palavras de encorajamentos quando o desespero me invadia.

Aos meus pais Paulino e Lucília pelo imenso amor, dedicação e pelas orações para que eu vencesse mais essa batalha.

Aos meus irmãos Paulo, Gilmário e Gilmar pela mão estendida nos momentos difíceis, pelo cuidado e carinho comigo.

Aos meus sobrinhos Manuelle e Yran, que em vários momentos me ajudaram a vencer as dificuldades, a tristeza e o desânimo me proporcionando alegria.

A todas as minhas amigas pelo carinho, pelas palavras de coragem, por acreditarem em mim e por entenderem as várias vezes que não pude estar com elas por que estava ocupada com os estudos. Muito obrigada!

A todos os tios e tias que se preocuparam comigo, torceram pelo meu sucesso e compreenderam a minha ausência.

Aos colegas de curso que se preocuparam, torceram por mim e me acompanharam nessa jornada.

A todos do laboratório de Virologia Vegetal da Embrapa Mandioca e Fruticultura: Karinna, Keilla, Cleidiane, Danilo, Alessandra, Camila, Almir, João Paulo, Taylane, Daniela, Taylan, Márcio, Andreia, obrigado pelo carinho, pelo ombro amigo nos momentos difíceis, pela mão amiga na hora do trabalho pesado e pelos conselhos nos momentos de indecisão.

A técnica Cícera, pela contribuição e incentivo nos momentos finais.

Aos técnicos do Laboratório de Biologia Molecular, Raimundo e Vanderson, pelo subsídio nos momentos necessitados, por sanar dúvidas e empréstimos de materiais sempre que solicitado.

A CAPES, pelo auxílio financeiro concedido, fundamental para alcançar os resultados finais.

A todos que direto ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho, o meu “muito obrigada”.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO	1
Revisão de literatura	4
A cultura da mandioca	4
Viroses associados à cultura	5
Família <i>Geminiviridae</i>	6
Aspectos taxonômicos	9
Cassava mosaic disease – CMD	10
Begomovirus em plantas daninhas no Brasil	13
Mecanismos de diversidade genética de begomovírus	15
REFERÊNCIAS	18
CAPÍTULO 1	27
Identificação molecular parcial de begomovirus infectando <i>Manihot esculenta</i> e plantas daninhas associadas à cultura	27
ABSTRACT	28
INTRODUÇÃO	29
MATERIAIS E MÉTODOS	30
RESULTADOS	35
DISCUSSÃO	46
CONCLUSÕES	49
PERSPECTIVAS FUTURAS	50
REFERÊNCIAS	51
FIRST REPORT	54

RESUMO

SILVA, A. F. S. Identificação molecular parcial de begomovírus infectando *Manihot esculenta* e plantas daninhas associadas à cultura.

O gênero *Begomovirus* (Fam. *Geminiviridae*) engloba espécies de vírus que possuem o genoma composto de DNA fita simples circular. Os begomovírus são de grande importância econômica em função das elevadas perdas causadas, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Além disso, diversas espécies de begomovírus já foram isolados de plantas daninhas, que podem funcionar como um reservatório natural de begomovírus para as plantas cultivadas. As doenças causadas por begomovírus no Brasil têm atingindo níveis crescentes de incidência e severidade devido a gama de hospedeiros do biótipo B da mosca-branca (*Bemisia tabaci*), o que facilita a transferência de begomovírus de plantas daninhas às cultivadas. Foram identificadas quatro plantas de mandioca pertencentes aos acessos 90, 520, 1209 e 1363 do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), com begomovírus. A presença de begomovírus em mandioca no Brasil se configura em fato ainda não reportado, fazendo-se necessário a sua caracterização. A sequência parcial do DNA-A dos isolados obtidos destas plantas indicou a presença de duas espécies. Os isolados BGV-90 e BGV-1209 apresentam 93 e 95% de identidade com o *Leonurus mosaic virus* (LeMV) e os isolados BGV-520 e BGV-1363 apresentam 95 e 90% de identidade com o *Passionfruit severe leaf deform virus* (PSLDV). A identificação molecular parcial de begomovírus em plantas daninhas associadas à cultura da mandioca indicou a presença de seis espécies diferentes já descritas no Brasil, e dois isolados, P-175 e P-271 representam possíveis novas espécies. A detecção do LeMV em plantas de *Leonurus* e em duas espécies de maracujá evidencia que o vírus está presente tanto em plantas cultivadas quanto em daninhas. Além disso, as análises mostraram que o maracujá, pode ser hospedeiro tanto do LeMV quanto do PSLDV.

Palavras-chave: Mandioca, *Geminivirus*, detecção.

ABSTRACT

SILVA, A. F. S. Partial molecular identification of begomoviruses infecting *Manihot esculenta* and crop associated weeds.

The *Begomovirus* genera (Fam. *Geminiviridae*) include species that have circular single-stranded DNA genome. The begomoviruses have an economic importance due to the high losses caused, mainly in tropical and subtropical regions. In addition, several begomoviruses species have been isolated from weeds plants, which could act as a natural reservoir. Diseases caused by begomoviruses in Brazil are reaching higher incidence and severity due to biotype B of the whitefly (*Bemisia tabaci*), which has a wide host range, facilitating the transfer of begomoviruses from weeds to cultivated plants. Begomoviruses were detected four plants of cassava, representing the accessions 90, 520, 1209 and 1363 of the Cassava Germplasm Bank (BAG) from Embrapa Cassava and Fruits (CNPMPF). The presence of begomoviruses in cassava in Brazil was not reported until now, making its characterization necessary. The partial sequence of DNA-A of the isolates obtained from these plants indicated the presence of two species. The isolates BGV-90 and BGV-1209 share 93 and 95 % identity with *Leonurus mosaic virus* (LeMV), respectively and the isolates BGV-520 and BGV-1363 share 95 and 90 % identity with *Passionfruit deform severe leaf virus* (PSLDV), respectively. Partial molecular characterization of begomoviruses in weeds associated with cassava indicated a large number of species. In twelve samples, we found possibly six species already described in Brazil and two isolates, P -175 and P -271 could represent new species. The detection of LeMV in *Leonurus* plants and two species of passion fruit show that the virus is able to infect weed and crops and its present in cassava plantations. Furthermore, the analysis shows that passion fruit can be a host of both virus, LeMV and PSLDV.

Keywords: Cassava, *Geminivirus*, detection.

INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma importante fonte de energia para consumo humano e desempenha um papel importante na agricultura de subsistência e na segurança alimentar, pois produz mesmo com poucos insumos e tolera condições de clima seco (FAO, 2013a).

O Brasil se destaca pela expressiva produção agrícola, sendo atualmente o segundo maior produtor mundial de mandioca, com 23,04 milhões de toneladas, atrás apenas da Nigéria e Indonésia com 54 e 23,9 milhões de toneladas produzidas em 2012 (FAO, 2013b).

O cultivo dessa cultura é realizado em todas as regiões do Brasil. A região Nordeste é responsável por 26,12% da produção nacional, e a Bahia é o terceiro maior estado produtor de mandioca, com 9,55% da produção nacional (IBGE, 2012).

Como outras culturas, a mandioca é vulnerável a pragas e doenças que podem causar grandes perdas de rendimento. Em algumas regiões, a incidência de doenças está aumentando à medida que é cultivada de maneira mais intensiva, ocupa maior extensão de área e permanece no campo o ano todo (FAO, 2013a). Entre os fitopatógenos, as viroses se destacam a nível nacional e mundial. Muitos são os vírus já detectados na cultura da mandioca, porém os de maior importância econômica são: o vírus do mosaico comum (*Cassava common mosaic virus*, CsCMV), o vírus do mosaico das nervuras (*Cassava vein mosaic virus*, CsVMV), o vírus do “couro-de-sapo” (“*Cassava Frogskin disease*”, CFSD) (CALVERT et al, 2012), além dos vírus do mosaico africano da mandioca (*African cassava mosaic virus*, ACMV) e o *Cassava brown streak virus* (CBSV), presentes apenas na África, e consideradas pragas quarentenária A1 pelo Ministério da Agricultura do Brasil.

Os geminivirus têm despertado grande interesse devido ao aumento da incidência e severidade de doenças por eles causadas nas últimas décadas (POLSTON & ANDERSON, 1997; FARIA & ZERBINI, 2000; MORALES & ANDERSON, 2001). A família *Geminiviridae* é constituída por vírus com genoma composto de DNA circular fita simples, de 2,5 a 3,0 kb, encapsidado por uma única proteína estrutural que confere à partícula uma morfologia icosaédrica

geminada, de aproximadamente 18 a 30 nm (KING et al., 2012). A família é composta por sete gêneros, definidos com base no tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros e organização do genoma (ICTV, 2013).

Os begomovirus, são transmitidos pela mosca-branca (*Bemisia tabaci*) a espécies dicotiledôneas, e compreende alguns dos principais patógenos de plantas em regiões tropicais e subtropicais do globo, afetando culturas como: feijoeiro, soja, tomateiro, fumo, algodão e mandioca, bem como em plantas invasoras e ornamentais (MORALES & ANDERSON, 2001; MORALES & JONES, 2004). Dentre os begomovírus de maior importância econômica pode-se citar o *Bean golden mosaic virus* (BGMV), o ACMV, o *Cotton leaf curl virus* (CLCV) e o *Tomato yellow leaf Curl virus* (TYLCV) (MORIONES & NAVAS-CASTILLO, 2000; WERE et al., 2004).

A origem dos begomovírus que infectam a mandioca na África é desconhecida. A mandioca foi originalmente domesticada na América Central, no entanto, CMD é causada por begomovírus africanos, incluindo o ACMV e *East African cassava mosaic virus* (EACMV), que presumivelmente co-evoluíram com plantas nativas antes de infectar a mandioca. Epidemias de CMD são relatadas na África desde o início do século 20, e atualmente se encontra disseminada por quase todo o continente africano (LEGG & FAUQUET, 2004; BULL et al., 2006; FARGETTE et al., 2006).

No Brasil, até o início da década de 90, o único begomovírus de importância econômica era o BGMV (FARIA et al., 2000), entretanto a partir dos anos 90 epidemias de begomovírus passaram a ser relatadas na cultura do tomateiro (RIBEIRO et al., 1994). Especificamente no caso do tomateiro, a explosão de begomovírus no Brasil se deu após a introdução do biótipo B da mosca-branca, que possui uma ampla gama de hospedeiros, foi a responsável por transmitir para o tomateiro, os begomovírus presentes nas espécies de daninhas.

Entretanto, apesar da mandioca ser cultivada em todas as regiões do Brasil, fato similar ao do tomateiro ainda não ocorreu. O que se especula é que a ausência de begomovírus em mandioca na América do Sul como um todo, é em parte devido à inabilidade da mosca-branca, *B. tabaci* em colonizar eficientemente a mandioca (COSTA & RUSSELL, 1975; BELLOTTI & ARIAS, 2001). Contudo,

relatos de colonização de mandioca pelo biótipo B de *B. tabaci* no Brasil (OLIVEIRA & LIMA, 2006.), bem como estudos que demonstram a capacidade de populações *B. tabaci* proveniente de outros hospedeiros em se adaptar a mandioca (*M. esculenta*) demonstraram que é plausível afirmar que a mandioca pode representar, em um futuro próximo, um hospedeiro adequado para *B. tabaci* (CARABALI et al., 2005).

Estes fatos indicam a possibilidade de uma adaptação gradual de *B. tabaci* à mandioca, e a partir deste evento, possa-se iniciar a introdução de begomovírus presentes em espécies cultivadas ou daninhas, à mandioca. Cabe lembrar que no Brasil já foi caracterizado a espécie de begomovírus *Euphorbia mosaic virus*, EuYMV (FERNANDES et al., 2011) isolado de *Euphorbia heterophylla*, planta daninha da mesma família da mandioca.

O trabalho de indexação do BAG-mandioca do CNPMF envolve a identificação visual de acessos apresentando sintomas de infecção por vírus, seguido da realização de testes diagnósticos para a confirmação da presença de vírus já descritos em mandioca no Brasil. Entretanto, apesar de não terem sido relatados a presença de begomovírus em mandioca no Brasil, as plantas são testadas para a presença deste vírus.

Recentemente, quatro acessos (90, 520, 1209 e 1363) do Banco Ativo de Germoplasma (BAG-mandioca) apresentando sintomas de infecção viral foram analisadas por RCA-PCR, confirmando a presença de begomovírus nestes acessos, um fato inédito no Brasil. Diante desta descoberta, o objetivo deste trabalho foi realizar a identificação molecular parcial destes begomovírus, bem como identificar begomovírus presentes em plantas daninhas associadas a cultura da mandioca.

REVISÃO DE LITERATURA

A cultura da mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta pertencente a ordem Malpighiales, da família *Euphorbiaceae*. Ela é originária da América do Sul, mas é cultivada mundialmente em cerca de 16 milhões de hectares (EL SHARKAWY et al., 2008). A cultura apresenta a capacidade de se adaptar aos mais diferentes agroecossistemas e condições edafoclimáticas (FUKUDA et al., 2006). Encontra-se entre os alimentos mais importantes colhidos no Brasil, superada apenas pelas culturas da soja, trigo, arroz e milho (IBGE, 2013).

Segundo a FAO, a raiz da mandioca e seus subprodutos são consumidos por mais de 800 milhões de pessoas. Em algumas regiões do mundo, como no Nordeste brasileiro, em Gana e na Nigéria (na África) e em algumas ilhas da Indonésia (na Ásia), mais de 70% das calorias consumidas diariamente pela população vêm da mandioca. Entre todas as culturas, a mandioca é apontada por diversos estudos científicos como a que produz maior quantidade de calorias, a de maior eficiência biológica como produtor de energia e a de melhor adaptação a solos deficientes em nutrientes (NASSAR, 2006).

A Nigéria, Indonésia e Brasil são os maiores produtores de mandioca, com respectivamente, 54, 23,9 e 23,04 milhões de toneladas produzidas em 2012 (FAO, 2013b). O cultivo dessa cultura é realizado em todas as regiões do Brasil, o Nordeste é responsável por 26,12% da produção nacional, com uma produtividade de 8,41 t/ha. Os principais estados produtores em 2012 foram Pará (20,04%), Paraná (16,79%), Bahia (9,55%), Maranhão (6,64%) e São Paulo (5,88%) (IBGE, 2012).

A cultura da mandioca é considerada de baixo valor agregado, destinada ao processamento de alimentos baratos para camadas mais pobres da população no Brasil, mas vem passando por profunda mudança desde os anos 2000. A mandioca, impulsionada pela produção de fécula nos estados do Paraná, Mato Grosso do Sul e São Paulo, associou-se à criação de empregos no meio rural, com possível reversão do êxodo característico de muitas regiões do interior do Brasil (VILPOUX, 2010).

A mandioca é utilizada para a produção de farinha, extração de amido e para o consumo *in natura*, tendo importante papel na alimentação humana e animal e para a industrialização (SOARES et al., 2009), além da geração de empregos e de renda. É considerada uma cultura estratégica para o produtor, já que permite colheita em diferentes meses, podendo ser colhida a partir do oitavo mês.

No Brasil, apesar de estar ocorrendo atualmente um aumento do interesse de grandes empresários no cultivo da mandioca, com a finalidade de produzir amido, ainda é uma espécie cultivada principalmente por agricultores familiares (87%), especialmente nas regiões Norte e Nordeste. Isto ocorre devido às características da planta, as atividades do plantio e ao processamento que ainda são realizadas manualmente, e desse modo é uma cultura que emprega muita mão-de-obra. Na produção de farinha e fécula, estima-se que são gerados, no Brasil, um milhão de empregos diretos (FAO, 2013a).

