



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE - UFCG
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE - CES

Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia - PPGCNBiotec

LARISSA CAVALCANTE COSTA

**DIVERSIDADE DE BEGOMOVÍRUS EM MOSCA BRANCA (*Bemisia tabaci*) na
PARAÍBA, MINAS GERAIS e DISTRITO FEDERAL**

CUITÉ PB

2015

LARISSA CAVALCANTE COSTA

**DIVERSIDADE DE BEGOMOVÍRUS EM MOSCA BRANCA (*Bemisia tabaci*) na
PARAÍBA, MINAS GERAIS e DISTRITO FEDERAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 31/07/2015

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Magnólia de Araújo Campos (Orientadora)

Prof^ª Dr^ª Luciana Cordeiro do Nascimento (Membro Externo)

Prof. Dr. Marcus José Conceição Lopes (Membro Externo)

Prof^ª Dr^ª Danielly Albuquerque da Costa (Membro Interno)

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Msc. Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

C837d Costa, Larissa Cavalcante.

Diversidade de Begomovírus em mosca branca (*Bemisia tabaci*) na Paraíba, Minas Gerais e Distrito Federal. / Larissa Cavalcante Costa. – Cuité: CES, 2015.

80 fl.

Dissertação (Curso de Mestrado em Ciências Naturais e Biotecnologia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2015.

Orientadora: Dra. Magnólia de Araújo Campos.
Coorientadora: Simone da Graça Ribeiro.

1. Begomovírus – DNA - A. 2. Begomovírus - diversidade.
3. *Geminiviridae*. I. Título.

CDU 595.7

LARISSA CAVALCANTE COSTA

**DIVERSIDADE DE BEGOMOVÍRUS EM MOSCA BRANCA (*Bemisia tabaci*) na
PARAÍBA, MINAS GERAIS e DISTRITO FEDERAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Magnólia de Araújo Campos

Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Simone da Graça Ribeiro

CUITÉ- PB
2015

**À MINHA AMADA FAMÍLIA, MEU EXEMPLO DE FORÇA E CORAGEM,
MEUS PAIS LUCINÉIA E MARCOS,
E AOS MEUS IRMÃOS LAYSA E LUCAS**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me amparar nos momentos mais difíceis, me dando força e coragem para superar as dificuldades, mostrando os caminhos nas horas incertas, me dando tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades. Sem o seu amor jamais conseguiria chegar até aqui.

Ao Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande por abrir as portas para a minha realização do Curso de Pós-Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia.

A CAPES, pela concessão de bolsa de estudo.

A EMBRAPA Cenargen, por ter cedido o espaço e Laboratório de Interação Plantas-Pragas III para execução do meu trabalho.

A Profa. Dra. Magnólia de Araújo Campos, minha orientadora, pela oportunidade de viver momentos únicos em Brasília DF, obrigada pelos ensinamentos, confiança e torcida. Que Deus lhe abençoe grandiosamente.

A Profa. Dra. Simone da Graça Ribeiro, minha coorientadora, por tudo que fez por mim, pelos ensinamentos, oportunidade de realizar meu trabalho na EMBRAPA Cenargen, pelas “puxadas de orelha”, pela ajuda durante os meses de execução do meu trabalho de dissertação.

A Bruno Malaquias, Wellyson e Érica da EMBRAPA Algodão, por terem me ajudado nas coletas de moscas brancas na Paraíba.

A Marcio Martinelo Sancher, que coletou as moscas brancas em soja e algodão em áreas do Buritis-MG.

As minhas amigas da EMBRAPA Cenargen, Paulinha, Vic, Dione, Gabi e Aninha, em especial Nat e Rafa, obrigada por tudo, por todos os ensinamentos, pelas palavras de otimismo, companheirismo, momentos de descontração e por me acolherem com tanto amor no laboratório... em palavras jamais conseguirei agradecer todos os momentos vividos durante esses meses. Onde quer que eu esteja sempre me lembrarei de vocês.

Ao meu tio Beto e sua esposa Cléa, por ter me acolhido todo esse tempo em sua casa, durante minha estadia em Brasília.

Aos meus pais, pelos valores, educação e por me ensinar a caminhar sozinha durante toda minha vida acadêmica. Obrigada por confiarem em mim, e me perdoem pela ausência durante todo esse tempo. A vocês que, muitas vezes, renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu, partilho a alegria deste momento. Aos meus irmãos Laysa e Lucas pela torcida, e por serem os melhores irmãos do mundo, muito obrigada por cuidarem dos nossos pais, proporcionando tanto orgulho. A minha amada vó Maria, pelas orações, e por torcer sempre pelo meu sucesso. “Quando não souberes para onde ir, olha para trás e sabe pelo menos de onde vens” (Provérbio africano).

Aos irmãos que Deus colocou em minha vida e escolhi para conviver: Wennia, Tamara, Elaine e Simone... a distância não nos separa. As minhas amadas amigas Paula e Sanny, que estiveram presente nos momentos em que mais precisei obrigada pela força, companheirismo, amizade e por todas as vezes que me ajudaram e torceram por mim. Seus corações estão comigo e o meu com vocês. E aos que sempre torceram por mim e acompanharam essa trajetória, meu muito obrigada, a Ray, Graci, Aninha, Franci, Laysa, Tácia e Cláudia.

Durante todo o processo seletivo, desde a aprovação até a conclusão do Mestrado, foi um longo caminho percorrido. Não foi nada fácil, nem tampouco tranquilo. “A sola do pé conhece toda a sujeira da estrada” (Provérbio africano).

Muito obrigada!!

“Confia no Senhor e faze o bem; habita na terra e alimenta-te da verdade.
Agrada-te do Senhor, e ele satisfará os desejos do teu coração. Entrega o teu
caminho ao Senhor, confia nele, e o mais ele fará. Fará sobressair a tua justiça
como a luz e o teu direito, como o sol ao meio-dia.”

SI 37:3-6

RESUMO

O gênero *Begomovirus* pertence à família Geminiviridae de vírus que infectam plantas e são transmitidos pelo vetor mosca branca (*Bemisia tabaci*), também considerado umas das maiores pragas da agricultura. O presente estudo investigou a diversidade de begomovírus presente no vetor mosca branca (*B. tabaci*) em áreas da Paraíba, Minas Gerais e Distrito Federal. Um total de 17 amostras de moscas brancas foi coletado a partir de 12 espécies vegetais em áreas da Paraíba, Minas Gerais e Distrito Federal e usado para detecção do DNA-A de begomovirus por PCR, por RCA e por PCR-RCA, com primers específicos. Amplicons virais foram clonados e os clones recombinantes foram selecionados sob meio de cultura seletivo, contendo X-Gal e IPTG. A presença de amplicons foi confirmada por padrões de restrição gerados pelas enzimas *EcoR* I e *Msp* I em DNAs plasmidiais isolados dos clones selecionados e, então, sequenciados. As sequências de DNA-A de begomovírus isoladas de moscas brancas coletadas em plantas de algodoeiro EMEPA-PB, em Emília, picão preto, barba-de-falcão, jatrofa, berinjela e malvona, presentes na área do Distrito Federal, foram analisadas quanto a porcentagem de identidade de sequências de nucleotídeos e agrupamentos filogenéticos comparando com outras sequências de isolados de begomovírus disponíveis no banco de dados GenBank. Como resultado, 5 espécies de begomovírus (SiYBV, CoMoV, SiMMV, BGMV e SiGLSV) evidenciaram a diversidade de begomovírus presente em moscas brancas nas áreas estudadas, mas que não necessariamente está presente nas respectivas plantas onde as moscas foram coletadas. Os primers PAL1v 1978 e PAR1c 496 descritos para detecção de DNA-A de begomovírus a partir de plantas foram eficientes para detecção específica desse componente genômico viral a partir do vetor mosca branca. A detecção específica de DNA-A do componente de begomovírus por PCR a partir do DNA total extraído de moscas brancas foi enriquecida pela amplificação por RCA. O begomovírus BGMV foi predominantemente encontrado em moscas brancas coletadas em plantas na área do Distrito Federal. A diversidade presente nos isolados dos 5 vírus identificados neste trabalho foi agrupada em 4 ramos filogenéticos suportados pela porcentagem de identidade de sequências de nucleotídeos comparadas com sequências dos isolados de begomovírus disponíveis no banco de dados GenBank.

Palavras-chave: Geminiviridae. Amplificação por Círculo Rolante. DNA-A de begomovírus.

ABSTRACT

The *Begomovirus* genus belongs to Geminiviridae family of viruses that infect plants and is transmitted by whitefly (*Bemisia tabaci*) vector, which is also considered one of the major pests of agriculture. The present study investigated the diversity of begomoviruses in the whitefly vector (*B. tabaci*) in areas of Paraíba, Minas Gerais and the Federal District. A total of 17 samples of whiteflies were collected from 12 plant species in areas of Paraíba, Minas Gerais and the Federal District and used for the detection of begomovirus DNA-A by PCR, RCA and RCA-PCR with specific primers. Viral amplicons were cloned and the recombinant clones were selected on selective medium containing X-Gal and IPTG. The presence of amplicons was confirmed by restriction enzyme patterns generated by EcoR I and Msp I on plasmid DNAs of selected clones isolated and then sequenced. The begomovirus DNA-A sequences isolated from whiteflies collected from cotton plants EMEPA-PB, in Emilia, black prick, beard-of-hawk, jatropha, eggplant and malvona present in the Federal District, were analyzed by nucleotide sequence identity percentage and phylogenetic groups compared to other begomovirus strain sequences available in GenBank database. As a result, five species of begomovirus (SiYBV, CoMoV, SiMMV, BGMV e SiGLSV) revealed the diversity of begomovirus present in whiteflies in the studied areas, but that is not necessarily present in the respective plants where the flies were collected. The PAL1v 1978 PAR1c 496 primers described for begomovirus DNA-A detection from plants were also efficient for detection of this specific viral genomic component from whitefly vector. The specific detection of begomovirus DNA-A component by PCR from total DNA extracted from whiteflies was enriched by amplification by RCA. The BGMV begomovirus was found predominantly in whiteflies on plants collected in the Federal District. The diversity present in strains of the five viruses identified in this work was grouped into four phylogenetic branches supported by the nucleotide sequence identity percentage compared to sequences of the begomovirus strains available in GenBank database.