A propagação da mandioca é feita de maneira vegetativa, utilizando-se para o plantio pequenos segmentos do caule (manivas). Essa forma de plantio tem a vantagem de se utilizar a própria planta colhida como material propagativo para o plantio seguinte, de manter as características morfológicas e agrônômicas originais. No entanto, apresenta três fatores limitantes: o primeiro é a baixa taxa de multiplicação das manivas-sementes. Algumas plantas, mais vigorosas, chegam a produzir até 10 manivas de 20 cm, mas, em média, uma planta adulta dá origem a cinco manivas de 20 cm com boa qualidade para o plantio comercial (MATTOS et al, 2001). O segundo fator limitante, observado ao longo de plantios sucessivos da mesma maniva, é a redução da qualidade da mesma ocasionada pelo acúmulo de pragas e doenças, que se transmitem de geração a geração e se refletem no decréscimo de produtividade da lavoura. E, finalmente, a maniva da mandioca se constitui em um excelente veículo de disseminação de pragas e doenças dentre e entre regiões (FUKUDA, et al., 2006).

Viroses associados à cultura

A ocorrência de doenças é um dos fatores limitantes na produção de mandioca, sobretudo nas regiões favoráveis a seu desenvolvimento. A mandioca

pode ser infectada por mais de 30 fitopatógenos diferentes, como bactérias, fungos, vírus e fitoplasma. Dentre as doenças da cultura da mandioca no Brasil, destacam-se a podridão-radicular, a bacteriose, o superbrotamento e as viroses, por provocarem enormes prejuízos econômicos e elevarem os custos de produção com medidas de controle necessárias (MATTOS et al., 2006).

Muitos são os vírus já detectados na cultura da mandioca, porém os de maior importância econômica são: o vírus do mosaico comum (*Cassava common mosaic virus*, CsCMV; Família *Alphaflexiviridae*, Gênero *Potexvirus*), que no Brasil, está disseminado em todas as regiões produtoras, o vírus do mosaico das nervuras (*Cassava vein mosaic virus*, CsVMV; Família *Caulimoviridae*, Gênero *Cavemovirus*), restrito ao Brasil e Venezuela. No Brasil está amplamente disseminado na região Nordeste, principalmente na região do semiárido, o vírus do “couro-de-sapo” (“*Cassava Frogskin disease*”, CFSD), que também está disseminado no Brasil, Venezuela, Costa Rica, Panamá e Peru, e é a principal restrição à produção de mandioca na América Latina (CHAPARRO-MARTINEZ & TRUJILLO-PINTO, 2001; CALVERT & THRESH, 2002; CALVERT et al., 2012). Na cultura também ocorrem as pragas quarentenárias A1, o vírus do mosaico africano da mandioca (*African cassava mosaic virus*, ACMV), que pertence à família *Geminiviridae*, gênero *Begomovirus* e o *Cassava brown streak virus* (CBSV), que pertence ao gênero *Ipomovirus*, família *Potyviridae*, que estão presentes apenas na África

Fora do Brasil, a mandioca é afetada severamente por diversos begomovírus que causam a “*Cassava mosaic disease*” (CMD) endêmica na África e na Ásia (BULL et al., 2006). Esta doença é, sem dúvida, a de maior importância econômica para o cultivo da mandioca e uma séria ameaça à segurança alimentar dos povos que dela dependem.

Família *Geminiviridae*

A família *Geminiviridae* é caracterizada estruturalmente pela morfologia de partículas icosaédricas geminadas, com 18-30 nm, característico desta família de vírus de plantas, e geneticamente por possuir genoma monopartidos ou bipartidos de DNA circular de fita simples (ssDNA). Cada uma das moléculas contém 2500-

3000 nucleotídeos (nt) encapsidada por uma única proteína estrutural que se arranja na forma de 22 capsômeros (KING et al., 2012). A família é subdividida em sete gêneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus*, *Topocuvirus*, *Becurtovirus*, *Eragrovirus* e *Turncurtovirus* (ICTV, 2013). O gênero *Mastrevirus* inclui os geminivírus com um componente genômico transmitidos por cigarrinhas (Hemíptera: *Cicadellidae*) a plantas monocotiledôneas. Este gênero inclui alguns patógenos importantes de culturas como o milho (*Maize streak virus*, MSV) e o trigo (*Wheat dwarf virus*, WDV). O gênero *Curtovirus* engloba geminivírus com um componente genômico transmitidos por cigarrinhas (Hemíptera: *Cicadellidae*) a espécies dicotiledôneas. O *Beet curly top virus* (BCTV) é a principal espécie de importância econômica. O gênero *Topocuvirus* possui apenas uma espécie (*Tomato pseudo-curly top virus*, TPCTV), com um componente genômico e transmitida por cigarrinhas (Hemíptera: *Cicadellidae*) a espécies dicotiledôneas. O gênero *Becurtovirus* engloba duas novas espécies que possuem genoma de um componente e que são transmitidos por cigarrinhas. Os gêneros *Eragrovirus* e o *Turncurtovirus* possuem apenas uma espécie cada, ambas com genoma de um componente e vetor não identificado (ICTV, 2013). O gênero *Begomovirus* inclui espécies com um ou dois componentes genômicos transmitidas por mosca-branca (*Bemisia tabaci*) a espécies dicotiledôneas. Entre os begomovírus de maior importância econômica pode-se citar o BGMV, o ACMV e o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (MORIONES & NAVAS-CASTILLO, 2000; WERE et al., 2004). Atualmente mais de 192 espécies de begomovírus já foram descritas e aceitas pelo Comitê Internacional de Taxonomia de vírus (KING et al., 2012).

Os begomovírus, em sua maioria, possuem genoma dividido em dois componentes, denominados DNA-A e DNA-B. No DNA-A encontram-se os genes que codificam as proteínas necessárias para a transcrição, replicação e encapsidação viral. O DNA-B possui os genes codificadores das proteínas responsáveis pelo movimento do vírus na planta e desenvolvimento dos sintomas (ROJAS et al., 2005). Os componentes genômicos de uma mesma espécie viral não possuem identidade de sequência, exceto por uma região intergênica com aproximadamente 200 nucleotídeos denominada região comum (RC), que é altamente conservada (acima de 90% de identidade para o DNA-A e DNA-B de uma determinada espécie). A partir da região intergênica divergem os genes

virais, nos sentidos viral e complementar (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999) (Figura 1).

O DNA-A dos begomovírus tem o potencial de codificar de quatro a seis proteínas: uma proteína associada à replicação (Rep, Replication-Associated Protein, anteriormente denominada AC1 ou AL1); uma proteína transativadora (TrAP, Trans-Activating Protein, anteriormente AC2 ou AL2) que ativa a transcrição dos genes *cp* e *ns* e está envolvida na supressão do silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) (VOINNET et al., 1999; WANG et al., 2005); a proteína Ren (Replication-Enhancer Protein, anteriormente AC3 ou AL3), fator de amplificação da replicação viral; e a proteína capsidial (CP, Coat Protein, anteriormente AV1 ou AR1), essencial para a transmissão do vírus pelo inseto vetor (BRIDDON et al., 1990; HANLEY-BOWDOIN et al., 1999; HOFER et al., 1997). O DNA-B codifica as proteínas MP (Movement Protein, anteriormente BC1 ou BL1) e NSP (Nuclear Shuttle Protein, anteriormente BV1 ou BR1), a primeira envolvida no movimento célula-a-célula do vírus por meio do aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas (NOUEIRY et al., 1994), e a segunda responsável pelo transporte do DNA através do envelope nuclear (SANDERFOOT et al., 1996; SANDERFOOT & LAZAROWITZ, 1995). Estudos recentes atribuíram à proteína codificada pela ORF AC4 de begomovírus que infectam mandioca a capacidade de suprimir PTGS (VANITHARANI et al., 2004).

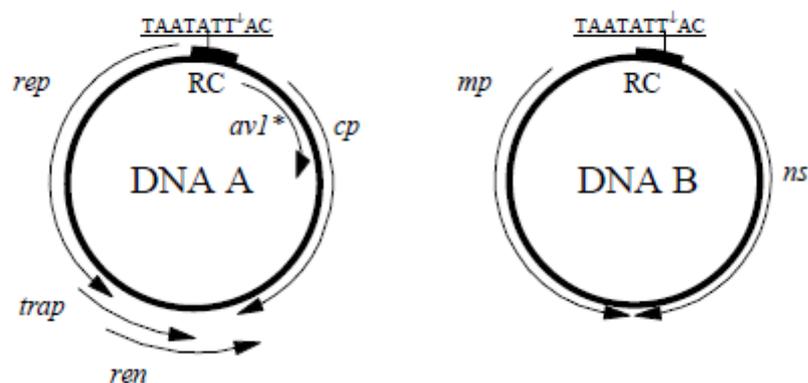


Figura 1. Representação esquemática do genoma de um begomovírus. As linhas grossas representam o genoma viral, dividido em dois componentes, cada um com aproximadamente 2.600 nucleotídeos. As setas indicam os genes virais e a direção em que ocorre a transcrição. A região comum (RC) também está indicada.

A seqüência sublinhada, conservada em todos os membros da família *Geminiviridae*, constitui a origem de replicação do genoma viral. * Gene presente apenas nos begomovírus originários da Europa, Ásia e África (“Velho Mundo”).

Aspectos taxonômicos

Dentre os vírus que infectam plantas, os geminivírus são bem caracterizados, isso devido ao pequeno tamanho de seu genoma, que permite fácil manipulação no processo de clonagem e ao desenvolvimento de métodos de inoculação não-dependentes de vetor (ROJAS et al., 2005).

A taxonomia da família *Geminiviridae* tem sofrido poucas modificações ao longo dos anos, com exceção da adição recente dos gêneros *Becurtovirus*, *Eragrovirus* e *Turncurtovirus*. Dentro de cada gênero, vários critérios podem ser utilizados para separação das espécies. Como o DNA-B pode ser trocado entre algumas espécies de begomovírus e algumas espécies possuem apenas o DNA-A, a análise taxonômica da família é realizada considerando-se apenas a seqüência do DNA-A (FAUQUET et al., 2008).

Na tentativa de ordenar todos os isolados de begomovírus de uma maneira sistematizada, e com isso obter uma classificação homogênea, foram sugeridos os seguintes critérios para sua classificação pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) no 9º relatório (KING et al, 2012): número de componentes genômicos (presença ou ausência de componente B); organização do genoma (presença ou ausência de ORF AV2) e; seqüência de identidade de nucleotídeos do DNA-A. Por causa do crescente número de espécies reconhecidas, derivações nas seqüências completas de nucleotídeos são necessárias para distinguir uma espécie de outra; seqüências de identidade de nucleotídeos menor que 89% são indicadas como espécies distintas; seqüências com identidade do DNA-A entre 89% e 94% são indicadas como estirpes e maior que 94% como variantes. Outros critérios também podem ser utilizados, como: trans-replicação dos componentes genômicos (a incapacidade da proteína Rep para trans-replicar um componente genômico sugere uma espécie distinta); produção de pseudo-recombinantes viáveis (infecção da planta com DNA-A de um vírus e DNA-B de outro); características da capa proteica, uma seqüência de

identidade de aminoácidos menor que 90% e uma diferença sorológica considerável podem ser indicativos de espécies distintas em primeira instância; gama de hospedeiras e sintomas fenotípicos.

Cassava mosaic disease – CMD

A doença conhecida como mosaico da mandioca (CMD, Cassava Mosaic Disease), foi relatada pela primeira vez na África, mais precisamente na Tanzânia, em 1894 (WARBURG, 1894). No início do século 20 já se assumia que provavelmente era causada por um vírus devido à ausência de patógenos visíveis e a demonstração de sua transmissão por enxertia (ZIMMERMAN, 1906), mas sua etiologia foi comprovada muitos anos depois, dando o nome ao vírus de *African cassava mosaic virus* (ACMV) (BOCK & WOODS, 1983). Durante as décadas de 1920 – 1930 já se observava a rápida disseminação do CMD pelo continente africano (DEIGHTON, 1926; DADE, 1930).

Na África, maior produtora de mandioca do mundo, o CMD causou perdas de 19 milhões de toneladas, o que significa cerca de 2,7 bilhões de dólares de prejuízo (FAO, 2012). Este complexo viral é o principal fator limitante à produção da mandioca na África Central e do Sul (BRIDDON & MARKAHAM, 2000), acarretando perdas que podem comprometer até 95% da produção. Em 1987 o vírus já estava presente em todas as áreas onde se cultivava a mandioca, com incidência maior que 80% em todas elas (FAUQUET & FARGETTE, 1990; PITA et al., 2001). Ao analisar plantas de mandioca naturalmente infectadas, coletadas em diferentes áreas geográficas do país, observou-se que esta doença é causada pelo *African cassava mosaic virus* (ACMV), um típico begomovírus bipartido que afeta a mandioca e uma nova espécie, o *East african cassava mosaic virus* (EACMV) (THRESH & COOTER, 2005; OKOGBENIN et al., 2007).

Esse vírus possui uma alta variabilidade genética, de modo que outras cinco espécies encontram-se associadas ao mosaico da mandioca: *East African cassava mosaic virus* (EACMV), *East African cassava mosaic Cameroon virus* (EACMCV), *East African cassava mosaic Malawi virus* (EACMMV), *East African cassava mosaic Zanzibar virus* (EACMZV) e *South African cassava mosaic virus* (SACMV) (BULL et al., 2006). Existem evidências de que essa variabilidade

estaria relacionada ao processo de adaptação do ACMV no continente africano por volta do século XVIII (BULL et al., 2006). Essa hipótese foi reforçada por Tiendébéogo et al. (2012), que analisando um isolado, denominado por eles de *African cassava mosaic Burkina Faso virus* (ACMBFV), verificaram que esse apresentava o DNA-A recombinante, tendo como maior parente ACMV (61,5%) e dois outros begomovirus com DNA monopartido, o *Tomato leaf Curl cameroon virus* (ToLCCMV) e *Cotton leaf curl Gezira virus* (CLCuGV).

Atualmente, o CMD já está disseminado por todos os países do continente africano, além da Índia e Sri-Lanka (OWOR et al., 2004). No continente africano ainda é considerada a principal doença da cultura, causando em média, perdas globais estimadas entre 19,6 - 27,8% da produção total do continente (ZHANG et al., 2005). São conhecidas atualmente oito espécies de begomovirus em mandioca (CMBs, Cassava mosaic begomoviruses), dos quais seis espécies estão presentes na África, e outras duas espécies na Índia e no Sri-Lanka (FAUQUET et al., 2008). Como esta virose não ocorre no Brasil ela é considerada pelo Ministério da Agricultura como praga quarentenária A1 (MEISSNER FILHO & VELAME, 2005).

A origem dos begomovirus que infectam a mandioca é desconhecida. A hipótese provável é que estes virus estavam presentes em outras espécies de plantas hospedeiras e foram introduzidas na planta de mandioca pela mosca-branca, se adaptaram de modo a infectar eficientemente este novo hospedeiro. Diversos fatos suportam esta hipótese: (1) a mandioca é originária da América do Sul e foi introduzida na África no século 16 e na Ásia no século 17, (2) não há relato de begomovirus infectando mandioca na América do Sul, sugerindo que os que ocorrem na África e Ásia são virus locais que passaram a ter contato com o novo hospedeiro mediado pelo inseto vetor, (3) evidências demonstram que os eventos de adaptação de begomovirus à mandioca na África e na Ásia provavelmente ocorreram de forma separada devido à grande divergência entre os virus presentes em cada continente (DUTT et al., 2005) e (4) a ocorrência natural destes CMBs em diversas espécies silvestres locais como *Jatropha multifida* e *Ricinus communis* (Euphorbiaceae), *Hewittia sublobata* (Convolvulaceae), *Laportea aestuans* (Urticaceae) *Senna occidentalis* (Fabaceae), *Combretum confertum* (Combretaceae) L. *Leucana leucocephala*

(Fabaceae) (BOCK et al., 1981; ALABI et al., 2007, 2008) que podem ser os hospedeiros naturais ou hospedeiros alternativos destes (MGBECHI-EZERI et al., 2008).