Keywords: Geminiviridae. Rolling Circle Amplification. begomovirus DNA-A.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Espécies vegetais onde foram coletadas amostras de moscas brancas. **A.** caruru (*Amaranthus spinosus*). **B.** sida (*Sida rhombifolia*). **C.** soja (*Glycine max*). **D.** Emília (*Emilia sonchifolia*). **E.** picão preto (*Bidens pilosa*). **F.** barba-de-falcão (*Crepis japonica*). **G.** jatropa (*Jatropha padagrica*). **H.** berinjela (*Solanum melongena*). **I.** leiteiro (*Euphobia heterophyla*). **J.** malvona (*Sidastrum sp.*). **L.** algodão (*Gossypium hirsutum*)..... 35
- FIGURA 2.** Imagem ilustrativa do aspirador bucal utilizado para coleta de mosca branca..... 37
- FIGURA 3.** Coleta de moscas brancas em plantação de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) infestada por *B. tabaci* no Campo Experimental da EMEPA, localizada no Sítio Imbaúba, município de Lagoa Seca PB (A). Detalhe da coleta de moscas brancas em folha de algodoeiro cultivado em casa de vegetação da EMBRAPA Algodão, no município de Campina Grande PB (B)..... 38
- FIGURA 4.** Ilustração do vetor TOPO TA 2.1 (Life Technologies), indicando o local da ligação dos produtos de PCR e a posição dos sitio de *EcoRI*..... 41

FIGURA 5. Produtos da amplificação por PCR (A), RCA (B) e PCR-RCA (C) de DNA-A de begomovírus a partir de DNA total isolado de moscas brancas coletadas em 11 espécies vegetais. As amostras em cada poço estão identificadas pela numeração entre parênteses, conforme a Tabela 1. **1.** algodão (1). **2.** Soja (2). **3.** algodão (3). **4.** algodão (4). **5.** caruru (5). **6.** sida (6). **7.** soja (8). **8.** Emília (10). **9.** picão preto (9). **10.** Emília (11). **11.** barba-de-falcão (12). **12.** jatropa 1 (14). **13.** jatropa 2 (15). **14.** berinjela (16). **15.** malvona (17). **16.** Leiteiro (13). **17.** feijão (7). **C+**, amostra sabidamente infectada por begomovírus. **M**, Marcador de massa molecular 1 Kb Ladder plus (Invitrogen). 47

FIGURA 6. Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos da amplificação por PCR a partir de DNA de begomovírus amplificados por círculo rolante para eluição de amplicons de interesse. As amostras estão identificadas entre parênteses conforme a Tabela 1. **M**, Marcador de massa molecular 1 kb Ladder Plus (Invitrogen). **1.** algodão (3). **2.** Emília (11). **3.** picão preto (9). **4.** barba-de-falcão (12). **5.** jatropa 1 (14). **6.** jatropa 2 (15). **7.** berinjela (16). **8.** malvona (17) 50

FIGURA 7. Amostragem representativa de fragmentos de restrição gerados pela enzima *EcoR* I em DNAs plasmidiais isolados de colônias selecionadas nas clonagens de insertos de 1,2 Kb de begomovírus amplificados a partir de DNAs isolados de moscas brancas coletadas em algodão (3), barba-de-falcão (12) e jatropa 1 (14). As amostras estão identificadas entre parênteses conforme a Tabela 1. **M**, Marcador de massa molecular 1 Kb Ladder plus (Invitrogen) 51

FIGURA 8. Amostragem representativa de fragmentos de restrição gerados pela enzima *Msp*I em DNAs plasmidiais isolados de colônias selecionadas no sistema azul/branco e na canamicina de clonagens de insertos de 1,2 Kb de begomovírus amplificados a partir de DNAs isolados de moscas

brancas coletadas em algodão (3), picão preto (9), barba-de-falcão (12), jatrofa1 (14) e Emília (11). As amostras estão identificadas entre parêntesis conforme a Tabela 1. **M**, Marcador de massa molecular 1 Kb Ladder plus (Invitrogen) 52

FIGURA 9. Ramo da árvore filogenética onde a sequência MB1GH15 detectada neste estudo foi agrupada por análise de máxima verossimilhança quando comparada com outras sequencias do GenBank. Os ramos com suporte (aLRT) <80% foram colapsados..... 59

FIGURA 10. Ramo da árvore filogenética onde as sequências MB1GH1, MB1GH2, MB1GH3, MB1GH8 e MB1GH13, geradas no trabalho, foram agrupadas por análise de máxima verossimilhança quando comparada com outras sequencias do GenBank. Ramo da árvore filogenética onde. Os ramos com suporte (aLRT) <80% foram colapsados..... 61

FIGURA 11. Ramo da árvore filogenética onde s sequências MB1EM1 e MB1JP1; MB1JP2; MB1JP4; MB1JP5; MB1JP6; MB1JP7, geradas no trabalho, foi agrupada por análise de máxima verossimilhança quando comparada com outras sequencias do GenBank. Os ramos com suporte (aLRT) <80% foram colapsados..... 63

FIGURA 12. Ramo da árvore filogenética onde as sequências MB1SR1; MB1SR2; MB1BP1; MB1BP2; MB1BP3; MB1BP4; MB1SM2; MB1SM7; MB1CJ2; MB1CJ7; MB1CJ8; MB2JP1; MB2JP6 e MB2JP7, geradas no trabalho, foram agrupadas. Os ramos com suporte (aLRT) <80% foram colapsados..... 64

FIGURA 13. Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos da amplificação por PCR de componente DNA-A de begomovírus completo, a partir de moscas brancas coletadas em picão preto (9), barba-de-falcão (12),

jatrofa 2 (15) e berinjela (16), usando a enzima Taq DNA polimerase Long Amp (NEB) e as combinações de primers MB1BP_2 Sal I (A) e MB1BP_2 Sac I (B), específicos para BGMV 65

FIGURA 14. Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos da amplificação por PCR de DNA-A completo de begomovírus a partir de moscas brancas coletadas em picão preto na área do Distrito Federal, utilizando a enzima DNA Polimerase Phusion High fidelity (New England BioLabs) e os pares de primers MB1BP_2 Sal I (A) e MB1BP_2 Sac I (B), específicos para BGMV. 11. DNA de picão preto concentrado. 12. DNA de picão preto diluído 66

FIGURA 15. Eletroforese em gel de agarose 1% de fragmentos de restrição gerados pela enzima *EcoR* I em DNAs plasmidiais de amostragem representativa de clones (1-3) das clonagens de segmentos do componente DNA-A de begomovírus amplificados de moscas brancas coletadas em picão preto (9), barba-de-falcão (12), jatrofa 2 (15) e berinjela (16), usando a combinação de primers MB1BP_2 Sal I 67

FIGURA 16. Eletroforese em gel de agarose 1% de fragmentos de restrição gerados pela enzima *Msp* I em DNAs plasmidiais de clones (1-3) das clonagens de segmentos do componente DNA-A de begomovírus amplificados de moscas brancas coletadas em picão preto (9), barba-de-falcão (12), jatrofa 2 (15) e berinjela (16), usando a combinação de primers MB1BP_2 Sal I 68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Amostras e localidades de espécimes de moscas brancas adultas coletadas em áreas da Paraíba, em Minas Gerais e Distrito Federal	34
TABELA 2.	Condições térmicas utilizadas para amplificar DNA de begomovírus presente em amostras de mosca branca	39
TABELA 3.	Sequência dos primers desenhados para a amplificação do DNA-A completo dos begomovírus a partir de amostras de moscas brancas	46
TABELA 4.	Identidade via BLASTn de sequências de nucleotídeos isoladas a partir de moscas brancas com begomovírus. SiYBV (Sida yellow blotch virus); CoMoV (Corchorus mottle virus); SiMMV (Sida micrantha mosaic virus); BGMV (Bean golden mosaic virus); SiGLSV (Sidastrum golden leaf spot virus). *Na sigla dos clones, por exemplo, MB1GH1, estão indicadas as abreviaturas de mosca branca (MB), identificação da amostra coletada (1), o nome científico da planta hospedeira (GH- <i>G. hirsutum</i>) e número do clone (1)	54