A mesma hipótese pode ser aplicada para explicar o drástico aumento na incidência de begomovírus em tomateiro no Brasil nos últimos anos. Assim como na África, (1) o tomateiro não é originário do Brasil, (2) os begomovírus isolados de tomateiro apresentam, em alguns casos, alta similaridade na sequência genômica, incluindo eventos de recombinação com begomovírus isolados de plantas daninhas como *Sida* sp. (CALEGARIO et al., 2007), (3) a detecção natural do mesmo isolado de begomovírus de tomateiro simultaneamente em planta daninha e cultivada (FERNANDES et al., 2006) e (4) a capacidade de alguns begomovírus isolados de plantas daninhas em infectar o tomateiro (HOFER et al., 1997).

Especificamente no caso do tomateiro, a explosão de begomovírus no Brasil se deu após a introdução do biótipo B da mosca-branca, que se adaptou bem as condições de clima e ao hospedeiro (neste caso o tomateiro) e devido a sua ampla gama de hospedeiros, foi a responsável por introduzir no tomateiro, os begomovírus presentes nas espécies daninhas (ANDRADE et al., 2006). Apesar de a mandioca ser cultivada em todas as regiões do Brasil, fato similar ainda não ocorreu. O que se especula é que a ausência de begomovírus em mandioca na América do Sul como um todo, é em parte devido à inabilidade dos biótipos americanos da mosca-branca *B. tabaci* em colonizar eficientemente a mandioca (COSTA & RUSSELL, 1975; BELLOTTI & ARIAS, 2001). As espécies mais comuns na mandioca nas Américas são: *Aleurotrachelus socialis*, *Aleurothrixus aepim*, *Trialeurodes variabilis* e *Bemisia tuberculata* (BELLOTTI, 2000; SCHIMITT, 2002). Contudo, existem relatos de *B. tabaci* biótipo B se alimentando em mandioca em Cuba, na República Dominicana e em Tibau e Pau Branco (RN), Brasil (VASQUEZ et al., 1995; BROWN et al., 1995, OLIVEIRA & LIMA, 2006). Estes exemplos podem indicar uma adaptação gradual da *B. tabaci* à mandioca, e pode futuramente causar a introdução em mandioca de begomovírus presentes em outras espécies, cultivadas ou nativas.

Carabali et al., (2005) avaliaram a capacidade de populações de *B. tabaci* biotipo B de colonizar mandioca após passaram por uma adaptação gradativa em diferentes hospedeiros, iniciando por *Phaseolus vulgaris*, seguido por *Euphorbia pulcherrima* e *Jatropha gossypifolia* (espécies existentes no Brasil). Indivíduos coletados no terceiro hospedeiro foram transferidos para uma cultivar de mandioca, sendo capazes de se alimentar, ovipositar e estabelecer uma população, demonstrando que é plausível que a mandioca possa representar, num futuro próximo, um hospedeiro adequado para *B. tabaci*. Esta possibilidade aumenta com o fato de se cultivar a mandioca em todo território nacional durante o ano inteiro.

Begomovírus em plantas daninhas no Brasil

As plantas daninhas possuem grande importância como agente biótico em sistemas agrícolas, condicionando uma série de fatores como inferências no crescimento e produtividade, bem como, afetando o processo de produção de algumas culturas (AMARAL, 2006). Estas também podem funcionar como fonte de inóculo de vírus para plantas cultivadas, principalmente de begomovírus. Já foram constatadas pelo menos 10 espécies de plantas daninhas que funcionam como hospedeiras de begomovírus na região Nordeste. As espécies estudadas foram coletadas nos estados de Alagoas, Pernambuco e Bahia com sintomas de mosaico amarelo, deformação do limbo foliar e redução do crescimento. Estas foram distribuídas em cinco famílias botânicas: Malvaceae foram encontradas malva-guanxuma (*Sida rhombifolia*), mela-bode (*Herissantia crispa*), mela-veludo (*Sidastrum micranthum*) e malva (*Sida spinosa*); Euphorbiaceae, cansanção (*Cnidoscolus urens*); Fabaceae, carrapicho (*Desmodium sp.*); Capparaceae, mussambê (*Cleome affinis*); e, Sterculiaceae, carrapicho (*Triumfetta semitriloba*) e malva-sedosa (*Waltheria indica*). As espécies *H. crispa*, *W. indica*, *T. semitriloba* e *Desmodium sp.* ainda não tinham sido relatadas como hospedeiras desses vírus no Brasil e no mundo (ASSUNÇÃO et al., 2006). Esses resultados ampliam ainda mais a gama de hospedeiras conhecidas para begomovírus, consideradas como das mais amplas entre os fitovírus.

Em estudos recente, Arnaud et al., (2007) descobriram a presença de begomovírus em espécies de plantas invasoras das famílias *Amaranthaceae* (*Amaranthus spinosus* L. e *A. viridis*) e *Asteraceae* (*Ageratum conyzoides* L. e *Bidens pilosa*) na Serra do Ipiapaba, Ceará. As quatro espécies estudadas são encontradas frequentemente nas lavouras de tomateiros e observou-se a presença de mosca-branca em suas folhas, indicando a movimentação do inseto entre as espécies de plantas daninhas e cultivadas, neste caso o tomateiro.

Ambrozevicius et al., (2002), analisaram a variabilidade de geminivírus infectando tomateiros e algumas plantas daninhas associadas na região Sudeste do Brasil, além do tomateiro, encontraram begomovírus em três plantas daninhas: *Sidastrun micranthum*, *Blainvillia rhomboidea* e um tipo selvagem de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*). Os autores observaram que os isolados de begomovírus extraídos das plantas de tomateiro e das plantas daninhas associadas aproximavam-se filogeneticamente, sugerindo que os hospedeiros naturais têm um importante papel como reservatório de espécies de begomovírus e que alguns vírus que infectam tomate estão evoluindo de plantas daninhas, principalmente por recombinações e pseudorecombinações. Diferentes solanáceas hospedeiras de begomovírus e as daninhas figueira-do-diabo (*Datura stramonium*), joá-de-capote (*Nicranda physaloides*) e bucho-de-rã (*Physalis floridana*) foram testadas e observou-se suscetibilidade a begomovírus (RIBEIRO et al., 2003; SANTOS et al., 2004). Castillo-Urquiza et al. (2008) relataram a ocorrência de seis novas espécies de begomovírus infectando tomate e plantas daninhas associadas na região Sudeste: *Tomato mild mosaic virus* (ToMMV), *Sida common mosaic virus* (SiCMV), *Tomato leaf distortion virus* (ToLDV), *Blainvillea yellow spot virus* (BIYSV), *Sida yellow leaf curl virus* (SiYLCV) e *Tomato common mosaic virus* (ToCMV). Estes estudos mostram que existe uma grande diversidade de begomovírus infectando plantas espontâneas e que futuramente poderiam vir a infectar mandioca. Fato semelhante ocorreu com o ACMV na África, pois o ACMV não é originário da mandioca, mas de planta daninha da África, e que passou a infectar a mandioca algum tempo depois desta ter sido introduzida no continente africano.

Estudos recentes com a planta daninha *Cleome affinis* coletadas em diferentes estados do nordeste do Brasil (Alagoas, Bahia, Paraíba, Pernambuco e

Sergipe) revelou através da análise do genoma A completo que apenas o *Cleome leaf crumple virus* (CILCrV) estava presente nas amostras, porém múltiplos eventos de recombinação foram detectados entre eles, devido seu elevado grau de variabilidade genética e natureza recombinante, o que sugere que *C. affinis* pode agir como uma fonte de novos vírus para plantas cultivadas (SILVA et al., 2011). Outro estudo com begomovírus infectando plantas daninhas leguminosas foi realizado em quatro estados do nordeste do Brasil e, pela análise de suas sequências verificou-se que ocorriam nelas seis espécies virais, sendo quatro espécies novas: o *Centrosema yellow spot virus* (CenYSV); *Macroptilium yellow vein virus* (MaYVV); *Macroptilium yellow spot virus* (MaYSV) e *Macroptilium yellow net virus* (MaYNV). Cinco das espécies virais encontradas foram agrupadas com outros begomovírus brasileiros, mas o *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV) foi agrupado com espécies de vírus relatadas em outros países da América Central e do Sul. Fortes evidências de recombinação foram encontradas entre os isolados de MaYSV. Com esses resultados observa-se que as plantas daninhas leguminosas podem ser reservatórios de vários begomovírus no Brasil, e pode desempenhar um papel significativo nas epidemias de begomovírus, tanto como fonte de inóculo como fonte de novos vírus emergentes (SILVA et al., 2012).

Mecanismos de diversidade genética de begomovírus

A diversidade genética em populações virais proporciona oportunidades para adaptação a novos hospedeiros e as mudanças das condições ambientais (MONCI et al., 2002). A América Latina é um dos principais centros de diversidade de begomovírus, com as plantas daninhas sendo uma das principais fontes de novos begomovírus (MORALES, 2010). Mutações, recombinação e pseudo-recombinação são as principais fontes de variabilidade genética de vírus em plantas (GARCIA-ARENAL et al., 2003; SEAL et al., 2006).

A recombinação envolve a troca de fragmentos de material genético entre genomas, enquanto que na pseudo-recombinação ocorre a troca de componentes genômicos intactos entre vírus bipartidos, gerando uma nova combinação de componentes (Seal et al., 2006). A existência de dois componentes genômicos na maioria dos begomovírus possibilita o mecanismo de pseudo-recombinação.

A alta frequência de recombinação dos geminivírus pode ser explicada em parte por uma possível estratégia de replicação dependente de recombinação (PREISS & JESKE, 2003), pela ocorrência freqüente de infecções mistas (TORRES-PACHECO et al., 1996; HARRISON et al., 1997; SANZ et al., 2000; PITA et al., 2001; RIBEIRO et al., 2003), e pela infecção do núcleo de uma mesma célula por mais de um begomovírus (MORILLA et al., 2004). A maior parte dos estudos com begomovírus mostram que a recombinação é o fator preponderante para explicar a grande variabilidade genética existente (PADIDAM et al., 1999; PITA et al., 2001; RIBEIRO et al., 2007). A recombinação pode levar a alterações genômicas que influenciam tanto a replicação do vírus quanto o movimento e acúmulo do mesmo. Essas alterações podem levar à diferenciação na gama de hospedeiras e nos sintomas que o vírus causa (SANTOS et al., 2004).

Alguns trabalhos identificando geminivírus recombinantes já foram descritos com mandioca na África, com algodão no Paquistão, com pimenta no México e com tomate no Brasil e América Central (DENG et al., 1997; TORRES-PACHECO et al., 1993; ZHOU et al., 1998; CALEGARIO et al., 2007). Nesses casos, o vírus recombinante obteve uma vantagem adaptativa, pois passou a infectar novos hospedeiros em relação aos vírus parentais, além de induzir sintomas mais severos. Tais relatos evidenciam que recombinações interespecíficas têm originado uma significativa diversidade entre os begomovírus (PADIDAM et al., 1999).

A ocorrência frequente de infecções mistas facilita a pseudo-recombinação e recombinação, em mandioca, pelo menos em dois casos foi demonstrada a emergência de novas espécies como consequência direta desses mecanismos (ZHOU et al., 1997; FONDONG et al., 2000). Um recombinante entre o DNA-A do ACMV e do *East African cassava mosaic virus* (EACMV), denominado EACMV-UG2, e um DNA-B pseudo-recombinante foram associados com a epidemia severa que atingiu diversos países da África Sub-Sahariana ao longo da década de 1990 (LEGG & THRESH, 2000; PITA et al., 2001). Na Tanzânia, todas as sete espécies de begomovírus que infectam mandioca já foram relatadas (NDUNGURU et al., 2005). Diversos eventos de recombinação foram detectados entre as estirpes TZ1 e TZ7 do *East African cassava mosaic Cameroon virus*

(EACMCV) pela análise de suas sequências. A variabilidade genética da população viral foi analisada também com base no DNA-B de isolados de EACMV, o que também indicou a existência de diversos eventos de recombinação. Os resultados indicam que a região central do continente africano é um centro de diversidade genética viral para begomovírus (NDUNGURU et al., 2005).

Andrade et al. (2006) descreveram a espécie *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) em tomate, mas que filogeneticamente estava próximo aos vírus isolados de *Sida* sp. (SiMoV, SimMV e SiYMV). Apesar disso, o ToYSV foi capaz de formar pseudo-recombinantes com vírus de tomate. Pseudo-recombinantes infectivos formados entre o DNA-A de ToYSV e o DNA-B de *Tomato crinkle leaf yellows virus* (TCrLYV) induziram sintomas severos em *N. benthamiana*. Esse potencial para formar pseudo-recombinantes foi, em parte, atribuído ao fato de que a origem de replicação de ambos os componentes possui a sequência do sítio de ligação da Rep idêntica. Contudo, esse não foi o caso para outro pseudo-recombinante viável formado entre o DNA-A de *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) e o DNA-B de ToYSV, os quais possuem a sequência do sítio de ligação da Rep diferente. Estes resultados reforçam a idéia que a formação de pseudo-recombinantes viáveis não se baseia apenas nas relações filogenéticas e nas sequências conservadas dos itrons.

REFERÊNCIAS

- ALABI, O.J.; OGBE, F.O.; BANDYOPADHYAY, R.; DIXON, A.G.O.; HUGHES, J.; NAIDU, R.A. The occurrence of *African cassava mosaic virus* and *East African cassava mosaic Cameroon virus* in natural hosts other than cassava in Nigeria. **Phytopathology**, v. 97, p.S3, 2007.
- ALABI, O.J.; OGBE, F.O.; BANDYOPADHYAY, KUMAR, P.L.; DIXON, A.G.O.; HUGHES, J.D.A.; NAIDU, R.A. Alternate hosts of *African cassava mosaic virus* and *East African cassava mosaic Cameroon virus* in Nigeria. **Archives of Virology**, v.153, p.1743-1747, 2008.
- AMARAL, A.L. **Estudos genéticos e morfológicos de biótipos resistentes e susceptíveis de *Euphorbia heterophylla* L. (amendoim-bravo) Jaboticabal.** 2006. 51f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.
- AMBROZEVICIUS, L.P.; CALEGARIO, R.F.; FONTES, E.P.B.; CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.372-377, 2002.
- ANDRADE, E.C., MANHANI, G.G., ALFENAS, P.F., CALEGARIO, R.F., FONTES, E.P.B. & ZERBINI, F.M. *Tomato yellow spot virus*, a tomato-infecting begomovirus from Brazil with a closer relationship to viruses from *Sida* sp., forms pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from *Sida*. **Journal of General Virology**, v.87, p.3687–3696, 2006.
- ARNAUD, L.S.E.P.; SANTOS, C.D.G.; LIMA, J.A.A. & FEITOSA, F.A.A. Predominância de begomovírus em tomateiros na região produtora da Ibiapaba, Ceará, e sua detecção natural em plantas daninhas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n.3, p.241-246. 2007.
- ASSUNÇÃO, I.P.; LISTIK, A.F.; BARROS, M.C.S.; AMORIE, E.P.R.; SILVA, S.J.C.; IZAEL, O.; SILVA, O.; RAMALHO-NETO, C.E.; LIMA, G.S.A. Diversidade genética de begomovírus que infectam plantas invasoras na região nordeste. **Planta Daninha**, v. 24, n.2, p.239-244, 2006.
- BELLOTTI, A.C.; ARIAS, B. Host plant resistance to whiteflies with emphasis on cassava as a case study. **Crop Protection**, v.20, p.813–823, 2001.
- BELLOTTI, A. C. El manejo integrado de las plagas principales en el cultivo de la yuca. In: INTERNATIONAL COURSE-WORKSHOP ON BIOLOGICAL CONTROL, 1. 2000, [Cali]. **Proceedings...** Cali: CIAT, 2000. p. 1-35.
- BOCK, K.R.; WOODS, R.D. Etiology of *African cassava mosaic disease*. **Plant Disease**, v.67, p.944–955, 1983.