LISTA DE SIGLAS

BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CENARGEN	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
CES	Centro de Educação e Saúde
CNPA	EMBRAPA Algodão
CTAB	<i>Cetyl trimethyl ammonium bromide</i>
DF	Distrito Federal
DNA	<i>Desoxirribonuclei acid</i>
dNTPs	Desoxinucleósido trifosfato
<i>EcoR I</i>	<i>Escherichia coli</i> raça 1
EDTA	Ácido Etileno DiaminoTetracético
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa em Agropecuária
EMEPA	Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária
Gene cp	<i>Coat protein</i>
Gene <i>LacZ</i>	Betagalactosidase
Gene <i>mp</i>	<i>Movement protein</i>
GH	<i>Gossypium hirsutum</i>
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IPTG	Isopropiltio galactosídeo
LB	Luria Broth
LBiotec	Laboratório de Biotecnologia
LIR	<i>Large Intergenic Region</i>
LPP III	Laboratório de Interação Planta-Praga III
MB	Mosca branca
MB1BP1	Mosca branca, <i>Bidens pilosa</i> Clone 1
MB1BP2	Mosca branca, <i>Bidens pilosa</i> Clone 2
MB1BP3	Mosca branca, <i>Bidens pilosa</i> Clone 3
MB1BP4	Mosca branca, <i>Bidens pilosa</i> Clone 4
MB1CJ2	Mosca branca, <i>Crepis japônica</i> Clone 2
MB1CJ7	Mosca branca, <i>Crepis japônica</i> Clone 7
MB1CJ8	Mosca branca, <i>Crepis japônica</i> Clone 8
MB1EM1	Mosca branca, Emília/ Clone 1
MB1GH1	Mosca branca, <i>Gossypium hirsutum</i> / Clone 1
MB1GH13	Mosca branca, <i>Gossypium hirsutum</i> / Clone 13
MB1GH2	Mosca branca, <i>Gossypium hirsutum</i> / Clone 2
MB1GH3	Mosca branca, <i>Gossypium hirsutum</i> / Clone 3
MB1GH8	Mosca branca, <i>Gossypium hirsutum</i> / Clone 8
MB1JP1	Mosca branca, <i>Jatropha podagrica</i> 1/ Clone 1
MB1JP2	Mosca branca, <i>Jatropha podagrica</i> 1/ Clone 2
MB1JP4	Mosca branca, <i>Jatropha podagrica</i> 1/ Clone 4
MB1JP5	Mosca branca, <i>Jatropha podagrica</i> 1/ Clone 5
MB1JP6	Mosca branca, <i>Jatropha podagrica</i> 1/ Clone 6
MB1JP7	Mosca branca, <i>Jatropha podagrica</i> 1/ Clone 7
MB1SM2	Mosca branca, <i>Solanum melongena</i> 1/ Clone 2
MB1SM7	Mosca branca, <i>Solanum melongena</i> 1/ Clone 7
MB1SR2	Mosca branca, <i>Sida rhombifolia</i> 1/ Clone 2

MB2JP1	Mosca branca, <i>Jatropha podagrica</i> 2 Clone 1
MB2JP6	Mosca branca, <i>Jatropha podagrica</i> 2 Clone 6
MB2JP7	Mosca branca, <i>Jatropha podagrica</i> 1 Clone 7
MEAM1	<i>Middle East-Asia Minor 1</i>
MED	<i>Mediterranean</i>
MP	<i>Moviment Protein</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NS	<i>Nucleo Shuttle</i>
NW	<i>New World</i>
NW2	<i>New World 2</i>
PB	Paraíba
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	potencial Hidrogeniônico
RCA	<i>Rolling Circle Amplification</i>
SDS	Sulfato de sódio dodecyl
SIR	<i>Smal Intergenic Region</i>
siRNA	RNAs de interferência
ssDNA	<i>Single strand DNA</i>
TAE	Tris-acetato-EDTA
TE	Tris-EDTA
UFMG	Universidade Federal de Campina Grande
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-BD-galactopiranosídeo

LISTA DE VÍRUS

AbMBV	Abutilon mosaic Brazil virus
ABMV	Abutilon mosaic virus
BCTIV	Beet curly top Iran virus
BGMV	Bean golden mosaic virus
BGYMV	Bean golden yellow mosaic virus
BTV	Beet curly top virus
CCSV	Cotton chlorotic spot virus
CoMoV	Corchorus mottle virus
ECSV	Eragrostis Curvula streak virus
MaYSV	Macroptilium yellow spot virus
MSV	Maize streak virus
SiGLSV	Sidastrum golden leaf spot virus
SiMMV	Micrantha mosaic virus
SiMoAV	Mottle Alagoas virus
SiYBV	Yellow blotch virus
TCTV	Turnip curly top virus
ToCV	Tomato chlorosis virus
TPCTV	Tomato pseudo-curly top virus
VLP	Virus Like Particle
WDV	Wheat warf virus

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2 Objetivos Específicos	22
3 REFERENCIAL TEÓRICO	23
3.1 Família Geminiviridae	23
3.2 Caracterização e organização genômica dos begomovírus.....	25
3.3 Begomovírus no Brasil	27
3.4 Mosca branca	27
3.4.1 <i>Bemisia tabaci</i> : Uma das principais pragas da agricultura.....	29
3.4.2 Aspectos morfológicos e biológicos do complexo <i>Bemisia tabaci</i> Biótipo B (Hemiptera, Aleyrodidae)	30
3.5 Estudo da diversidade viral.....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Caracterização do local de coleta de moscas brancas	33
4.2 Coleta de moscas brancas	36
4.3 Extração de DNA total de <i>B. tabaci</i>	38
4.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	39
4.5 Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	39
4.6 Amplificação por Círculo Rolante (RCA).....	40
4.7 PCR dos produtos da RCA	40
4.8 Eluição e purificação de amplicons de interesse	40
4.9 Clonagem molecular de amplicons virais de interesse	41
4.9.1 Clonagem em uma etapa usando TOPO TA	41
4.9.2 Transformação de células de <i>Escherichia coli</i> XL-1 Blue por eletroporação	42

4.10 Seleção de clones recombinantes de interesse	42
4.10.1 Extração de DNA plasmidial	42
4.10.2 Confirmação da clonagem por padrão de restrição de endonucleases	43
4.11 Sequenciamento de fragmentos de PCR de origem viral	43
4.12 Análises de bioinformática das sequencias virais	44
4.12.1 Análise Filogenética.....	44
4.13 Amplificação de componente DNA-A viral completo de BGMV	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1 Isolamento de fragmentos genômicos de begomovírus a partir de moscas brancas.....	46
5.2 Diversidade de begomovírus presente em moscas brancas de áreas da Paraíba e do Distrito Federal	53
5.3 Filogenia de begomovírus da Paraíba e do Distrito Federal	58
5.4 Isolamento do componente DNA-A de begomovirus de áreas do Distrito Federal	65
6 CONCLUSÕES.....	70
7 PERSPECTIVAS.....	70
8 REFERENCIAS.....	71

1. INTRODUÇÃO

Os vírus são caracterizados por serem estruturalmente simples não apresentando uma organização complexa das células, sendo considerados parasitas intracelulares obrigatórios dependentes de um organismo vivo para replicação (KORSMAN, STEPHEN et al., 2014). Atualmente, inúmeras espécies de vírus são conhecidas por ocasionarem sérios danos em diversas culturas de grande importância econômica.

Dentre os vírus que causam doenças em plantas encontram-se os begomovírus, pertencentes à família Geminiviridae, que se caracterizam por apresentar capsídeos geminados e genoma composto por DNA de fita simples circular (BROWN et al., 2012). A família é subdividida em sete gêneros, denominados de *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus*, os quais se diferenciam quanto ao genoma estrutural, o tipo de vetor e a quantidade de hospedeiros (VARSANI et al., 2014). O gênero *Begomovirus*, cuja infecção apresenta sintomas como nanismo, mosaico amarelo, clorose generalizada, mosqueado, rugosidade e enrolamento das folhas, é transmitido pelo vetor mosca branca (*Bemisia tabaci*) (BALDIN; VENDRAMM; LOURENÇÃO, 2005; MICHEREFF-FILHO et al., 2012).

A mosca branca é considerada uma das maiores pragas da agricultura, podendo causar injúrias diretas nas plantas parasitadas, pela sucção da seiva e liberação de toxinas, e indiretas, atuando como vetores virais (BALDIN; VENDRAMM; LOURENÇÃO, 2005). Dessa forma, a mosca branca pode enfraquecer a planta, transmitir uma diversidade de vírus e acarretar danos ao comércio agrícola. Além de begomovírus, a mosca branca pode transmitir também Carlavírus, Closterovírus, Ipomovírus e Torradovírus em várias culturas diferentes (NAVAS-CASTILLO et al., 2011, PERRING, 2001). No Brasil, o biótipo B de mosca-branca é o causador das maiores perdas na agricultura, somente na cultura do tomateiro, este biótipo é vetor de pelo menos 17 espécies de begomovirus três dessas consideradas predominantes *Tomato severe rugose vírus* (ToSRV), *Tomato golden vein vírus* (TGVV) e *Tomato mottle leaf curl vírus* (TMoLCV) (FERNANDES et al. 2008).

A diversidade de vírus de plantas tem sido tradicionalmente estudada a partir de amostras de suas plantas hospedeiras economicamente importantes, sintomáticas e individuais. No caso do gênero *Begomovirus*, a diversidade genética foi observada em

cultivos de tomate, soja e algodão das regiões do nordeste, sudeste e centro-oeste do Brasil (RIBEIRO et al., 2003), e a relação genética observada entre as espécies virais e as plantas daninhas indica que os vírus tenham sido originários de plantas nativas e que estão sendo transferidos para o tomateiro pela mosca branca, biótipo B (AMBROZEVICIUS et al., 2002).

Uma vez que alguns vírus de plantas são transmitidos por insetos, uma estratégia alternativa e relevante que surgiu nos últimos anos é isolar vírus a partir de seus insetos vetores (NG et al, 2011). Por essa estratégia, a diversidade de vírus é explorada a partir de amostras de insetos coletados sobre uma espécie vegetal sintomática ou não, mas que permite determinar a presença de vírus adquiridos através da alimentação de diversas plantas cultivadas e nativas de uma determinada área. A caracterização dos vírus é feita com base na análise de suas sequências genômicas virais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Descrever a diversidade de begomovírus presente em moscas brancas (*Bemisia tabaci*) coletadas em plantas infestadas em áreas agrícolas da Paraíba, Distrito Federal e Minas Gerais.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar fragmentos genômicos do componente DNA-A de begomovírus presentes em moscas brancas coletadas, por meio de amplificação por PCR enriquecida por amplificação por círculo rolante;
- Clonar os amplicons virais em vetor de clonagem molecular;
- Sequenciar amplicons clonados;
- Analisar sequências virais quanto a identidade e filogenia;
- Identificar a diversidade de begomovírus presente nas amostras de mosca branca em seu local de coleta, baseado na sequência oriunda do componente genômico DNA-A.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Família Geminiviridae

Geminiviridae representa uma família de vírus de plantas que infectam diversas culturas de grande importância econômica no mundo, distribuídas principalmente em regiões tropicais e subtropicais (BROWN et al., 2015). Essa família é caracterizada pelo aspecto geminado da partícula viral, contendo o genoma composto por DNA fita simples (ssDNA) circular, com ~2,7 nucleotídeos, encapsidado por uma única proteína estrutural que se arranja na forma de 22 capsômeros, formando dois icosaedros incompletos com cerca de 18×30 nm (ZHANG et al., 2001; BROWN et al., 2012).

A família Geminiviridae é dividida em sete gêneros, diferenciando em relação a estrutura do genoma, o tipo de inseto vetor, e hospedeiros (*Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus*) (<http://www.ictvonline.org>). Os gêneros *Becurtovirus*, *Eragrovirus* e *Turncutovirus* foram descobertos recentemente.

Gênero *Becurtovirus*: é representado por duas espécies: *Beet curly top Iran virus* (BCTIV) e *Spinach curly top Arizona virus*. Os membros pertencentes a estas espécies diferenciam-se de quase todos os geminivírus por apresentarem sequências monocleotídicas da origem de replicação "TAAGATTCC", ao invés do "TAATATTAC" presente na maioria dos geminivírus. Os isolados destas espécies apresentam genomas que possuem identidade compartilhada entre 77 e 78% (VARSANI et al., 2014).

Gênero *Begomovirus*: A espécie tipo desse gênero é o *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV). Os critérios adotados para a demarcação de espécie nesse gênero são: o número de componentes genômicas, organização genômica; propriedades biológicas do vírus, trans-replicação de componentes genômicos, capacidade de gerar pseudorecombinantes viáveis, características da proteína do capsídeo, gama de hospedeiras e fenótipo dos sintomas identidade nucleotídica. A demarcação de identidade dos begomovírus sugerida no 9º relatório do ICTV era <89% porém, recentemente novas recomendações para o gênero begomovírus foram propostas um limiar de demarcação de 91% e 94% para atribuir espécies e subespécies, respectivamente.

Esses vírus podem ter genoma monopartido ou bipartido, e seu inseto vetor é *B. tabaci*, popularmente conhecido como mosca branca (BROWN et al., 2015; VARSANI et al., 2014)

Gênero *Curtovirus*: a espécie desse gênero é representada por *Beet curly top virus* (BTV). O que diferencia em relação ao gênero Mastrevirus é a diferença no valor de identidade utilizado para a demarcação de nova espécie que para os Curtovirus, o valor é <89%. Os Curtovirus são monopartidos, também são transmitidos por cigarrinhas, porém infectam dicotiledôneas (FAUQUET et al., 2003; STANLEY et al., 2005, VARSANI et al., 2014).

Gênero *Eragrovirus*: é representado apenas por uma espécie *Eragrostis Curvula streak virus* (ECSV). Os isolados dessa espécie têm uma sequência nucleotídica incomum "TAAGATTCC ". Com base na variação de picos entre os pares de bases foi proposto um estipe limiar de demarcação de 94% (VARSANI et al., 2014).

Gênero *Mastrevirus*: a espécie é representada por *Maize streak virus* (MSV) e *Wheat warf virus* (WDV). Os critérios de demarcação de espécie nesse gênero consistem da identidade da sequência nucleotídica com valor <75% como o limiar para o estabelecimento de uma nova espécie. Nesse gênero, o vírus apresenta um genoma monopartido, no qual, contém uma grande (LIR, de *Large Intergenic Region*) e uma pequena região intergênica (SIR, de *Smal Intergenic Region*), que se localizam em lados contrários na molécula de DNA viral circular. Esse gênero é transmitido pelo inseto vetor conhecido como cigarrinha para plantas monocotiledôneas em sua maioria. Características que definem espécies pertencentes a esse gênero, pode-se destacar características da proteína capsial; espécie do vetor; gama de hospedeiras, fenótipo dos sintomas (FAUQUET et al., 2003; STANLEY et al., 2005, VARSANI et al., 2014).

Gênero *Topocuvirus*: A espécie tipo é *Tomato pseudo-curly top vírus* (TPCTV). As condições são as mesmas observadas nos gêneros curtovírus e mastrevírus e, atualmente, esse gênero possui apenas uma espécie representada por um genoma monopartido. O inseto vetor desse gênero é um membracídeo (*Micrutali malleifera*), que transmite o vírus para plantas dicotiledôneas (FAUQUET et al., 2003; STANLEY et al., 2005, VARSANI et al., 2014).

Gênero *Turncurtovirus*: A única espécie caracterizada nesse gênero é *Turnip curly top virus* (TCTV). Até o momento 20 isolados são associados a esta espécie na qual foram recuperado de *Brassica rapa* ou *Raphanus sativus*. Todos os isolados apresenta a mesma sequencia nucleotídica 'TAATATTAC' e com base na variação de identidade dos pares, foi proposto uma demarcação provisória estirpe limiar de 95% (VARSANI et al., 2014).

Os geminivírus têm despertado grande interesse devido a sua patogenicidade e a severidade de doença que vem causando nas culturas nas últimas décadas (GIBBS; OHSHIMA, 2010; SCHOLTHOF, 2011). De acordo com Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV, <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>), hoje são reconhecidas 288 espécies de geminivírus dos quais 192 pertencem ao gênero *Begomovirus*. Isso mostra o valor que tem esse gênero dentro dessa família como também a importância de estudos aprofundados relacionados aos vírus desse gênero.

3.2 Caracterização e organização genômica dos begomovírus

Os Begomovírus nativos do Novo Mundo apresentam genomas que consistem em dois componentes de DNA fita simples (ssDNA), conhecidos como DNA A e DNA B, apresentando em cada componente apresenta 2,7 nucleotídeos . O DNA A codifica todos os fatores de vírus que são fundamentais para o controle da expressão gênica, replicação do genoma e transmissão do inseto entre hospedeiros. O DNA B codifica duas proteínas envolvidas no movimento intra e intercelular em tecidos da planta hospedeira (ROJAS et al., 2005).

O DNA-A contem dois genes que são transcritos no sentido viral (genes *cp* e *mp*). O gene *cp* (contém uma ORF AV1) que é de grande importância para a formação da capa protéica viral, pode está envolvida no movimento do vírus e sua transmissão através do vetor, também está relacionada com a proteção do DNA viral no momento da transmissão pelo inseto vetor ou transmissão mecânica e com a especificidade do inseto vetor (UNSELD; FRISCHMUTH; JESKE, 2004). Do mesmo modo, o gene *mp* (contém ORF AV2) pode está ligada ao movimento do vírus (FAUQUET et al., 2005).

No sentido complementar do genoma são transcritos os genes *rep*, *trap* e *ren*. No gene *rep*, apresenta a ORF AC1 e é responsável pela produção da proteína Rep. na qual inicia o processo de replicação após ligar-se ao sítio de iniciação da replicação viral e cortar a fita de DNA. A ORF AC4 também está inserida nesse gene, na qual codifica a proteína C4. Essa proteína é de grande importância na identificação de sintomas no hospedeiro e pode controlar a expressão da proteína Rep. O gene *trap*, contém a ORF AC2 e codifica a proteína Trap, transativadora da transcrição, e age *intrans* nos promotores dos genes de sentido viral (*cp* do DNA A e *ns* do DNA B). O gene *ren*, contém a ORF AC3 e codifica a proteína REn, que é um fator de amplificação do vírus (FAUQUET et al., 2005).

No componente DNA B encontram-se os genes *mpcom* ORF BC1 (sentido complementar) e *ns*, com a ORF BV1 (sentido viral), esses genes tem a função de codificar as proteínas MP (*Movement Protein*), nas quais são responsáveis pelo movimento célula-a-célula do vírus por meio do aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas (interligações entre membranas de células vizinhas que criam pontes citoplasmáticas), e NS (*Nucleo Shuttle*), que transporta o DNA através do envelope nuclear (FAUQUET et al, 2005).

O processo de replicação inicia-se quando ocorre o desencapsulamento através da introdução do vírus no hospedeiro pelo vetor. As proteínas do hospedeiro por sua vez convertem a fita simples em fita dupla, que será amplificada e vai servir como um molde para transcrição e síntese de DNA de fita simples (STANLEY, 1995). A origem da replicação está inserida na região intergênica que é comum nos dois componentes genômicos.

São essenciais para replicação, 30 elementos de nucleotídeo, nos quais contém uma sequência repetida e invertida composta, predominantemente, por guanina e citosina, formando uma estrutura conservada em forma de grampo (*stem and loop*), com uma sequência constante (5'TAATATTAC3'). Essa sequência é encontrada em todos os Geminivírus e se constitui em um domínio funcional da origem de replicação. Nesse local ocorre a clivagem que dará início ao processo de replicação por círculo rolante. A clivagem é realizada por uma proteína conhecida como Rep que irá funcionar como uma endonuclease sítio-específica (LAZAROWITZ; SHEPHERD, 1992).