- BOCK, K.R.; GUTHRIE, E.J.; FIGUEIREDO, G. A strain of cassava latent virus occurring in coastal district of Kenya. **Annals of Applied Biology**, v.99, p.151, 1981.
- BULL, S.E.; BRIDDON, R.W.; SSERUBOMBWE, W.S.; NGUGI, K.; MARKHAM, P.G.; STANLEY, J. Genetic diversity and phylogeography of cassava mosaic viruses in Kenya. **Journal of General Virology**, v. 87, p.3053-3065, 2006.
- BRIDDON, R.W.; PINNER, M.S.; STANLEY, J.; MARKHAM, P.G. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. **Virology**, v. 177, p. 85-94, 1990.
- BRIDDON, R.W. & MARKHAM, P.G. Cotton leaf curl virus disease. **Virus Research**, v.71, p.151-159, 2000.
- BROWN, J.K.; BIRD, J. Variability within the *Bemisia tabaci* species complex and its relation to new epidemics caused by geminiviruses. **Ceiba**, v.36, n.1, p.73–80,1995.
- CALEGARIO, R.F.; FERREIRA, S.S.; ANDRADE, E.C.; ZERBINI, F.M. Characterization of *Tomato yellow spot virus*, (ToYSV), a novel tomato-infecting begomovirus from Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.1335-1343, 2007.
- CALVERT, L.A.; Thresh, J.M. **Virus and virus diseases of cassava**. In: Hillocks, R.J., Thresh, J.M., Belloti, A. (Eds.), *Cassava Biology and Utilization*. CABI Publishing, UK, pp. 237–260, 2002.
- CALVERT, L.A.; CUERVO, M.; LOZANO, I. **Cassava viral disease in South America**. In: Ospina, B., Ceballos, H. (Eds.), *Cassava in the Third Millennium: Modern production, Processing, Use and Marketing Systems*. CIAT, Cali, Colombia, pp.309–318, 2012.
- CARABALI, A.; BELLOTTI, A. C.; MONTOYA LERMA, J.; CUELLAR, M. E. Adaptation of *Bemisia tabaci* biotype B (Gennadius) to cassava, *Manihot esculenta* (Crantz). **Crop-Protection**, v.24, n.7, p.643-649. 2005.
- CASTILLO-URQUIZA, G.; BESERRA, .; BRUCKNER, F.; LIMA, A.; VARSANI, A.; ALFENAS-ZERBINI, P.; MURILO ZERBINI, F. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Archives of Virology**, v.153, p.1985-1989, 2008.
- CHAPARRO-MARTINEZ, E.I.; TRUJILLO-PINTO, G. First report of frog skin disease in cassava (*Manihot esculenta*) in Venezuela. **Plant Disease**, v.85, p.1285, 2001.
- COSTA, A. S.; RUSSELL, L. M. Failure of *Bemisia tabaci* to breed on cassava plants in Brazil (Homoptera: Aleyrodidae). **Ciência e Cultura**, v. 27, p. 388-390, 1975.

- DADE, H.A. **Cassava Mosaic**. Paper No. XXVIII. Yearbook. Department of Agriculture, Gold Coast, pp. 245–247, 1930.
- DEIGHTON, F.C. **Annual Report of the Lands and Forestry Department**. Sierra Leone, pp. 1–2, 1926.
- DENG, D.; OTIM-NAPE, W.G.; SANGARE, A.; OGWAL, S.; BEACHY, R.N. & FAUQUET, C.M. Presence of a new virus closely related to east African cassava mosaic geminivirus, associated with cassava mosaic outbreak in Uganda. **African Journal of Root Tuber Crops**, v.2, p.23-28, 1997.
- DUTT, N.; BRIDDON, R.W.; DASGUPTA, I. Identification of a second begomovirus, Sri Lanka cassava mosaic virus, causing cassava mosaic disease in India. **Archives of Virology**, v.150, p.2101-2108, 2005.
- EL-SHARKAWY, M.A.; LOPEZ, Y.; BERNAL, L.M. Genotypic variations in activities of PEPC and correlations with leaf photosynthetic characteristics and crop productivity of cassava grown in low-land seasonally-dry tropics. **Photosynthetica**, v. 46, cap.2, p. 238-247, 2008.
- FAO, 2012. **Food and agriculture organization of the united nations**. Disponível em: < www.faostat.fao.org/site/340/default.aspx > Acesso em: 10 out. 2013.
- FAO, 2013a. **Save and Grow: Cassava. A Guide to Sustainable Production Intensification**. Rome. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/018/i3278e/i3278e.pdf>.> Acesso em: 10 out. 2013.
- FAO, 2013b. **Food and Agriculture organization of the United Nations. FAOSTAT Countries by commodity**. Cassava, 2012. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 10 out. 2013.
- FARIA, J.C.; ZERBINI, F.M. Família *Geminiviridae* – taxonomia, replicação e movimento. **RAPP**, v.8, p.27-57, 2000.
- 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, p. 125-137, 2000.
- FAUQUET, C.; FARGETTE, D. *African cassava mosaic virus*: etiology, epidemiology and control. **Plant Disease**, v.74, p.404-411, 1990.
- FARGETTE, D.; KONATE, G.; FAUQUET, C.; MULLER, E., PETERSCMITT, M.; THRESH, J.M. Molecular ecology and emergence of tropical plant viruses. **Annual Review of Phytopathology**, v.44, p.235–260, 2006.
- FAUQUET, C.M.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; MORIONES, E.; STANLEY, J.; ZERBINI, M.; ZHOU, X. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. **Archives of Virology**, v.153, p.783-821, 2008.

- FERNANDES F.R., ALBUQUERQUE L.C., DE OLIVEIRA C.L., CRUZ A.R., DA ROCHA W.B., PEREIRA T.G., NAITO F.Y., DIAS N.D., NAGATA T., FARIA J.C., ZERBINI F.M., ARAGÃO F.J., INOU-NAGATA A.K.. Molecular and biological characterization of a new Brazilian begomovirus, *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV), infecting *Euphorbia heterophylla* plants. **Archives of Virology**, v.156, p.2063-2069, 2011.
- FERNANDES, J.J.; CARVALHO, M.G.; ANDRADE, E.C.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; FONTES, E.P.B.; ZERBINI, F.M. Biological and molecular properties of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. **Plant Pathology**, v. 55, DOI 10.1111/j.1365-3059.2006.01395.x, 2006.
- FONDONG, V.N.; PITA, J.S.; REY, M.E.C.; KOCHKO, A.; BEACHY, R.N.; FAUQUET, C.M. Evidence of synergism between *African cassava mosaic virus* and a new double recombinant geminivirus infecting cassava in Cameroon. **Journal of General Virology**, v.81, p.287-297. 2000.
- FUKUDA, W.M.G.; SILVA, S. O de.; PORTO, M.C.M. Caracterização e avaliação de germoplasma de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Cruz das Almas, BA: **EMBRAPA-CNPMP**, p.161, 1997.
- FUKUDA, W. M. G.; FUKUDA, C.; DIAS, M. C.; XAVIER, J. J. B. N.; FIALHO, J. F. Variedades. In: SOUZA, L. S.; FARIAS, A. R. N.; MATTOS, P. L. P.; FUKUDA, W. M. G. (Ed.). **Aspectos socioeconômicos e agronômicos da mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, p. 433-454, 2006.
- GARCIA-ARENAL, F.; FRAILE, A.; MALPICA, J.M. Variation and evolution of plant virus populations. **International Microbiology**, v.6, p.225-232, 2003.
- HANLEY-BOWDOIN, L.; SETTLAGE, S.B.; OROZCO, B.M.; NAGAR, S.; ROBERTSON, D. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 18, p. 71-106, 1999.
- HARRISON, B.D.; LIU, Y.L.; KHALID, S., HAMEED, S.; OTIM NAPE, G.W.; ROBINSON, D.J. Detection and relationships of cotton leaf curl virus and allied whitefly-transmitted geminiviruses occurring in Pakistan. **Annals of Applied Biology**, v.130, p.61-75, 1997.
- HOFER, P., BEDFORD, I.D., MARKHAM, P.G., JESKE, H. E FRISCHMUTH, T. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. **Virology**, v.236, p.288-295. 1997.
- HOLLAND, J.D.E. Origin and evolution of viruses. **Virus Genes**, v.16, p.13-21, 1998.
- 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. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 82, p.3572-3576, 1985.

HULL, R. Transmission 1: **By Invertebrates, Nematodes and Fungi In *Matthew's Plant Pathology***, Hull R (ed), 4th edn,. London: Academic Press, pp 485-532, 2002

IBGE, 2012. **INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA**. Disponível em: < <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?>>. Acesso em: 10 out. 2013.

IBGE, 2013. **INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>> Acessado em: 23 mar. 2013.

ICTV, 2013. **Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus**. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?msl_id=27>. Acesso em: 10 dez. 2013.

KING, A.M.Q., ADAMS, M.J., CARSTENS, E.B., LEFKOWITZ, E.J. **Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Elsevier Academic Press, USA, pp. 541–637, 2012.

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

LEGG, J.P.; FAUQUET, C.M. Cassava mosaic geminiviruses in Africa. **Plant MolBiol**, v. 56; p.585-599, 2004.

MATTOS, P.L. P.; GOMES, J.C. **O cultivo da mandioca**. Cruz das Almas, BA: Embrapa mandioca e Fruticultura, 2000. 122p. (Circular Técnica n 37). Bibliografia p.107 - 122. ISSN 1516-5612.

MATTOS, P. L. P. de; FARIAS, A. R. N.; FERREIRA FILHO, J. R. (Ed.). **Mandioca: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 176 p.: il. il. (Coleção 500 perguntas, 500 respostas).

MEISSNER FILHO, P.E.; VELAME, A.C. **O Mosaico Africano da Mandioca**. Mandioca em foco, 2005. Disponível em: <www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/produto.../mandioca_29.pdf>. Acesso em 20 out. 2012.

MONCI, F.; SANCHEZ-CAMPOS, S.; NAVAS CASTILLO, J. & MORIONES, E. A natural recombinant between the geminiviruses. *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus*, exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in spanash population. **Virology**. v. 303. p 317-326, 2002.

MORALES, F.J. **Distribution and dissemination of begomoviruses in Latin America and the Caribbean**. In: Stansley PA, Naranjo SE (eds) Bemisia:

bionomics and management of a global pest. Springer, Dordrecht, pp 283–318, 2010.

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

MORALES, F.J., JONES, P.G. The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. **Virus Research**, v.100, p.57-65, 2004.

MORILLA, G.; KRENZ, B.; JESKE, H.; BEJARANO, E.R.; WEGE, C. Tête à tête of *Tomato yellow leaf curl virus* and *Tomato yellow leaf curl sardinia virus* in single nuclei. **Journal of Virology**, v.78, p.10715-10723, 2004.

MORIONES, E., NAVAS-CASTILHO, J. *Tomato yellow leaf curl virus*, na emerging vírus complex causing epidemics worlwide. **Virus Research**, v. 71, p. 123-134, 2000.

MGBECHI-EZERI, .JU.; ALABI, O.J.; NAIDU, R.A.; LAVA KUMAR, P. First report of the ccurrence of African cassava mosaic virus in soybean in Nigeria. **Plant Disease**. (PD-05-08-0317-PDN), 2008.

NASSAR, N.M.A. Mandioca: Opção contra a fome - estudos e lições do Brasil e do mundo. **Ciência hoje**, v. 39, n. 231, p. 31-34, 2006.

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

NDUNGURU, J.; LEGG, J.; AVELING, T.; THOMPSON, G.; FAUQUET, C. Molecular biodiversity of cassava begomoviruses in Tanzania: evolution of cassava geminiviruses in Africa and evidence for East Africa being a center of diversity of cassava geminiviruses. **Virology Journal**, v.2, p.21, 2005.

OLIVEIRA, M.R.V. & LIMA, L.H.C. **Mosca branca na cultura da mandioca no Brasil**. Serie Documentos, n. 186., 57p. Embrapa Recursos Geneticos e Biotecnologia, 2006.

OKOGBENIN, E.; PORTO, M.C.M.; EGESI, C. Marker-assisted introgression of resistance to cassava mosaic disease into Latin american germplasm for the genetic improvement of cassava in Africa. **Crop Science**, v. 47, p.1895–1904, 2007.

OWOR, B.; LEGG, J. P.; OKAO-OKUJA, G.; OBONYO, R.; KYAMANYWA, S.; OGENGA-LATIGO, M. W. Field studies of cross protection with cassava mosaic geminiviruses in Uganda. **Journal of Phytopathology**, v. 152, p. 243–9, 2004.

PADIDAM, M.; SAWYER, S.; FAUQUET, C.M. Possible emergency of new geminiviruses by frequent recombination. **Virology**, v.265, p.218-225, 1999.

PITA, J.S.; FONDONG, V.N.; SANGARÉ, A.; OTIM-NAPE, G.W.; OGWAL, S. & FAUQUET, C.M. Recombination, pseudo recombination 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 n.12, p.1358-1369, 1997.

PREISS, W.; JESKE, H. Multitasking in replication is common among geminiviruses. **Journal of Virology**, v.77, p.2972-2980, 2003.

RIBEIRO, S.G.; MELLO, L.V.; BOITEUX, L.S.; KITAJIMA, E.W.; FARIA, J.C. Tomato infection by a geminivirus in the Federal District, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 19, p.330, 1994.

RIBEIRO, S.G.; AMBROZEVIĆIUS, L.P.; ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; CALEGARIO, R.F.; FERNANDES, J.J.; LIMA, M.F., DE MELLO, R.N.; ROCHA, H.; ZERBINI, F.M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. **Archives of Virology**, v.148, p. 281-295, 2003.

RIBEIRO, S.G.; LOHUIS, H.; GOLDBACH, R.; PRINS, M. *Tomato chlorotic mottle virus* is a target of RNA silencing but the presence of specific short interfering RNAs does not guarantee resistance in transgenic plants. **Journal of Virology**, v.81, n.4, p.1563, 2007.

ROJAS, M. R.; HAGEN, C.; LUCAS, W. J. & GILBERTSON, R. L.; Exploiting chinks in the plant's armor evolution and emergence of geminiviruses. **Annual Review of Phytopathology**, v.43, p.16.1-16.39, 2005.

SANDERFOOT, A.A.; LAZAROWITZ, S.G. Cooperation in viral movement: The geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery. **Plant Cell**, v. 7, p. 1185-1194, 1995.

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

SANTOS, C.D.G.; D'ÁVILA, A.C.; INOUE-NAGATA, A.K.; RESENDE, R.O. Espécies vegetais hospedeiras de begomovírus isolados de tomateiro em Goiás e no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.450-455, 2004.

SANZ, A.I.; FRAILE, A.; GARCÍA-ARENAL, F.; ZHOU, X.; ROBINSON, D.J.; KHALID, S.; BUTT, T.; HARRISON, B.D. Multiple infection, recombination and genome relationships among begomovirus isolates found in cotton and other plants in Pakistan. **Journal of General Virology**, v.81, p.1839-1849, 2000.

SEAL, S.E.; VAN DEN BOSCH, F.; JEGER, M.J. Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: Implications for sustainable control. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.25, p.23-46, 2006.

SILVA, S.J.C.; CASTILLO-URQUIZA, G.P.; HORA-JÚNIOR, B.T.; ASSUNÇÃO, I.P.; LIMA, G.S.A.; PIO-RIBEIRO, G.; MIZUBUTI, E.S.G.; ZERBINI, F.M. High genetic variability and recombination in a begomovirus population infecting the ubiquitous weed *Cleome affinis* in northeastern Brazil. *Archives of Virology*, v.156, p.2205-2213, 2011.

SILVA, S.J.C.; CASTILLO-URQUIZA, G.P.; HORA-JÚNIOR, B.T.; ASSUNÇÃO, I.P.; LIMA, G.S.A.; PIO-RIBEIRO, G.; MIZUBUTI, E.S.G.; ZERBINI, F.M. Species diversity, phylogeny and genetic variability of begomovirus populations infecting leguminous weeds in northeastern Brazil. *Plant Pathology*, v.61, p.457-467, 2012.

SOARES, M.B.B.; VALLE, T.L.; COLARICCIO, A.; FELTRAN, J.C.; VAZ LOBO, R.S.; MARTINS, A.L.M. Disseminação do Vírus do Mosaico Comum em área de mandioca (*Manihot esculenta* crantz.). In: XIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, Botucatu, 2009. *Anais...* Botucatu: CERAT/UNESP, 2009. p. 394-398. Disponível em: <<http://www.cerat.unesp.br/compendio/artigos.html>>. Acesso em: 10 de novembro, 2012.

SCHMITT, A. T. Principais insetos e pragas da mandioca e seu controle. In: CEREDA, M. P. (Coord.). **Agricultura: tuberosas amiláceas latino americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, p. 350-369, 2002. (Culturas de Tuberosas Amiláceas Latinoamericanas, 2).

STANLEY, J. Infectivity of the cloned geminivirus genome requires sequences from both DNAs. *Nature*, v.305, p.643-645, 1983.

TIENDÉBÉOGO, F. et al. Evolution of *African cassava mosaic virus* by recombination between bipartite and monopartite begomoviruses. *Virology Journal*, v. 9, n. 1, p. 9-21, 2012.

TORRES-PACHECO, I.; GARZÓN-TIZNADO, J.A.; HERRERA-ESTRELLA, L.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. Complete nucleotide sequence of pepper huasteco virus: analysis and comparison with bipartite geminiviruses. *Journal of General Virology*, v.74, p.2225-2231, 1993.

TORRES-PACHECO, I.; GARZÓN-TIZNADO, J.A.; BROWN, J.K.; BECERRA-FLORA, A.; RIVERA-BUSTAMANTE, R. Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the Southern United States. *Phytopathology*, v.86, p.1186-1192, 1996.

THRESH, J.M.; COOTER, R.J. Strategies for controlling cassava mosaic virus disease in Africa. *Plant Pathology*, v.54, p.587-614, 2005.

VANITHARANI, R.; CHELLAPPAN, P.; PITA, J.S.; FAUQUET, C.M. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and

suppression of posttranscriptional gene silencing. **Journal of Virology**, v. 78, p. 9487-9498, 2004.

VOINNET, O.; PINTO, Y.M.; BAULCOMBE, D.C. Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 96, p. 14147-14152, 1999.

VARMA, A.; MALATHI, V.G. Emerging geminivirus problems: A serious threat to crop production. **Annals of Applied Biology**, v.142, p.145-164, 2003.

VÁSQUEZ, L.L.; JIMÉNEZ, R.; IGLESIA, M.; MATEO, A.; LOPEZ, D.; VERA, E.R. Moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) detectadas en los principales cultivos agrícolas de Cuba. **Manejo Integrado Plagas** (Costa Rica), v.36, p.18–21, 1995.

VILPOUX, O.F. Arranjos institucionais nas transações entre produtores e feccularias de mandioca: abordagem pela economia dos custos de transação. **Informe Gepec**, v.14, p.127-146, 2010.

WANG, H.; BUCKLEY, K.J.; YANG, X.; BUCHMANN, R.C.; BISARO, D.M. Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. **Journal of Virology**, v. 79, p. 7410-7418, 2005.

WARBURG, O. Mitt Deutch. **Schutzgeb**, Berlin, v. 7, p. 131, 1894.

WERE, H.K.; WINTER, S.; MAISS, E. Viruses infecting cassava in Kenya. **Plant Disease**, v.88, p.17-22, 2004.

ZHANG, P.; VANDERSCHUREN, H.; FU" TTERER, J.; GRUISSEM, W. Resistance to cassava mosaic disease in transgenic cassava expressing antisense RNAs targeting virus replication genes. **Plant Biotechnol Journal**, v.3, p.385–397, 2005.

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

ZHOU, X.; LIU, Y.; ROBINSON, D.J. & 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.915-925, 1998.

ZIMMERMANN, A. Die krauselkrankheit des maniok. **Pflanzer**, v. 2, p. 145, 1906.

CAPÍTULO 1

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR PARCIAL DE BEGOMOVIRUS INFECTANDO *Manihot esculenta* E PLANTAS DANINHAS ASSOCIADAS À CULTURA

Artigo a ser submetido, formatado de acordo com as normas da revista Tropical
Plant Pathology.

Partial molecular identification of begomoviruses infecting *Manihot esculenta* and crop associated weeds

Silva, A. F.S., Abreu, E.F.M²., Andrade, E.C.²

¹Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 44380-000, Cruz das Almas, BA, Brazil; ²Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 44380-000, Brazil

Author for correspondence: Eduardo Chumbinho de Andrade, e-mail: echumbinho@hotmail.com

ABSTRACT

The *Begomovirus* (Fam. *Geminiviridae*) includes species that have circular single-stranded DNA genome. The begomoviruses have economic importance because of the high losses caused, mainly in tropical and subtropical regions. In addition, several species of begomoviruses have been isolated from weeds plants and these plants could act as a natural reservoir. Diseases caused by them in Brazil reached higher levels of incidence and severity after introduction of biotype B of the whitefly (*Bemisia tabaci*). The whitefly has a wide host range, facilitating the transfer of begomoviruses from weeds to cultivated plants. Begomoviruses were detected in four plants of cassava in Bahia. The presence of begomoviruses in cassava in Brazil was not reported until now, making its characterization necessary. The partial sequence of DNA-A of the isolates obtained from these plants indicated the presence of two species possible. The isolates BGV-90 and BGV-1209 share 93 and 95 % identity with *Leonurus mosaic virus* (LeMV), respectively. The isolates BGV-520 and BGV-1363 share 95 and 90 % identity with *Passionfruit severe leaf deform virus* (PSLDV). Partial molecular identification of begomoviruses in weeds associated with cassava indicated a large number of species. In twelve samples, we found possibly six species already described in Brazil and two isolates, P-175 and P-271 could represent new species. The detection of LeMV in *Leonurus* plants and two species of passion fruit show that the virus is present in cassava plantations. Furthermore, the analyzes show that passion fruit can be host of both virus, LeMV and PSLDV.

Keywords: Cassava, *Geminivirus*, detection.

INTRODUÇÃO

O gênero *Begomovirus* pertence à família *Geminiviridae*, e inclui as espécies economicamente mais importantes (Stanley et al., 2005). Os geminivírus possuem um genoma de DNA fita simples circular de aproximadamente 2.600 nucleotídeos, encapsidados em uma partícula icosaédrica geminada (Stanley et al., 2005). O gênero *Begomovirus* inclui os vírus com um ou dois componentes genômicos que infectam plantas dicotiledôneas e são transmitidos pela mosca-branca, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: *Aleyrodidae*) (King et al., 2012).

Os begomovírus possuem grande importância econômica, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, sendo uma das maiores ameaças à agricultura nestas regiões (Morales & Anderson, 2001; Monci et al., 2002; Briddon, 2003; Were et al., 2004). A emergência de novas espécies de begomovírus infectando tomateiros nas Américas (Polston & Anderson, 1997; Ribeiro et al., 2003; Morales & Jones, 2004;) veio ressaltar de forma dramática o impacto causado por esses patógenos à agricultura.

No caso do tomateiro, a explosão de begomovírus no Brasil se deu após a introdução do biótipo B da mosca branca, que se adaptaram bem as condições de clima e ao tomateiro, devido a sua ampla gama de hospedeiros, foi a responsável por introduzir no tomateiro, os begomovírus presentes nas espécies silvestres e daninhas nativas (Andrade et al., 2006).

Fato similar ocorreu com a mandioca na África, atualmente hospedeira de um complexo de begomovírus que causam o mosaico da mandioca (Cassava Mosaic Disease, CMD). Apesar da mandioca ser originária do Brasil e cultivada em todas as regiões do país, fato similar ainda não ocorreu. A ausência de begomovírus em mandioca na América do Sul parece ser devida à inabilidade da mosca-branca, *B. tabaci* em colonizar eficientemente a mandioca (Costa & Russell, 1975; Bellotti & Arias, 2001). Contudo, há relatos de colonização de mandioca pelo biótipo B de *B. tabaci* no Brasil e em países da América Central (Oliveira & Lima, 2006; Vasquez et al., 1995; Brown et al., 1995), bem como estudos que demonstram a capacidade de populações de *B. tabaci* provenientes de hospedeiros alternativos em se adaptar a mandioca (Carabali et al., 2005). Estas evidências permitem afirmar que a mandioca pode futuramente ser um hospedeiro adequado para *B. tabaci*, e a partir deste evento, possa-se iniciar a

introdução de begomovírus presentes em espécies cultivadas ou daninhas na cultura da mandioca.

Recentemente, quatro acessos (90, 520, 1209 e 1363) do Banco Ativo de Germoplasma (BAG-mandioca) de Cruz das Almas, apresentando sintomas de infecção viral foram analisados por RCA-PCR, confirmando a presença de begomovírus nestes acessos, um fato inédito no Brasil. Diante desta descoberta, o objetivo deste trabalho foi realizar a identificação molecular parcial deste(s) begomovírus, bem como identificar begomovírus presentes em plantas daninhas associadas à cultura da mandioca.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta e extração de DNA de mandioca

Foram coletados em 2012 amostras foliares de cinco acessos de mandioca (90, 520, 1209 e 1363) que fazem parte do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF) (Tabela 1). Todos os acessos apresentavam sintomas de infecção viral (Figura 1).

O DNA total foi extraído seguindo a metodologia proposta por Dellaporta et al., (1983). Cerca de 0,5 g de folhas foram maceradas em nitrogênio líquido. O tecido triturado foi transferido para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL contendo 750 µL de tampão de extração (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM de NaCl, 50 mM de EDTA, 10 mM 2-mercaptoetanol, 20% de SDS). O tubo foi agitado em vortex durante 2 minutos e incubado à temperatura de 65°C durante 15 min. Subsequentemente, 1 volume (V) de clorofórmio:álcool iso-amílico (24:1) foi adicionado a cada tubo. Em seguida agitou-se por 2 minutos, centrifugou-se a 10.000 rpm durante 10 minutos, e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. O DNA foi precipitado pela adição de um volume de isopropanol e centrifugado a 10.000 rpm durante 10 minutos. O sedimento foi lavado com 500 µL de etanol a 70%, e ressuspenso em 100 µL de TE (Tris-HCl 10nM, pH 8,0; EDTA 1mM) com RNase A. A qualidade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1 %.

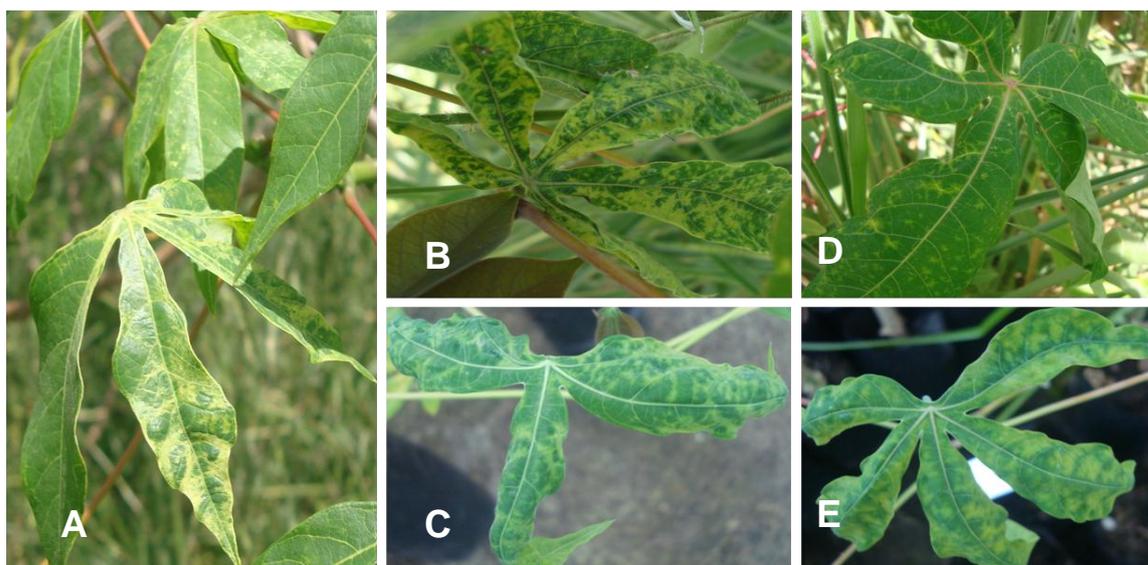


Figura 1: Acessos de mandioca do BAG com suspeita de infecção por begomovírus. (A) BGM – 90, (B) BGM – 520, (C) BGM – 1209, (D) BGM – 1362, (E) BGM - 1363.

TABELA 1: Acessos de mandioca infectados com begomovírus analisados durante o desenvolvimento deste trabalho.

Acessos	Variedade	Origem
BGM - 90	Híbrido 049/71A	Itabuna-BA
BGM - 520	Vassourinha 1	Viçosa-MG
BGV-1209	Dinheiro	Iapoc-AP
BGV - 1362	Cambadinha	Desterro-PB
BGV - 1363	Sem nome	Desterro-PB

Coleta e extração do DNA de plantas daninhas

Foram coletadas 23 plantas daninhas presentes em plantios de mandioca em dois estados do Brasil: sendo 18 (dezoito) na Bahia (Cruz das Almas e Vitória da Conquista) e 5 (cinco) no Paraná (Paranavaí). Todas as plantas apresentavam sintomas típicos de infecção por begomovírus, incluindo clorose, distorção foliar, mosaico e clareamento das nervuras (Figura 2).