3.3 Begomovírus no Brasil

O primeiro relato de begomovirose em cultivo comercial no Brasil foi no ano de 1965 em feijão. Esse vírus foi dado o nome de *Bean golden mosaic virus* (BGMV) (COSTA, 1965) e é o causador do mosaico dourado do feijoeiro, uma das principais doenças virais de culturas de grande importância como o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) na América Latina (GÁLVEZ; MORALES, 1989). Plantas infectadas com BGMV podem apresentar grandes perdas na produção, sendo que a maior parte ocorrendo nos períodos mais quentes do ano, justamente quando a população do vetor mosca branca aumenta de modo significativo, conseqüentemente, aumentando a transmissão do vírus (MORALES; ANDERSON, 2001). Porém, foi nos anos 90 que problemas econômicos relacionados ao Begomovírus começaram a surgir. O que pode ter ocasionado esse avanço do vírus na cultura agrícola foi o surgimento de um novo biótipo (biótipo B) da mosca branca que de forma circulativa transmite o vírus para plantas dicotiledôneas (JONES, 2003; NAVAS-CASLILLO et al., 2011).

De acordo com Freitas-Astua et al. (2002) e Lapidot e Friedmann (2002), o controle de doenças induzidas por begomovírus é difícil e com poucas alternativas. Em alguns lugares usam-se práticas como, por exemplo, o uso de inseticidas, mas muitas vezes essas práticas não são eficientes para combater o vírus. Por isso, o desenvolvimento de métodos eficazes é extremamente importante para eliminar as pragas. Um dos métodos para o controle da doença begomovírus é o uso de gestão integrada com cultivares resistentes, combinadas com o uso racional de agrotóxicos e práticas culturais visando a diminuição da carga de inóculo de vírus.

3.4 Mosca branca

A mosca branca, da classe Hemiptera, ordem *Aleyrodidae*, apresenta cinco gêneros principais: *Bemisia*, *Aleurothrixus*, *Dialeurodes*, *Trialeurodes* e *Aleurodicus*. É uma praga polífaga e composta por aproximadamente 35 espécies morfologicamente idênticas, (De BARRO et al., 2011; LIU; WALLING; WANG, 2012; FIRDAUS et al., 2013) e é

considerada uma das principais pragas da agricultura mundial, tanto pela sua agressividade como pela diversidade de hospedeiros que apresenta (DE SOUSA et al., 2014).

A mosca branca apresenta um elevado potencial biótico, uma diversidade de plantas hospedeiras, ampla distribuição geográfica e uma facilidade de aquisição para resistência a pesticidas, fatores estes que torna esta espécie numa praga para muitas culturas por todo o mundo. Entre as culturas que mais sofrem perdas estão as do tomate, pimentão, berinjela, batata-doce, pepino, feijão, bem como outras cucurbitáceas, solanáceas e leguminosas, além das ornamentais (DINSDALE et al., 2010; FIRDAUS et al., 2013).

Esses insetos pragas podem sobreviver em mais de 700 espécies de plantas de 86 famílias e provoca graves danos para as culturas. Os adultos e ninfas alimentam-se da seiva do floema de diversas espécies de plantas. E os danos causados incluem enfraquecimento da planta, indução a desordens fisiológicas, excreção de substâncias açucaradas que caem sobre as folhas e frutos que servem como substrato para o crescimento de fungos e que induz a incapacidade da planta respirar e produzir a fotossíntese, e a transmissão de vírus (LOURENÇÃO, 2002). Ataques periódicos produzem diversos sintomas e os mais comuns são a desidratação com murchamento nas horas mais quentes do dia, redução no crescimento e no desenvolvimento, diminuem o processo de produção e alteram a qualidade e tamanho dos frutos e flores (FARIA et al., 2000; NAGATA et al., 2009)

O controle sobre essa praga muitas vezes se torna difícil, pois como as moscas são muito semelhantes entre si, a identificação correta muitas vezes se torna complicada, fazendo com que esses insetos recebam tratamentos de controle não eficazes para o tipo de praga. Desse modo existe um grande número de métodos alternativos na qual diminui os danos causados por essas pragas promovendo a redução da população (MOREIRA et al., 2006; AGROFIT, 2011).

O ciclo de vida da mosca branca está ligado diretamente com a alimentação a temperatura do ambiente e espécies de hospedeiros, sendo que em baixas temperaturas seu ciclo de vida diminui (VILLAS BOAS, 2005). Atualmente, a mosca branca já pode ser encontrada em quase todos os estados brasileiros, causando perdas que variam de 30 a 100%, principalmente em culturas de frutas e de hortaliças. A maioria das moscas brancas tem preferências por plantas hospedeiras lenhosas, entretanto, espécie do gênero *Bemisia* se

alimenta de grande parte de plantas herbáceas, mais de 500 plantas e 80 famílias botânicas (OLIVEIRA et al., 2005).

Na tentativa de controlar a infestação dessa praga, tem-se adotado várias medidas, como a utilização de inseticidas sintéticos, métodos de controle cultural, biológico e a resistência de plantas, isoladamente ou em conjunto, no manejo integrado (SUJII et al., 2002; AZEVEDO et al., 2005; BALDIN; VENDRAMM; LOURENÇÃO, 2005; MOURA, 2013).

3.4.1 *Bemisia tabaci*: Uma das principais pragas da agricultura

No Brasil, o gênero *Bemisia* é conhecido desde 1923 (BONDAR, 1928). No ano de 1990, a espécie *B. tabaci* ressurgiu nas regiões Sudeste (São Paulo e Minas Gerais), Centro-Oeste (Goiás e Distrito Federal) e Nordeste (Bahia, Rio Grande do Norte, Ceará, Pernambuco, Piauí e Paraíba), trazendo grandes prejuízos a diversas culturas de importância agrícola (HAJI; FERREIRA; MOREIRA, 2004).

A infestação dessa praga iniciou provavelmente devido a importação por comerciantes da planta poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) com ninfas de *Bemisia tabaci* Biotipo B, incorporando esse novo biótipo no país. Estudos demonstraram que a *B. tabaci* não é composta de biótipos e sim constituída por um complexo de diferentes espécies (DINSDALE et al., 2010; DE BARRO et al., 2011). Esta nova classificação mostra a importância de estudos entre cruzamentos de indivíduos classificados como biótipos diferentes mostraram um isolamento reprodutivo completo ou incompleto de acasalamento de diferentes populações (XU et al., 2010; ELBAZ et al., 2010; WANG et al., 2010; SUN et al., 2011).

Quatro espécies diferentes que estão dentro complexo *B. tabaci* já foram identificadas até hoje em áreas brasileiras, são eles: *Middle East-Asia Minor*1 (MEAM1), *Mediterranean* (MED), *New World* (NW) e *New World* 2 (NW2) (MARUBAYASHI et al., 2013; BARBOSA et al., 2014).

A correta identificação de biótipos de *B. tabaci* é de suma importância para seu manejo adequado, uma vez que dentre os vários biótipos já caracterizados, há aqueles que têm maior importância agrícola, como o B e o Q (SIMÓN et al., 2007), e que podem

apresentar diferenças na resistência aos inseticidas normalmente usados para seu controle (HOROWITZ et al, 2003).

A *B. tabaci* biótipo B é uma praga que preocupa produtores, pesquisadores e assistência técnica, devido a sua rápida dispersão em regiões do Centro-Oeste brasileiro (HIROSE et al., 2010), com grande importância econômica para diversas culturas como do algodão, soja, melão, melancia, abóboras, feijão, batata, hortaliças, ornamentais e, principalmente, tomate. Existem regiões em que surtos populacionais têm ocorrido em soja, videira e maracujá, nesta última com transmissão de vírus (YUKI et al., 2002).

A espécie *B. tabaci* é considerada vetor de mais de 200 fitovíruses (JONES, 2003; NAVAS-CASTILLO et al., 2011). A maioria desses vírus é emergente no mundo e esses vírus pertencem aos gêneros *Begomovirus* (Família Geminiviridae), *Crinivirus* (Família Closteroviridae), *Ipomovirus* (Família Potyviridae) e *Carlavirus* (Família Betaflexiviridae) (NAVAS-CASTILLO et al., 2011; POLSTON; DE BARRO; BOYKIN, 2014). Esses gêneros apresentam uma diversidade de vírus.

Problemas fitoviológicos relacionados à *B. tabaci* têm apresentado destaque ao nível mundial e na economia agrícola, esse fato é devido o aumento constante da dispersão de vírus endêmicos de regiões tropicais e subtropicais, em áreas geográficas consideradas novas, além da emergência de vírus novos, ou que ainda não foram descritos (BROWN, 2007).

3.4.2 Aspectos morfológicos e biológicos do complexo *Bemisia tabaci* Biótipo B (Hemiptera, Aleyrodidae)

A-B. tabaci, apesar de ser hemimetabólica, apresenta o desenvolvimento semelhante ao dos insetos holometabólicos, sua metamorfose embora incompleta, apresenta as fases de ovo, ninfa (subdividida em ninfa I, ninfa II, ninfa III e ninfa IV, sendo esta última também chamada de pupa ou pseudopupa) e a fase adulta. A sua reprodução é sexuada, quando a prole é composta por machos e fêmeas ou por partenogênese haplóide realizada apenas com a presença dos machos facultativa e arrenótoca (VILLAS BÔAS et al., 1997; GALLO et al., 2002; WALKER et al., 2010).

Os insetos adultos apresentam dois pares de asas membranosas que se desenvolvem durante a metamorfose, revestidos por uma substância pulverulenta de cor branca e seu corpo é recoberto pela cera extracuticular de cor branco-amarelada (OLIVEIRA et al., 2001).

Os ovos liberados pela fêmea de *B. tabaci* têm o formato periforme (semelhante à pêra) (OLIVEIRA; SILVA, 1997) e ficam depositados na face abaxial das folhas, presos por um pedúnculo. Logo após o seu desenvolvimento, as formas de primeiro instar são ativados, enquanto os instares prematuros apresenta uma aparência com escamas, na qual consiste de uma secreção cêrea da mosca. Já o ultimo instar é geralmente chamado de pupa (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2011).