O DNA total foi extraído utilizando o protocolo descrito por Doyle & Doyle (1987). Macerou-se cerca de 300 mg de folha em almofariz na presença de nitrogênio líquido, transferindo-se em seguida para microtubos de 2,0 mL. Em seguida adicionou 1000 µL do tampão de extração (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0); 20 mM EDTA, pH 8,0; 1% polivinilpirrolidona; 0,4% 2-mercaptoethanol), homogeneizou em vortex suavemente durante 5 minutos e incubou em banho-maria a 65°C por 15 minutos. Posteriormente, adicionou-se 700 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), a amostra foi misturada até formar uma emulsão que foi então centrifugada por 10 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novo tubo, adicionou-se novamente 700 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), seguido por uma homogeneização e centrifugação por 10 minutos a 10.000 rpm. O DNA foi precipitado pela adição de 450 µL de álcool isopropílico gelado, seguido da centrifugação por 10 minutos a 10.000 rpm. O DNA foi ressuspendido em 600 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1mM), seguido pela adição de 200 µL de acetato de amônio a 7,5

M, homogeneizado suavemente por inversão e incubado no gelo por 15 minutos. Em seguida realizou-se uma centrifugação por 15 minutos a 10.000 rpm, o sobrenadante transferido para novos tubos. Adicionou-se 800 µL de etanol absoluto e incubou-se por 1 hora a - 20°C. Após uma centrifugação por 10 minutos a 10.000 rpm o pellet foi lavado duas vezes com 500 µL etanol 70% e ressuspendido em 100 µL de TE com RNase e incubou em estufa a 37°C por 1 hora, e o DNA armazenado a - 20°C.



Figura 2: Plantas daninhas apresentando sintomas de mosaico amarelo, redução foliar e bolhosidade em decorrência da infecção por begomovírus. (A) *Ipomea*, (B) *Leonurus* e (C) *Solanum*.

Amplificação do DNA via RCA

O DNA total extraído de plantas de mandioca e plantas daninhas foi utilizado para a amplificação do DNA genômico de begomovirus pela técnica de amplificação por círculo rolante (RCA) utilizando-se o Kit Illustra Templiphi amplification Kit (GE Healthcare), como segue: em um microtubo foram adicionados 1 µL do DNA total, 5 µL do tampão de amostra, em seguida aquecidos a 95 °C durante 3 minutos, sendo transferidas imediatamente para o gelo. Em seguida foram adicionados 5 µL de tampão de reação e 0,2 µL de mistura contendo a polimerase (DNA polimerase Phi29) e hexâmeros aleatórios. A reação foi incubada por 18 horas a 30°C, seguido da inativação da enzima a 65°C por 10 minutos. A qualidade e uma estimativa da quantidade dos produtos de RCA foram analisadas por eletroforese.

Amplificação do fragmento viral por PCR

A detecção da presença de begomovirus nas amostras de mandioca e plantas daninhas foi realizada via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando primers universais para begomovírus, PALv1978 e PARc496 (ROJAS et al., 1993). Inicialmente utilizou-se como molde o DNA total (100 ng), entretanto devido a ineficiente amplificação do fragmento por PCR com o DNA total, passou-se a utilizar o DNA viral amplificado por RCA como molde para as reações de PCR. A presença de um fragmento esperado de 1100 pb foi confirmada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1 % em TAE 0,5 X. O fragmento amplificado foi então purificado do gel de agarose utilizando o Kit Illustra PCR and GEL purification (GE Healthcare) de acordo com as especificações do fabricante. A qualidade e concentração do DNA foram avaliadas em gel de agarose a 1%.

Sequenciamento e análise genômicas

Os fragmentos de PCR, foram purificados e sequenciados na Macrogen Inc. (Coréia do Sul) utilizando os primer PALv1978 (F) e PARc496 (R). A sequência consenso de cada isolado foi obtida pelo alinhamento das sequências F e R geradas pelo programa SeqAssem. O programa Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foi utilizado para a identificação de sequências similares no banco de dados, GenBank. As sequências parciais de nucleotídeos do DNA-A dos diferentes isolados virais foram analisadas, comparadas entre si e alinhadas utilizando o programa Clustal W (Thompson et al., 1994). Árvores filogenéticas foram construídas com o programa MEGA 5 (Tamura et al., 2011), usando o algoritmo de Neighbor-Joining com 10000 bootstrap de repetições.

RESULTADOS

Identificação molecular parcial de begomovírus presentes em *Manihot esculenta*

Durante o processo de indexação do BAG de mandioca do CNPMF realizado em 2009, nos acessos 90, 520, 1209, 1362 e 1363 (Híbrido 049/71A, Vasourinha 1, Dinheiro, Mandioca cambadinha e sem nome) foi possível detectar o vírus do mosaico comum (*Cassava commom mosaic virus*, CsCMV) em todos os cinco acessos, através da ELISA-indireto, do vírus do mosaico das nervuras (*Cassava vein mosaic virus*, CsVMV) nos acessos 520, 1209, 1362 e 1363 e fitoplasma nos acessos 520, 1209, 1362, via técnica da PCR.

Além destes patógenos, foi detectado por RCA-PCR a presença de begomovírus nestes cinco acessos, fato ainda não relatado no Brasil. Visando a identificação molecular e a consequente identificação da(s) espécie(s) de begomovírus presentes, foi feita a amplificação do DNA genômico destes vírus pela técnica de amplificação por círculo rolante (RCA) (Figura 3A).

Entretanto, devido a dificuldades no processo de clonagem (baixa quantidade de DNA viral amplificado que dificultava o processo de digestão por enzima de restrição), optou-se por utilizar o DNA viral amplificado por RCA como molde para a obtenção de um fragmento do genoma viral via PCR. A região genômica amplificada para a análise corresponde à parte do gene que codifica a proteína associada à replicação (Rep), a região comum e parte da proteína capsidial (CP).

Utilizando o DNA viral amplificado via RCA como molde na reação de PCR foi possível amplificar um fragmento de aproximadamente 1100 pb dos cinco isolados de mandioca: 90, 520, 1209, 1362 e 1363 (Figura 3B). Os fragmentos foram purificados e sequenciados, exceto o isolado do acesso 1362 cuja sequência não tinha boa qualidade e não foi utilizada neste trabalho. As sequências dos isolados passaram a ser denominados de BGV-90, BGV-520, BGV-1209 e BGV-1363.

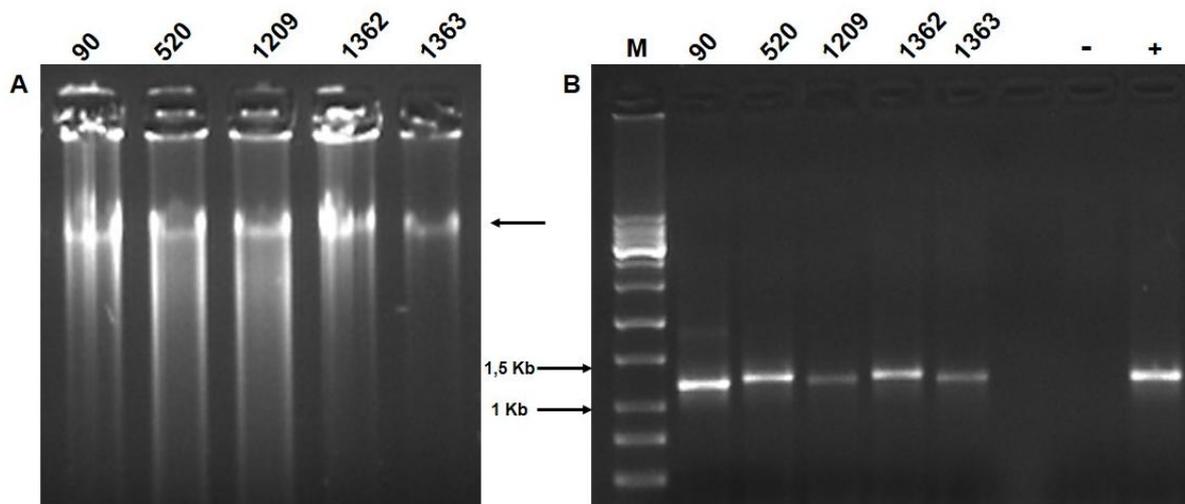


Figura 3: (A) Amplificação do DNA genômico de begomovírus via RCA (seta) dos acessos de mandioca sintomáticas. **(B)** Amplificação por PCR de um fragmento de aproximadamente 1100 pb utilizando o DNA amplificado por RCA dos acessos de mandioca. M, marcador de peso molecular 1 Kb, (-) controle negativo, (+) controle positivo oriundo de uma planta daninha.

A análise comparativa das sequências mostrou que os isolados BGV-90 e BGV-1209 possuem uma identidade de 96% entre si, enquanto que os isolados BGV-520 e BGV-1363 compartilham identidade de 91% (Tabela 2). Em contrapartida, os isolados BGV-90 e BGV-1209 apresentaram 74% e 78% de identidade com os isolados BGV-520 e BGV-1363, respectivamente.

Considerando a sequência parcial de nucleotídeos do DNA-A e usando o programa BLASTn para a busca de sequências similares no GeneBank, os isolados BGV-90 e BGV-1209 apresentaram uma alta identidade com o *Leonurus mosaic virus* (LeMV) e *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), com 95/94% e 93/92%, respectivamente (Tabela 2). Ao realizar a comparação das sequências dos isolados BGV-520 e BGV-1363 com as disponíveis no banco de dados (GenBank), estes apresentaram maior identidade com o *Passionfruit severe leaf distortion virus* (PSLDV), com 95 e 90 %, respectivamente (Tabela 2).

Os isolados em estudo provavelmente pertencem às espécies próximas pela identidade apresentada. De acordo com o 9º relatório do ICTV, isolados cuja identidade de sequências do DNA-A completo seja superior a 89% são considerados da mesma espécie (King et al., 2012). Porém pelo fato de termos

apenas sequências parciais, não podemos afirmar que os isolados BGV 90/BGV-1209 e BGV-520/BGV-1363 são isolados de uma mesma espécie. Da mesma forma, não é possível afirmar que os isolados BGV 90/BGV-1209 e BGV-520/BGV-1363 sejam isolados do LeMV/ToYSV e PSLDV, respectivamente.

TABELA 2: Percentual de identidade entre sequências parciais de nucleotídeos do DNA-A dos begomovirus presentes nos acessos de mandioca e outras espécies de begomovirus.

	BGV 90	BGV-520	BGV-1209	BGV-1363
BGV 90	-			
BGV-520	74	-		
BGV-1209	96	78	-	
BGV-1363	74	91	78	-
LeMV	93	56	95	55
SiMoV	75	58	79	54
SiMMV	75	58	79	54
OMoV	75	58	79	55
EuMV	50	52	51	47
CiLCrV	60	54	60	51
ToYSV	92	74	94	74
ToRMV	71	57	70	54
ToYVSV	65	66	66	63
ToMLCV	62	83	62	84
PSLDV	74	95	78	90
PYMPV	58	78	57	75
ACMV	58	54	51	50

Análises filogenéticas baseadas na sequência parcial de nucleotídeos do DNA-A permitiu agrupar os isolados de acordo com a região geográfica e com base em seus hospedeiros. Esta análise indicou que os isolados de mandioca formaram dois grupos distintos (Figura 4). Os isolados BGV-90 e BGV-1209 foram colocados em um grupo, com 99 % de valor de bootstrap, que inclui dois begomovírus infectando plantas daninhas: *Leonurus* no Brasil e Paraguai (LeMV) e *Sida* no Brasil (SiMoV) e dois begomovírus infectando plantas cultivadas no Brasil: ToYSV, que infecta tomateiro e Okra mottle vírus (OMoV), que infecta quiabo. Os isolados BGV-520 e BGV-1363 formaram outro grupo, com 96 % de valor de bootstrap, se posicionando próximo ao PSLDV e com outros begomovírus isolados de plantas cultivadas, especialmente solanáceas, encontrados na América do Sul e Central e um begomovírus infectando planta daninha do gênero *Sida* (*Sida yellow mosaic virus*, SiYMV).

As sequências genômicas parciais dos isolados de mandioca quando comparadas entre si revelaram que provavelmente se tratam de duas espécies distintas, uma presente nos acessos 90 e 1209 e outra nos acessos 520 e 1363.

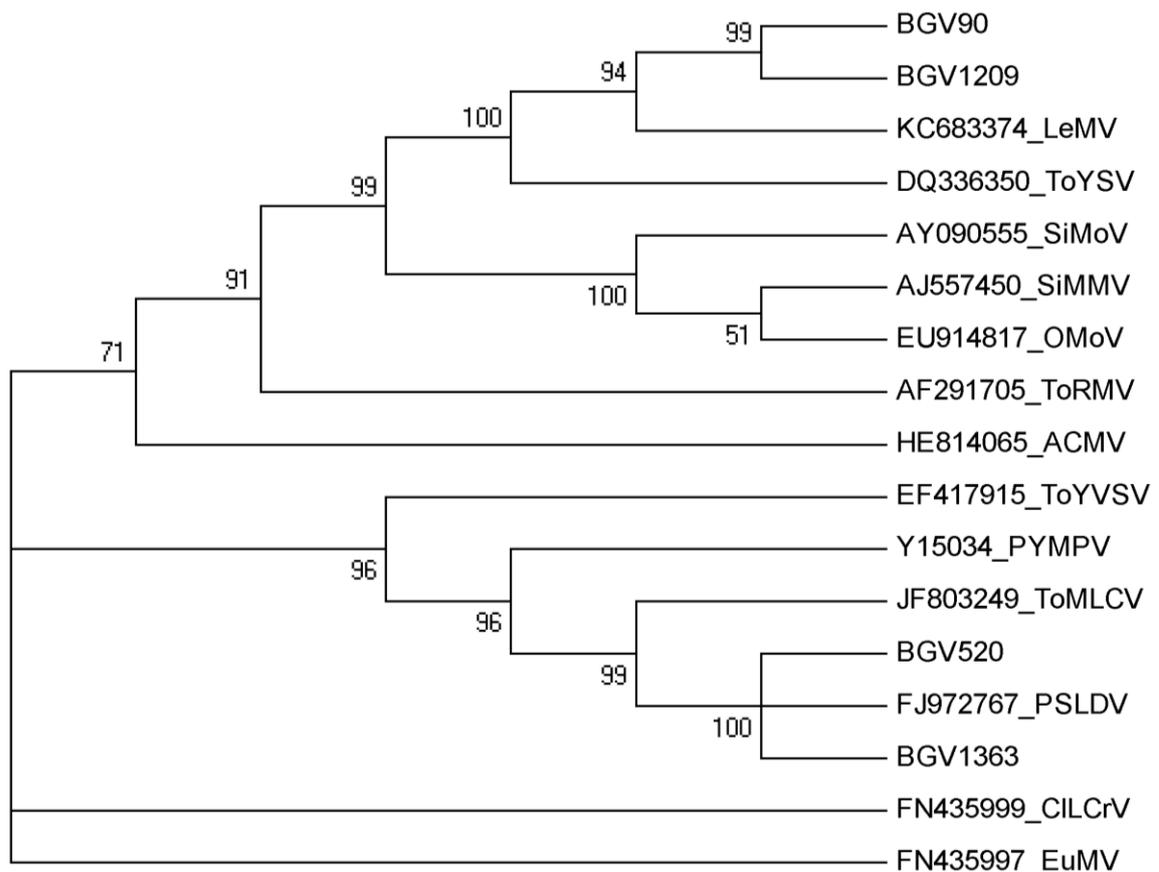


Figura 4. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento da sequência parcial do DNA-A dos isolados de mandioca e outras espécies de begomovírus de diferentes hospedeiros. Foi utilizado o programa Mega 5.0 (Tamura et al., 2011), método “Neighbor-Joining” e bootstrap com 10000 repetições.

Identificação molecular parcial de begomovírus infectando plantas daninhas associados à cultura da mandioca

Diante de inúmeras evidências de que atualmente os begomovírus presentes nas plantas cultivadas tem sua origem nas plantas daninhas, foram coletadas plantas daninhas apresentando sintomas típicos de begomovírus em cultivos de mandioca nos estados brasileiros da Bahia e Paraná. No total, vinte e três amostras de plantas daninhas foram coletadas e testadas, detectando begomovírus em dezenove amostras. Neste trabalho foram utilizadas treze amostras, cujo fragmento do genoma sequenciado apresentou boa qualidade para as análises (Tabela 3).

Tabela 3: Plantas daninhas coletadas em regiões produtoras de mandioca, e avaliadas neste trabalho.

ISOLADOS	NOME COMUM	HOSPEDEIRO	FAMÍLIA	LOCALIZAÇÃO	ANO
1. P-144	Siratro	<i>Macroptilium atropurpureum</i> (DC.) urb.	Fabaceae	Cruz das Almas-BA	2011
2. P-145	Mussambê	<i>Cleome gynandra</i> L.	Cleomaceae	Cruz das Almas-BA	2011
3. P-146	Erva – de – Macaé	<i>Leonurus sibiricus</i>	Lamiaceae	Paranavai-PR	2011
4. P-173	Picão-grande	<i>Blainvillea acmella</i> (L.) philipson	Asteraceae	Cruz das Almas-BA	2011
5. P-175	Corda – de – viola	<i>Ipomoea purpurea</i>	Convolvulaceae	Cruz das Almas-BA	2011
6. P-176	Leiteira	<i>Euphorbia heterophylla</i> L.	Euphorbiaceae	Cruz das Almas-BA	2011
7.P-269	Maracujá	<i>Passiflora edulis</i>	Passifloraceae	Livramento de Nossa Senhora-BA	2013
8.P-270	Não identificada	Não identificada	Não identificada	Vitória da Conquista-BA	2010
9. P-271	Malva	<i>Sidastrum micranthum</i>	Malvaceae	Vitória da Conquista-BA	2010
10.P-273	Maracujá	<i>Passiflora cincinnata</i>	Passifloraceae	Vitória da Conquista-BA	2010
11. P-275	Guanxuma	<i>Sida rhombifolia</i> L.	Malvaceae	Paranavai-PR	2011
12. P-276	Guanxuma	<i>Sida rhombifolia</i> L.	Malvaceae	Paranavai-PR	2011
13. P-278	Leiteira	<i>Euphorbia heterophylla</i> L.	Euphorbiaceae	Paranavai-PR	2011

O DNA total extraído das amostras de plantas daninhas foi utilizado para a amplificação do genoma via RCA (Figura 5A), que por sua vez, foi utilizado como

molde nas reações de PCR, sendo possível amplificar um fragmento de aproximadamente 1100 pb (Figura 5B), que foi sequenciado.

Análises comparativas da sequência parcial do DNA-A dos isolados em estudo com o banco de dados (GenBank), indicou que os treze isolados provavelmente correspondem a seis diferentes espécies de begomovírus, visto que os valores de identidade estão entre 93 e 99%, com exceção dos isolados P-175 e P-271, que apresentaram valores abaixo de 89%, e com isso podem representar novas espécies (Tabela 4).

O isolado P-144 de *Macroptilium atropurpureus* correspondeu a um isolado de *Cowpea golden mosaic virus* (CGMV), com 94% de identidade com o DNA-A de um isolado CGMV do Brasil.

O isolado P-145 obtido de *Cleome gynandra* L., correspondeu ao isolado *Cleome leaf crumple virus* (CILCrV), com 93% de identidade com um isolado CILCrV do Brasil. Recentemente, um novo begomovírus, *Cleome leaf crumple virus* (CILCrV) foi encontrado infectando plantas daninhas do gênero *Cleome* no estado do Mato Grosso do Sul (Paprotka et al., 2010).

Os isolados P-146 (*Leonurus sibiricus*), P-269 (*Passiflora edulis*), P-270 (hospedeiro não identificado) e P-273 (*Passiflora cincinnata*) apresentaram maior identidade de sequência com LeMV, com 94%, 94%, 95% e 94%, respectivamente. Esta informação reforça a hipótese de que o BGV-90 e BGV-1209 possam realmente ter como hospedeiras o *L. sibiricus* e alguma espécie de maracujá, possivelmente uma espécie de maracujá selvagem. Neste contexto, o maracujá pode também ser o hospedeiro dos isolados BGV-520 e BGN 1363 que apresentam alta identidade com o PSLDV, uma espécie de begomovírus identificado em maracujá, mas que apresenta maior identidade de sequências com begomovirus de tomateiro (ToCMoV e ToYSV) (Ferreira et al., 2010).

O isolado P-173 de *Blainvillea acmella*, correspondeu ao isolado *Blainvillea yellow spot virus* (BIYSV), com 96% de identidade. Os isolados P-176 e P-278 obtidos de *Euphorbia heterophylla* tiveram alta identidade com o isolado *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV), com 99% e 96% de identidade,

respectivamente. Os isolados P-275 e P-276 oriundos de *Sida rhombifolia* L., apresentaram maior identidade com SiMMV, com 97% e 93%, respectivamente.

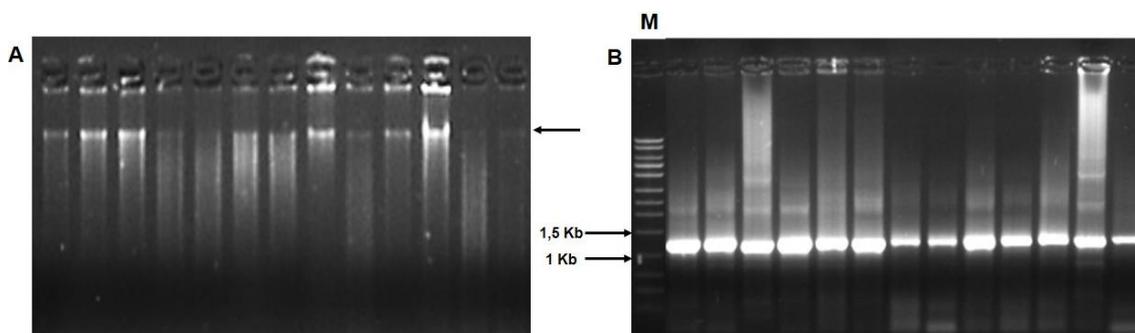


Figura 5: (A) Amplificação do DNA genômico de begomovírus (seta) via RCA das plantas daninhas sintomáticas. (B) Amplificação por PCR do fragmento de aproximadamente 1100 pb das plantas daninhas coletadas em áreas de cultivo de mandioca. M, marcador de peso molecular 1 Kb.

TABELA 4: Espécies de begomovirus que apresentaram maior identidade com os isolados de begomovirus presentes nas plantas daninhas coletadas em cultivo de mandioca e nos acessos de mandioca analisados.

ISOLADO	BEGOMOVÍRUS COM MAIOR IDENTIDADE	ACESSOS 90/1209	ACESSOS 520/1363
P-144	CaGMV (94%)	67/69%	62/64%
P-145	CILCrV (93%)	66/67%	64/63%
P-146	LeMV (94%)	93/98%	66/67%
P-173	BIYSV (96%)	50/50%	54/50%
P-175	CILCrV (82%)	61/59%	52/51%
P-176	EuYMV (99%)	64/60%	63/58%
P-269	LeMV (94%)	92/98%	65/68%
P-270	LeMV (95%)	95/98%	68/69%
P-271	SiCmMV (81%)	79/75%	69/69%
P-273	LeMV (94%)	89/97%	65/66%
P-275	SiMMV (97%)	70/75%	69/62%
P-276	SiMMV (93%)	72/76%	66/63%
P-278	EuYMV (96%)	58/61%	63/56%

O isolado P-175 de *Ipomoea purpurea* é uma possível representante de uma nova espécie, que foi mais estritamente relacionada com o isolado CILCrV (82% de identidade). Uma outra possível nova espécie é representada pelo isolado P-271 de *Sidastrum micranthum*, que foi mais relacionada ao isolado *Sida commom mosaic virus* (81% de identidade). Entretanto, para se confirmar que estes dois isolados correspondem mesmo a novas espécies será necessário obter a sequência completa do DNA-A, e esta deverá possuir menos que 89% de identidade com espécies já caracterizadas (King et al., 2012).

A partir das análises filogenéticas, os isolados detectados nas plantas daninhas foram posicionados em cinco grupos distintos (Figura 6). Os isolados presentes no grupo I (P-175, P-145) se agruparam apenas com o CILCrV, em uma ramificação distante do restante das espécies, indicando que estes dois isolados tem um relacionamento com o CILCrV, apesar do isolado P-175 apresentar uma menor identidade a nível de sequência. De forma similar, os isolados presentes no grupo II (P-176 e P-278) se agruparam apenas com o EuYMV, evidenciando um maior distanciamento dos outros.

No grupo III, encontram-se os isolados P-275 e P-276, junto a begomovírus isolados do tomateiro (ToRMV e ToSRV), mas que já foram detectados naturalmente infectando plantas daninhas (Fernandes et al., 2006; Barbosa et al. 2009), além do SiMMV, isolado de *S. micranta*.

O grupo IV incluiu os isolados P-146, P-269, P-270, e P-273, os identificados em mandioca (BGV-90 e BGV-1209), o ToYSV que apesar de também ter sido identificado em tomateiro, originou-se de um evento de recombinação entre um vírus proveniente de *Sida* e um outro parental ainda desconhecido (Andrade et al., 2006).

O grupo V encontra os isolados P-144 e P-173 com outros begomovírus que foram isolados das mesmas espécies de plantas daninhas que eles foram, evidenciando que estas espécies são específicas dessas plantas. O único isolado que foi posicionado em um ramo isolado foi o P-271, que está próximo ao SiCmMV, que também foi isolado de *Sida*. Este fato reforça a possibilidade de se configurar em uma nova espécie de begomovírus.

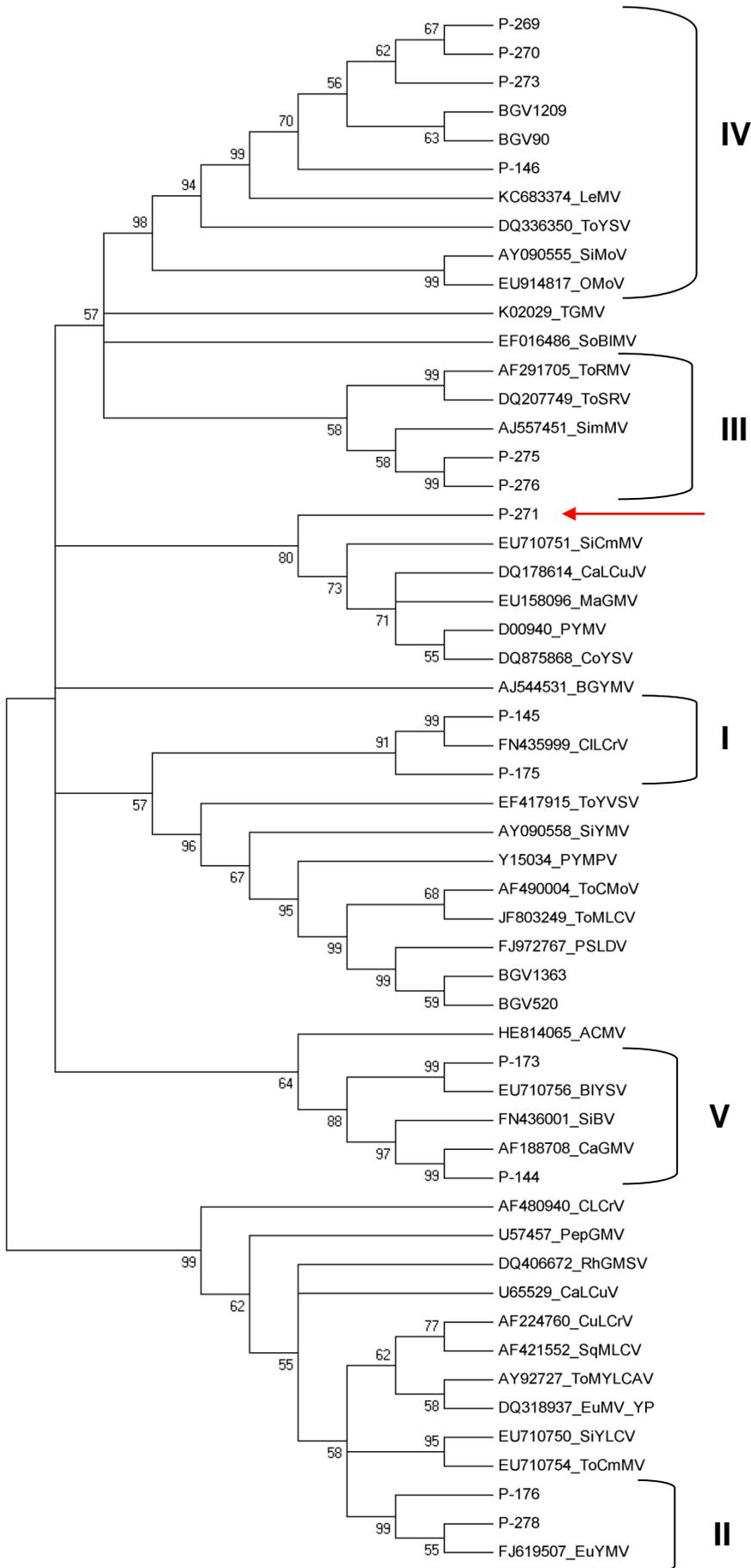


Figura 6: Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento da sequência parcial do DNA-A dos isolados de begomovirus de plantas daninhas, de mandioca e com outras espécies de begomovirus de diferentes hospedeiros. Foi utilizado o programa Mega 5.0 (Tamura et al., 2011), método “Neighbor-Joining” e bootstrap com 10000 repetições. Begomovirus usados nas análises (Silva et al., 2012): *Blainvillea yellow spot virus* (BIYSV); *Cleome leaf crumple virus* (CLCrV); *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV); *Okra mottle virus* (OmoV); *Passionfruit severe leaf distortion virus* (PSLDV); *Sida common mosaic virus* (SiCmMV); *Sida mosaic Brazil virus* (SiMBV); *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV); *Sida mottle virus* (SiMoV); *Sida yellow leaf curl virus* (SiYLCV); *Sida yellow mosaic virus* (SiYMV); *Soybean blistering mosaic virus* (SoBIMV); *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV); *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV); *Tomato golden mosaic virus* (TGMV); *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV); *Tomato severe rugose* (ToSRV); *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV); *Macroptilium golden mosaic virus* (MaGMV); *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV); *Rhyncosia golden mosaic Sinaloa virus* (RhGMSV); *Squash mild leaf curl virus* (SqMLCV); *Euphorbia mosaic virus* (EuMV); *Cowpea Golden mosaic virus* (CaGMV); *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMLCV); *Tomato yellow spot virus* (ToYSV); *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV); *Potato yellow mosaic Panama virus* (PYMPV); *Potato yellow mosaic virus* (PYMV); *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV); *Cabbage leaf curl Jamaica virus* (CaLCuJV); *Tomato mild yellow leaf curl Aragua virus* (ToMYLCAV); *Cotton leaf curl virus* (CLCrV); *Corchorus yellow spot virus* (CoYSV).

DISCUSSÃO

O presente trabalho descreve pela primeira vez no Brasil a identificação molecular parcial de begomovírus isolado de mandioca. Apesar dos begomovírus no Brasil serem um grande problema fitossanitário nas culturas do tomateiro e do feijoeiro, a identificação de geminivírus em outros hospedeiros, como a mandioca, é de grande importância. Isso demonstra a rápida evolução e adaptação das espécies dessa família a novos hospedeiros. Isso também pode ser um indício de que o biótipo B de *Bemisia tabaci* presente no Brasil está se adaptando a mandioca. Estudos demonstram a capacidade de populações *B. tabaci* provenientes de hospedeiros alternativos em se adaptar a mandioca (Carabali et al., 2005).