O macho apresenta tamanho inferior à fêmea, desse fato o seu ciclo de vida é mais curto (EICHELKRAUT; CARDONA, 1989). A época do ano pode ser um fator crucial para a longevidade de *B. tabaci*, pois no verão, o tempo aproximado de vida das fêmeas é de uma a três semanas, já os machos vivem menos de uma semana; enquanto que no inverno, os insetos vivem mais de dois meses (GERLING et al., 1986). O acasalamento desses insetos começa duas a quatro horas após a emergência e copulam várias vezes durante a sua vida. O período de pré-oviposição é variável com as diferentes épocas do ano, podendo durar de 8 horas a 5 dias. Estudos sobre sua biologia indicaram que a fêmea deposita de 100 a 300 ovos durante a sua vida, porém esse fator varia de acordo com a temperatura e a planta hospedeira (VILLAS BÔAS; BRANCO, 2009).

3.5 Estudo da diversidade viral

Na natureza, a replicação de moléculas de DNA circular como plasmídios ou vírus ocorre através de um mecanismo de círculo rolante. A técnica de amplificação por círculo rolante (RCA, de Rolling Circle Amplification) amplifica o DNA circular, gerando uma maior parte da população de DNA fita dupla com elevado peso molecular, alinhados em uma única molécula (CLAUSSON et al., 2015). Esta técnica é descrita com base na amplificação utilizando o kit comercial, Templi Phi (GE Healthcare) utilizando a enzima phi-29 DNA polimerase (INOUE-NAGATA et al., 2004).

Atualmente, o método mais preciso para identificação de espécies de begomovírus é a determinação da sequência completa de nucleotídeos do DNA-A. Inoue-Nagata et al. (2004) desenvolveram um método simples de clonagem de genomas completos de begomovírus utilizando RCA seguido por monomerização com enzima de restrição e ligação ao vetor. A partir desse método, procedimentos de clonagem e sequenciamento de um grande número de isolados em um período curto de tempo, e tem permitido estudos de variabilidade genética e epidemiologia (OWOR et al., 2007; CASTILLO-URQUIZA, 2008; VARSANI et al., 2009; HARKINS et al., 2009).

A abordagem metagenômica é uma ferramenta bastante importante utilizada na descoberta de novos vírus em amostras ambientais e biológicas é a, que através de suas características possibilita a detecção dos genomas virais presentes em uma amostra, independente de conhecimento prévio do genoma viral diferentemente de técnicas de biologia molecular como PCR, microarray e hibridização in situ (AMBROSE, CLEWLEY, 2006; MOKILI, ROHWER, DUTILH, 2012; TANG, CHIU 2010).

A classificação da diversidade viral depende primeiramente do material do genoma e do ácido nucleico dos vírus. Com essa revelação a nomeação desses vírus é executada pelo Comitê Internacional na Taxonomia dos Vírus (ICTV). De acordo com Brown et al. (2015), identidades entre 91% e 94% são propostas como limite de demarcação para begomovírus pertencentes a diferentes espécies e estirpes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Interação Planta-Praga III (LPP III) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), em Brasília DF, em colaboração com o Laboratório de Biotecnologia (LBiotec) do CES/UFCG, em Cuité PB.

4.1 Caracterização do local de coleta de moscas brancas

No estado da Paraíba, amostras de mosca branca foram coletadas em folhas de algodoeiro no campo Experimental da EMEPA (Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária), localizado no Sítio Imbaúba, município de Lagoa Seca, PB e em folhas de algodoeiro cultivado em casa de vegetação da EMBRAPA Algodão (CNPA), localizada no município de Campina Grande, PB. As coletas foram realizadas no período de agosto a outubro de 2014. Em Minas Gerais as coletas foram realizadas em áreas agrícolas de Buritis.

No Distrito Federal, as coletas foram realizadas no período de março a abril de 2015. Moscas brancas foram coletadas em folhas de caruru, sida, feijão, soja, picão preto, Emília, barba-de-falcão e de leiteironas áreas do campo experimental e jardins da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), em folhas de jatropa, berinjela e malva em áreas de jardim caseiro e beira de estrada do Lago Norte, Brasília, DF. Amostras de moscas brancas foram também coletadas em plantação comercial de algodoeiro e soja em março/abril de 2014 em fazendas na região do município de Buritis, MG.

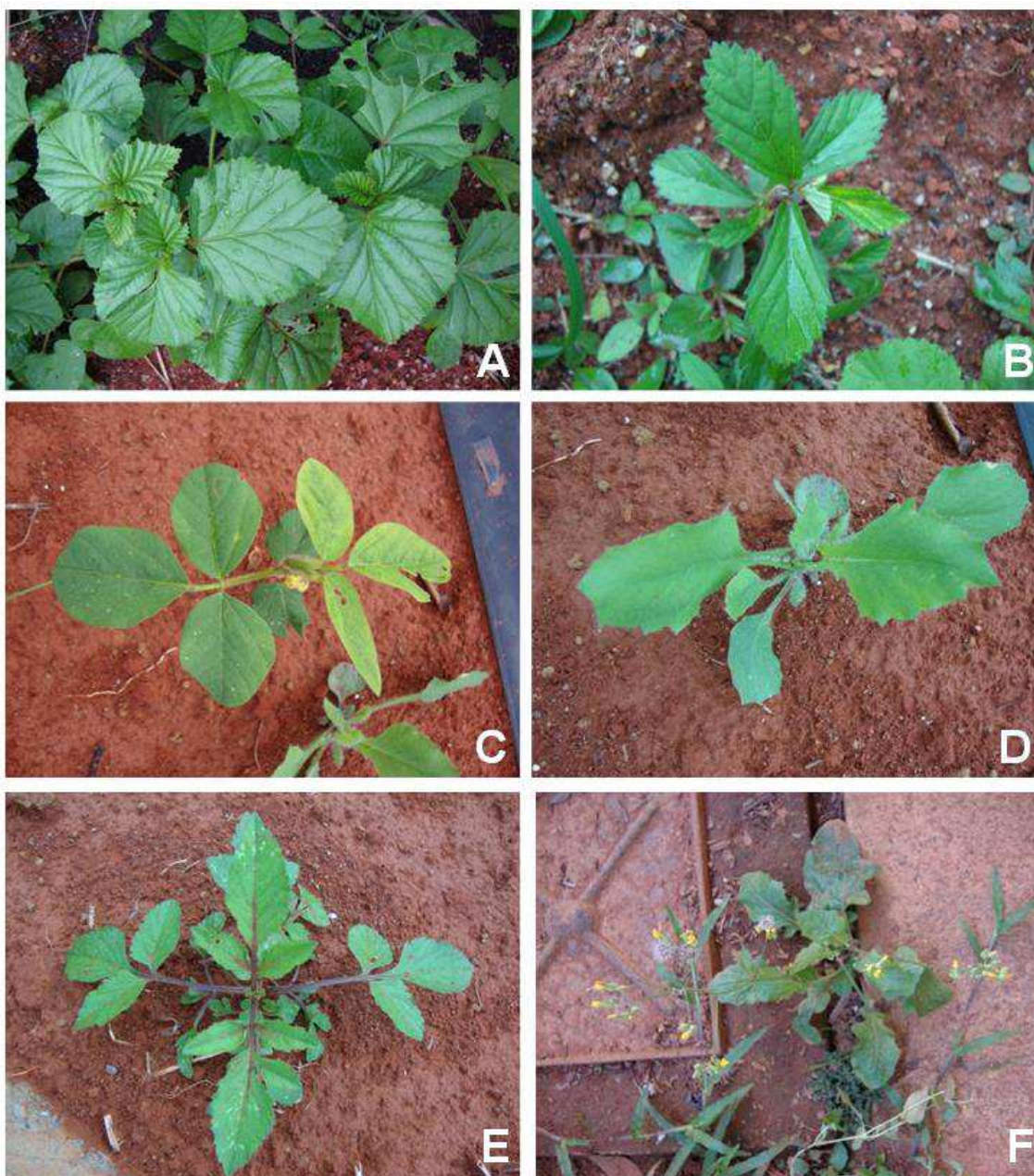
Um total de 17 amostras de moscas brancas foi coletado em 12 espécies vegetais diferentes. Amostras da maior parte das referidas espécies de plantas hospedeiras foram coletadas, fotografadas e, posteriormente, identificadas pelo nome popular e científico (Tabela 1), as quais estão ilustradas na Figura 1.

TABELA 1. Amostras e localidades de espécimes de moscas brancas adultas coletadas em áreas da Paraíba, Minas Gerais e Distrito Federal.

Identificação da amostra	Espécie vegetal onde foi coletada	Nome popular da espécie vegetal	Local da Coleta
1	<i>Gossypium hirsutum</i>	algodão	Buritis – MG
2	<i>Glycine max</i>	soja	Buritis – MG
3	<i>Gossypium hirsutum</i>	algodão	EMEPA – PB
4	<i>Gossypium hirsutum</i>	algodão	CNPA – PB
5	<i>Amaranthus spinosus</i>	caruru	CENARGEN – DF
6	<i>Sida rhombifolia</i>	sida	CENARGEN – DF
7	<i>Phaseolus vulgaris</i>	feijão	CENARGEN – DF
8	<i>Glycine max</i>	soja	CENARGEN – DF
9	<i>Bidens pilosa</i>	picão preto	CENARGEN – DF
10	<i>Emília sonchifolia</i>	Emília (Planta 1)	CENARGEN – DF
11	<i>Emília sonchifolia</i>	Emília (Planta 2)	CENARGEN – DF
12	<i>Crepis japonica</i>	barba-de-falcão	CENARGEN – DF
13	<i>Euphorbia heterophyla</i>	leiteiro	CENARGEN – DF
14	<i>Jatropha podagrica</i>	jatrofa (Planta 1)	Lago Norte – DF
15	<i>Jatropha podagrica</i>	jatrofa (Planta 2)	Lago Norte – DF
16	<i>Solanum melongena</i>	berinjela	Lago Norte – DF
17	<i>Sidastrum sp.</i>	malvona	Lago Norte – DF

Fonte: Dados da Pesquisa

FIGURA 1. Espécies vegetais onde foram coletadas amostras de moscas brancas. **A.** caruru (*Amaranthus spinosus*). **B.** sida (*Sida rhombifolia*). **C.** soja (*Glycine max*). **D.** Emília (*Emilia sonchifolia*). **E.** picão preto (*Bidens pilosa*). **F.** barba-de-falcão (*Crepis japonica*). **G.** jatrofa (*Jatropha padagrica*). **H.** berinjela (*Solanum melongena*). **I.** leiteiro (*Euphobia heterophyla*). **J.** malvona (*Sidastrum sp.*). **L.** algodão (*Gossypium hirsutum*).