A análise das sequências parciais do DNA-A dos isolados BGV-90 e BGV-1209 apresentaram maior identidade com o LeMV, um begomovírus presente em plantas daninhas e cultivadas. *Leonurus mosaic virus* – LeMV é, até o presente momento, a única espécie de *Begomovirus* formalmente registrada nesta hospedeira no Brasil (Faria & Maxwell, 1999; Colariccio et al., 2007). Ele foi o begomovirus mais frequente nas amostras coletadas em áreas com plantios de mandioca. Estes dados reforçam a capacidade de begomovirus em se adaptar a diferentes hospedeiros, visto que a mandioca, o *Leonurus* e o maracujá pertencem a famílias botânicas distintas. A possibilidade de que begomovírus passem a ser um grande problema fitossanitário em plantas de mandioca num futuro próximo não deve ser descartada.

Os isolados BGV-520 e BGV-1363 mostraram alta identidade de sequência com PSLDV (95% e 90%), vírus recentemente encontrado infectando maracujazeiro no Brasil. O PSLDV infecta com tanta eficiência espécies de solanáceas, mas não o tomateiro, sugerindo que durante o processo evolutivo ele pode ter se adaptado ao maracujazeiro e/ou perdido a capacidade de infectar o tomateiro (Ferreira et al., 2010). Fato similar pode ocorrer com begomovírus em mandioca no Brasil.

As 13 espécies de plantas daninhas constatadas como hospedeiras de *Begomovirus* neste trabalho estão distribuídas em oito famílias botânicas: Fabaceae, Cleomaceae, Lamiaceae, Convolvulaceae, Euphorbiaceae,

Passifloraceae e Malvaceae. A infecção por *Begomovirus* têm sido considerada muito frequente na maioria dessas espécies. Neste trabalho detectou-se seis espécies diferentes de *Begomovirus* nas plantas analisadas. Resultados similares já foram encontrados, espécies de plantas invasoras das famílias Malvaceae, Euphorbiaceae, Lamiaceae, Cleomaceae e Fabaceae têm sido relatadas como hospedeiras de begomovírus em vários países (Morales & Anderson, 2001), inclusive no Brasil (Assunção et al., 2006).

Plantas daninhas têm chamado a atenção de pesquisadores porque servem como reservatórios para vários geminivírus e, assim, atuam como hospedeiros adequados para recombinação gênica dos vírus. Como muitas plantas daninhas são perenes, elas podem manter populações virais na entressafra (Assunção et al., 2006).

Em estudos recentes com plantas de *Cleome* e plantas daninhas leguminosas da família Fabaceae observou-se fortes evidências de eventos de recombinação entre os vírus estudados. No trabalho com a *Cleome affinis*, apenas um vírus (*Cleome leaf crumple vírus*, CLCrV) foi encontrado, porém múltiplos eventos de recombinação foram detectados, sugerindo que *C. affinis* pode agir como uma fonte de novos vírus para as plantas cultivadas (Silva et al., 2011). Já no estudo com daninhas leguminosas seis espécies virais foram encontradas, sendo quatro espécies novas e ainda evidências de recombinação. Os resultados indicam que as plantas daninhas leguminosas da família Fabaceae são reservatórios de vários begomovírus no Brasil, e podem desempenhar um papel significativo nas suas epidemias tanto como fonte de inóculo quanto como fontes de novos vírus (Silva et al., 2012).

A detecção de isolados de begomovírus com elevada identidade com o LeMV tanto nas plantas daninhas como nas cultivadas (maracujá) coletadas em áreas de mandioca, evidência que estes vírus estão próximos a mandioca, e que a mosca-branca, mesmo que de forma isolada, é capaz de introduzi-los.

A identificação molecular parcial de begomovírus presentes em plantas daninhas coletada em plantios de mandioca reforça dados de levantamentos já realizados no Brasil, de que existe uma grande diversidade de espécies de begomovírus infectando estas plantas, e que tem sido introduzido em espécies cultivadas pela mosca-branca. Diferentes espécies de plantas invasoras como:

Cleome affinis D.C., *Cnidocolus urens* (L.), *Macroptillium lathyroides* (L.), *Leonurus sibiricus*, *Sida rhombifolia*, *Herissantia crispa* (L.) Brizicky, *Sida micrantha* e *S. Spinosa* (L.), *Waltheria indica* L. e *Triumfetta semitriloba* Jacq. têm sido relatadas como hospedeiras de begomovírus no Brasil, constituindo um importante reservatório de vírus que podem ser transmitidos para espécies cultivadas (Faria & Maxwell, 1999; Assunção et al., 2006).

CONCLUSÕES

Espécies de begomovírus foram encontradas em plantas de mandioca no Brasil. Uma amostragem realizada no Banco Ativo de Germoplasma de mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura demonstrou a presença de duas possíveis espécies infectando acessos de mandioca. Análises comparativas da sequência parcial de nucleotídeo do DNA-A dos isolados coletados em mandioca (BGV 90, BGV-520, BGV-1209 e BGV-1363) apontam para a existência de duas espécies nestas plantas, sendo os isolados BGV 90/BGV-1209 com elevada identidade com o LeMV (93/95%) e os isolados BGV-520/BGV-1363 com elevada identidade com o PSLDV (95/90%).

Seis espécies de begomovírus foram identificadas nas plantas daninhas associadas à mandioca, evidenciando uma grande diversidade de begomovírus presentes nelas. Quatro desses isolados apresentaram elevada identidade com os isolados BGV 90/BGV 1209 e com o LeMV.

Os isolados P-175 e P-271 podem representar duas novas espécies de begomovírus, visto que, apresentaram identidade menor que 89%.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Em função dos resultados obtidos é importante uma análise futura de um número maior de plantas de mandioca na busca por outros begomovírus e a realização do sequenciamento completo do genoma A desses isolados e outros isolados para permitir uma classificação dos mesmos.

Outro aspecto que pode ser avaliado é o estudo de transmissão destes begomovírus pela mosca-branca para plantas de mandioca, com o intuito de melhor caracterizar biologicamente os isolados identificados.

Também é importante selecionar plantas com resistência para begomovirus pela sua inoculação com clones infecciosos de begomovírus via biobalística.

REFERÊNCIAS

- Andrade EC, Manhani GG, Alfenas PF, Calegario RF, Fontes E.P.B., Zerbini, F.M (2006) *Tomato yellow spot virus*, a tomato-infecting begomovirus from Brazil with a closer relationship to viruses from *Sida* sp., forms pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from *Sida*. *Journal of General Virology* 87: 3687–3696.
- Assunção IP, Listik AF, Barros MCS, Amorim EPR, Silva SJC, Izael O, Silva O, Ramalho-Neto CE, Lima GSA (2006) Diversidade genética de begomovírus que infectam plantas invasoras na região nordeste. *Planta Daninha* 24(2): 239-244.
- Barbosa, J.C., Barreto, S.S., Inoue-Nagata, A.K., Reis, M.S., Firmino, A.C., Bergamin-Filho, A., Rezende, J.A.M (2009). Natural infection of *Nicandra physaloides* by- :*Tomato severe rugose mosaic virus* in Brazil. *Journal of General Plant Pathology* 75:440-443.
- Bellotti, A. C., Arias,B (2001). Host plant resistance to whiteflies with emphasis on cassava as a case study. *Crop Prot.* 20:813–823.
- Briddon, R.W (2003). Cotton leaf curl disease, a multicomponent begomoviruscomplex. *Molecular Plant Pathology* 4: 427-434.
- Brown JK, Bird J (1995) Variability within the *Bemisia tabaci* species complex and its relation to new epidemics caused by geminiviruses (1995). *Ceiba* 36: 73–80.
- Carabali A, Bellotti AC, Montoya Lerma J, Cuellar ME (2005) Adaptation of *Bemisia tabaci* biotype B (Gennadius) to cassava, *Manihot esculenta* (Crantz). *Crop-Protection* 24(7): 643-649.
- Colariccio A, Eiras M, Chaves ALR, Bergmann JC, Zerbini FM, Harakava R, Chagas CM, (2007) Tomato yellow vein streak virus, a new Begomovirus on tomato from Brazil: Complete DNA-A sequence and some molecular and biological features. *Journal of Plant Pathology* 89, 385–390.
- Costa AS, Russell LM (1975) Failure of *Bemisia tabaci* to breed on cassava plants in Brazil (Homoptera: Aleyrodidae). *Ciência e Cultura, São Paulo* 27: 388-390, 1975.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19-21.
- Doyle JJ, Doyle J (1987) A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15.
- Faria JC, Maxwell DP, (1999) Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. *Phytopathology* 89, 262–268.
- Fernandes JJ, Carvalho MG, Andrade EC, Brommonschenkel SH, Fontes EP B.& Zerbini, F. M. (2006) Biological and molecular properties of *Tomato rugose mosaic*

virus (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Plant Pathology* 55: 513-522.

Ferreira SS, Barros DR, Almeida MR, Zerbini FM (2010) Characterization of Passionfruit severe leaf distortion virus, a novel begomovirus infecting passionfruit in Brazil, reveals a close relationship with tomato-infecting begomoviruses. *Plant Pathology* 59: 221-230.

King, AMQ., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J., 2012. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, USA, pp. 541–637.

Monci F, Sanchez-Campos S, Navas-Castillo J, Moriones E (2002) A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Virology* 303: 317–26.

Morales FJ, Anderson PK (2001) The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Arch. Virol.* 146: 415-441.

Morales FJ, Jones PG (2004) The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. *Virus Research* 100: 57-65.

Oliveira MRV & Lima LHC (2006) Mosca branca na cultura da mandioca no Brasil. *Serie Documentos*, n. 186., 57p. Embrapa Recursos Geneticos e Biotecnologia.

Paprotka T, Metzler V, Jeske H (2010) The first DNA 1-like alpha satellites in association with New World begomoviruses in natural infections. *Virology* 404:148–157.

Polston JE & Anderson PK (1997) The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the Western Hemisphere. *Plant Disease* 81:1358-1369.

Ribeiro SG, Ambrozevícius LP, Ávila AC, Bezerra IC, Calegario RF, Fernandes JJ, Lima MF, de Mello RN, Rocha H, Zerbini FM (2003) Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology* 148: 281-295.

Rojas MR, Gilbertson RL, Russell DR, Maxwell DP (1993) Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77: 340-347.

Silva SJC, Castillo-Urquiza GP, Hora-Júnior BT, Assunção IP, Lima GSA, Pio-Ribeiro G, Mizubuti ESG, Zerbini FM (2012) Species diversity, phylogeny and genetic variability of begomovirus populations infecting leguminous weeds in northeastern Brazil. *Plant Pathology* 61: 457-467.

Silva SJC, Castillo-Urquiza GP, Hora-Júnior BT, Assunção IP, Lima GSA, Pio-Ribeiro G, Mizubuti ESG, Zerbini FM (2011) High genetic variability and

recombination in a begomovirus population infecting the ubiquitous weed *Cleome affinis* in northeastern Brazil. *Archives of Virology* 156: 2205-2213, 2011.

Stanley J, Bisaro DM, Briddon RW, Brown JK, Fauquet CM, Harrison BD, Rybicki EP, Stenger DC (2005) *Geminiviridae*. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (Ed) *Virus taxonomy*, VIIIth report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press, London, pp. 301–326.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.

Vásquez LL, Jiménez R, Iglesia M, Mateo A, Lopez D, Vera ER (1995) Moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) detectadas en los principales cultivos agrícolas de Cuba. *Manejo Integrado Plagas (Costa Rica)* 36:18–21.

Were HK, Winter S & Maiss E (2004) Viruses infecting cassava in Kenya. *Plant Disease* 88: 17-22.

plant disease

First Report of a Begomovirus infecting Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in Brazil

Journal:	<i>Plant Disease</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Plant Disease Note
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Santos-Silva, Adriana; Federal University of Reconcavo Bahiano, Velame, Karinna; Brazilian Agricultural Research Company (Embrapa Cassava & Fruits), Abreu, Emanuel; Brazilian Agricultural Research Company (Embrapa Cassava & Fruits), Andrade, Eduardo; Brazilian Agricultural Research Company (Embrapa Cassava & Fruits),
Keywords:	Viruses and viroids < Causal Agent, Pathogen detection < Subject Areas, Tropical plants < Crop Type

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3 **First Report of a Begomovirus infecting Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in**
4 **Brazil.**
5
6

7 **A. F. Santos-Silva¹, K.V.C. Velame², E. F. M. Abreu², and E. C. Andrade².**

8
9 ¹Federal University of Reconcavo Bahiano Cruz das Almas-BA, 44380-000, Brazil

10
11 ²Brazilian Agricultural Research Company (Embrapa Cassava & Fruits), Cruz das
12 Almas-BA, 44380-000, Brazil
13
14

15
16 Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is a major staple crop in developing countries and a
17 large source of raw material for industry as flour, starch, and ethanol. In January 2012 a
18 cassava plant exhibiting symptoms of virus infection (mosaic and leaf distortion) was
19 observed in the field of maintenance from the Brazilian Cassava Germplasm (located at
20 Embrapa Cassava & Fruits, Cruz das Almas, Bahia State, Brazil). The plant from the
21 accession BGM 90 was tested for the presence of a range of virus already reported on
22 cassava in Brazil and South America (1). Also, due to the quarantine nature of the
23 African cassava mosaic begomovirus (CMBs) in Brazil, we tested the plant for its
24 presence. To investigate specifically the presence of begomoviruses, total DNA was
25 extracted from 0.5 g of leaf tissue from symptomatic accession and asymptomatic plants
26 by a CTAB method. The PCR was carried out using begomoviruses degenerated
27 primers, targeting a viral region encompassing part of the Replication-associated protein
28 (Rep), the common region and part of the CP gene (2). No PCR amplification was
29 obtained from healthy cassava plants. In contrast, a 1.1 kb amplicon was obtained from
30 the BGM 90 accession plant indicating a presence of begomovirus. In order to
31 determine if this isolate belongs to the Brazilian quarantine CMBs list, it's a
32 characterized specie or even a new specie, the PCR product was purified and sequenced
33 by Macrogen, (Seoul, South Korea), and the consensus sequences compared with those
34 deposited on GeneBank. The sequence obtained shares highest identity (92%) with the
35 begomovirus Leonurus mosaic virus, isolate PAR07 (KC683374.1) (*E-Value* =0.0). In
36 contrast, the sequence shares an identity level of only 58% with ACMV (HE814065)
37 and 69% with EACMV (JF909067.1). This result confirms that the amplicon is from a
38 begomovirus, and it represents the first report of this genus of virus infecting cassava in
39 Brazil and South America. Also, and most important, based on the comparative analysis
40 of partial sequence obtained, we rule out the possibility that any specie of CMBs is
41 present in this plant. However, based on partial genome sequence we got, we're not able
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

to identify exactly which species is present in this plant. In accord with the ICTV, the begomovirus specie determination is based on the complete DNA-A sequence. We expect that it's is not likely to be an isolated case, and possible more cassava plants are infected with begomoviruses in Brazil. It will be important to expand the surveys to know if it just only one begomovirus specie in cassava or not, and which is/are the primarily host plant(s) for the virus.

References:

- (1) L.A. Calvert et al. Cassava viral disease in South America. In: Ospina, B., Ceballos, H. (Eds.), *Cassava in the Third Millennium: Modern production, Processing, Use and Marketing Systems*. CIAT, Cali, Colombia, pp.309-318, 2012.
- (2) Rojas et al. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77: 340-347, 1993.