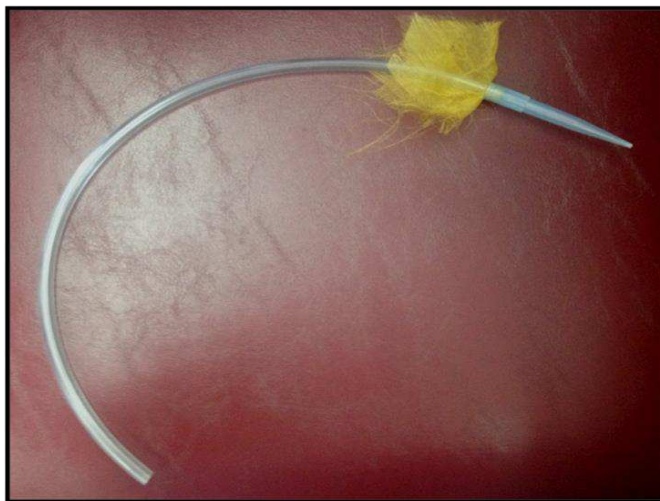
Fonte: Dados da pesquisa.

4.2 Coleta de moscas brancas

As moscas brancas foram coletadas com o auxílio de um aspirador bucal. O aspirador foi composto por uma mangueira de pequeno diâmetro, um tecido fino, e uma ponteira (Figura 2). As moscas coletadas no estado da Paraíba foram aspiradas e transferidas para microtubos de polipropileno de 1,5 mL, contendo etanol (75%), e em seguida encaminhadas ao Laboratório de Biotecnologia - CES, onde foram transferidas para

o freezer à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. As amostras coletadas em Brasília - DF foram transferidas diretamente para microtubos de polipropileno de 1,5 mL, sem a adição de etanol, e armazenadas em freezer à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tecido foliar das plantas hospedeiras das moscas brancas foi coletado, armazenado em sacos plásticos identificados e armazenado em freezer à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ no Laboratório de Interação Planta-Praga III – CENARGEN para futuras análises.

FIGURA 2. Imagem ilustrativa do aspirador bucal utilizado para coleta de mosca branca.



Fonte: Dados da pesquisa.

Na Figura 3 estão ilustradas as coletas de moscas brancas com o auxílio de aspirador bucal em algodoeiro infestado por *B. tabaci* no Campo Experimental da EMEPA, localizada no Sítio Imbaúba, município de Lagoa Seca PB (A), e em casa de vegetação da EMBRAPA Algodão, no município de Campina Grande PB (B).

FIGURA 3. Coleta de moscas brancas em plantação de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) infestada por *B. tabaci* no Campo Experimental da EMEPA, localizada no Sítio Imbaúba, município de Lagoa Seca PB (A). Detalhe da coleta de moscas brancas em folha de algodoeiro cultivado em casa de vegetação da EMBRAPA Algodão, no município de Campina Grande PB (B).



4.3 Extração de DNA total de *B. tabaci*

O DNA das moscas foi extraído de acordo com protocolo de Doyle e Doyle (1987) com algumas modificações. Cerca de 50 moscas foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 50 μ L de tampão CTAB 2% com β -mercaptoetanol 0,2%, pré-aquecido a 65°C, por aproximadamente 10 minutos. Em seguida, as amostras foram resfriadas durante 3 minutos e foi adicionado igual volume de clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico 24:1), seguido por agitação vigorosa e centrifugação a 13.200g por 5 minutos. Aproximadamente 25 μ L do sobrenadante foram recuperados e transferidos para um novo tubo, onde se adicionou igual volume de isopropanol (-20°C) e homogeneizou-se cuidadosamente o material por completo. As amostras foram armazenadas por 15 minutos a -80°C, em seguida centrifugadas a 13000g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 60 μ L de etanol 70%, centrifugados a 13000g, durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, o pellet de DNA foi seco por completo e

ressuspendido em 20 μL de TE (10 mM de Tris HCl 8.0; 1 mM de EDTA pH 7.5) contendo 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ribonuclease A, em seguida armazenado a -20°C .

4.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA total extraído das moscas brancas foi utilizado como molde em reações em cadeia da polimerase para a amplificação de fragmentos de DNA viral de tamanho esperado, utilizando primers universais para identificação de begomovírus bipartidos, (ROJAS et al., 1993). As reações foram realizadas em volume final de 50 μL nas seguintes concentrações finais 1X do Tampão da enzima, 1,5 mM de MgCl_2 , 0,2mM de dNTPs, 0,7 μL de cada primer PAL1v 1978 e PAR1c 496, 15 ng de cada amostra de DNA e 1,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen). As condições térmicas utilizadas para amplificar DNA viral presente em amostras de moscas estão descritas na Tabela 2. Em seguida, os amplicons obtidos foram visualizados em gel de agarose 1%, após eletroforese.

Tabela 2. Condições térmicas utilizadas para amplificar DNA de begomovírus presentes em amostras de mosca branca.

	Ciclos Térmicos	Temperatura	Tempo
	1 ciclo de Desnaturação Inicial	95 °C	5min00
35 ciclos	Desnaturação	95 °C	1min00
	Anelamento	55 °C	1min00
	Extensão	72 °C	1min30
	1 ciclo de Extensão Final	72 °C	7min00

Fonte: Dados da pesquisa.

4.5 Eletroforese de DNA em gel de agarose

A eletroforese foi realizada para identificar a qualidade e estimar a concentração dos DNAs extraídos, e para visualização dos fragmentos amplificados por PCR. No preparo do

gel, utilizou-se agarose em uma concentração 1% em tampão TAE 1X (Tris HCl 40 mM, Ácido acético glacial 20 mM e EDTA 1 mM) acrescido de brometo de etídeo (0,3 µg/mL). O DNA migrou em gel de agarose a uma voltagem de 80 V durante 1 hora. Em seguida, os ácidos nucleicos foram visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados.

4.6 Amplificação por Círculo Rolante (RCA)

Para amplificação do DNA circular de begomovírus foi utilizada a reação de amplificação por círculo rolante, por meio da Enzima ϕ 29 DNA polimerase que acontece a partir de uma pequena quantidade inicial de DNA. As amostras foram incubadas a 30 °C por 24 horas. As reações de RCA foram realizadas para as 17 amostras de DNA isolados de moscas brancas em volume final de 30 µL nas seguintes condições: 1X do Tampão da enzima, 0,2 mM da mistura de dNTPs, 5mM de primer RCA (hexâmeros randômicos tioprotetidos), volume fixo de 1µL de cada amostra de DNA e 3U da Enzima *phi-29* DNA polimerase (New England Biolabs). Em seguida, os produtos da RCA foram visualizados em gel de agarose 1%, após eletroforese.

4.7 PCR dos produtos da RCA

Após o enriquecimento da amostra de DNA viral por amplificação por círculo rolante, nova PCR foi realizada utilizando-se os primers PAL1v 1978 e PAR1c 496 (ROJAS et al., 1993), para a confirmação dos resultados obtidos na PCR do DNA total isolado das moscas brancas, evitando-se, assim, resultados falso-negativos.

4.8 Eluição e purificação de amplicons de interesse

Fragmentos amplificados na PCR dos produtos da RCA, com tamanhos de interesse de 1,2 Kb, foram selecionados e eluídos do gel de agarose. As bandas foram cortadas e, imediatamente, eluídas e purificadas utilizando o kit Illustra™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante. Para estimar a quantificação das amostras purificadas foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 1%

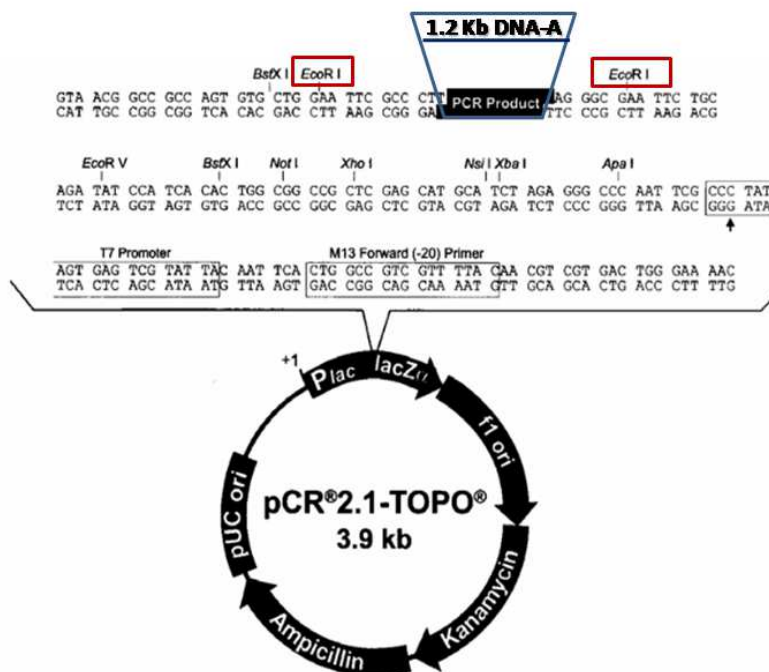
utilizando-se como padrão de comparação o marcador de massa para DNA Low DNA Mass Ladder (Invitrogen).

4.9 Clonagem molecular de amplicons virais de interesse

4.9.1 Clonagem em uma etapa usando TOPO TA

Após a eluição de bandas de interesse das amostras selecionadas, os fragmentos de DNA viral purificados foram clonados em uma etapa em vetor de clonagem TOPO TA 2.1 (Life Technologies), adequado para produtos de PCR, sem ligase (Figura 4). As reações de clonagem TOPO foram realizadas em volume final 12 μ L, contendo 0,5 μ L de solução de vetor, com 25 ng de vetor, 23 ng de inserto (1,2 Kb de comprimento) e 0,5 μ L de solução de sal (1.2 M de NaCl, 0.06 M de $MgCl_2$), incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos.

FIGURA 4. Ilustração do vetor TOPO TA 2.1(Life Technologies), indicando o local da ligação dos produtos de PCR e a posição dos sitio de *EcoR* I.



Fonte: Adaptado do manual do vetor TOPO TA 2.1(Life Technologies).

4.9.2 Transformação de células de *Escherichia coli* XL-1 Blue por eletroporação

Células competentes de *Escherichia colicepa* XL-1 Blue foram utilizadas para inserir os vetores TOPO TA 2.1 contendo os amplicons virais de interesse. A transformação foi feita por eletroporação, usando o eletroporador Gene Pulser™ (Bio-Rad). Durante a eletroporação ocorre um choque elétrico que desestabiliza as membranas das bactérias, permitindo a entrada do vetor com o inserto. Sob condição estéril, a um microtubo contendo 40 µL de células competentes XL-1 Blue, foram adicionados 1,5 µL de TOPO TA 2.1 contendo os amplicons virais. A mistura foi homogeneizada e transferida para cuvetas de eletroporação (BIO-RAD, 0,1 cm *electrode gap*) e realizaram-se o pulso elétrico nas seguintes condições: resistência 400 Ohms, capacitância 25 µFD e voltagem 1,8 kV. Em seguida, foram adicionados 600 µL de meio de cultura LB (Luria Broth) líquido às células. A mistura bacteriana foi transferida para tubo de propileno de 1,5 µL e incubada a 37°C por 1 hora. Após esse período, as células foram plaqueadas em placas de Petri contendo 56 µL de LB líquido, suplementado com 100 µg/µL de canamicina, 40 µL de X-Gal (20 mg/mL) e de 4 µL IPTG (0,8M), sendo incubadas em estufa a 37°C *overnight*. As colônias de interesse foram selecionadas no sistema azul e branco, subcultivadas em 4 mL de meio LB líquido, contendo 100 µg/µL de canamicina, à 37 °C, *overnight* em incubadora do tipo Shaker orbital, a 180 g.

4.10 Seleção de clones recombinantes de interesse

4.10.1 Extração de DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi extraído por lise alcalina de acordo com o seguinte procedimento: separou-se 1,5 mL de cada cultura em microtubos e centrifugou-se por 1 minuto à 12.000 g. Para concentrar as células bacterianas, essa etapa foi repetida por duas vezes. Em seguida, o *pellet* de bactérias foi resuspenso em 100 µL de solução 1 (25 mM de Tris pH 8,0, 10 mM de EDTA pH 8,0) e adicionou-se 200 µL de solução 2 (0,2 M de NaOH, 1% de SDS) invertendo gentilmente, durante 5 minutos. Nessa etapa, adicionou-se 150 µL da Solução III (60 µL de acetato de potássio 5 M, 11,5 µL de ácido acético glacial, 28,5 µL de H₂O).

Após homogeneização, as amostras foram incubadas no gelo por 5 minutos e centrifugadas a 12.000 g. por 5 minutos. Cerca de 420 μ L do sobrenadante foi recuperado e transferido para novos tubos devidamente identificados. As amostras foram precipitadas com 2 volumes de etanol absoluto (840 μ L), misturadas e centrifugadas por 15 minutos a 12.000 g. O DNA foi lavado com 1 mL de etanol 70% e centrifugado por 2 minutos a 12.000 g. Por fim, o DNA foi seco em capela por 10 minutos, ressuspendido em 40 μ L de T.E. (10 mM de Tris HCl pH 8.0; 1 mM de EDTA pH 7.5) contendo 10 μ g/ μ L de Ribonuclease A, em seguida armazenado a -20°C.

4.10.2 Confirmação da clonagem por padrão de restrição de endonucleases

Para visualizar os padrões de restrição gerados por endonucleases e selecionar os clones para sequenciamento foram realizadas digestões do DNA plasmidial com as enzimas *EcoR* I (enzima que libera o inserto do vetor TOPO) e *Msp* I (enzima de corte frequente), separadamente. As reações de digestão foram realizadas com um volume final de 20 μ L para ambas as enzimas, utilizando 500 ng de DNA plasmidial e 0,6 U para *EcoR* I e 10 U para a enzima *Msp*I. Em seguida, para visualização da digestão, as amostras foram analisadas em gel de agarose 1% como descrito no item 4.5. As amostras que apresentaram as bandas do vetor e do inserto (3,9 Kb e 1,2 Kb, respectivamente) após digestão com *EcoR* I foram consideradas positivas para clonagem e, dentre as positivas, aquelas que apresentaram perfis polimórficos diferentes após digestão com *Msp* I, foram selecionadas para sequenciamento.

4.11 Sequenciamento de fragmentos de PCR de origem viral

Os DNAs plasmidiais recombinantes contendo fragmentos de origem viral selecionados por padrões de restrição foram enviados para sequenciamento na empresa Macrogen, na Coréia do Sul. Os fragmentos de origem viral foram sequenciados em ambas as direções (forward e reverse) pelo método de Sanger, utilizando os primers universais T7 e M13R-pUC.

4.12 Análises de bioinformática das sequências virais

As sequências foram trimadas pela localização dos primers PAL1v 1978 e PAR1c 496 e, em seguida, foram gerados contigs contendo as sequências forward e reverse e sequência consenso para cada clone, usando o programa Geneious (KEARSE et al., 2012).

As sequências consensos de cada contig foram utilizadas em buscas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), utilizando-se os programas BLASTn. Os resultados obtidos na pesquisa BLAST foram analisados para a identificação de sequências de origem viral. As sequências utilizadas para as análises filogenéticas foram retiradas do banco de dados GenBank e editadas com auxílio do programa BioEdit (HALL, 1999), para que estivessem na mesma posição e tamanho que os clones obtidos neste trabalho (1,2 Kb). O programa Muscle 3.8.31 (EDGAR, 2004) foi utilizado para o alinhamento múltiplo das 27 sequências dos clones obtidos neste trabalho com 1812 sequências de begomovírus obtidas do GenBank. O alinhamento foi revisado manualmente utilizando o programa BioEdit (HALL, 1999).

4.12.1 Análise Filogenética

Uma árvore filogenética foi gerada pelo programa FastTree 2.1, utilizando o método de máxima verossimilhança com o modelo de evolução de nucleotídeos de Jukes-Cantor (GRT+CAT) (PRICE et al., 2010). Para confirmar a confiabilidade dos ramos, o programa calcula o valor de verossimilhança para suporte do ramo (aLRT) de acordo com o teste de Shimodaira, H. e Hasegawa, M (1999). Os ramos com suporte (aLRT) <80% foram colapsados. Devido ao grande número de dados da árvore filogenética, apenas os ramos onde agruparam as sequências dos clones deste trabalho foram destacados da árvore completa, analisados e apresentados separadamente.

4.13 Amplificação de componente DNA-A viral completo de BGMV

Como uma etapa adicional a este trabalho, o estudo de sequenciamento do DNA-A viral completo foi iniciado para BGMV. Após o resultado das análises das sequências das amostras de begomovírus identificados em moscas brancas, surgiu a necessidade da sua confirmação por clonagem do DNA-A. Para isso, primers sobrepostos (Tabela 3) foram desenhados para amplificação do componente DNA-A completo (2,6 Kb) por PCR invertido, de acordo com PATEL et al. (1993). Os primers foram desenhados para cada uma das cinco espécies de begomovírus identificadas, contendo um sítio de restrição apropriado, embora tenha sido amplificado apenas o componente A viral para BGMV.

PCR inverso foi realizado utilizando como molde os DNAs isolados de moscas brancas (item 4.3), usando a Taq DNA Polimerase Long Amp (NEB) e as combinações de primers F e R (Tabela 3). As condições das PCRs foram aquelas mesmas descritas no item 4.4 e Tabela 2.

TABELA 3. Sequenciados primers desenhados para a amplificação do DNA-A completo dos begomovírus a partir de amostras de moscas brancas.

CLONES	PRIMER	SEQUÊNCIA
MB1GH-1 SiYBV	MB1GH1- <i>EcoR</i> I	F 5' GTAGAATTCTCCCCATTCAATGG* 3'
		R 5' TCAGAATTCCAGGTCGACGGCAG 3'
MB1JP-1 SiMMV	MB1JP1- <i>EcoR</i> I	F 5' GATGAATTCCAAGTCGACGGAAG 3'
		R 5' TCAGAATTCTCCCCAATCGAGAG 3'
MB1SR-1 SiGLSV	MB1SR1- <i>BamH</i> I	F 5' ATTGGATCCCTCATGGCGCTCGA 3'
		R 5' TACGGATCCCGCTTCGGCATT 3'
MB1GH-15 CoMoV	MB1GH15- <i>Sac</i> I	F 5' CATGAGCTCTCAACTTCTGTGCT 3'
		R 5' ACTGAGCTCCTCCTGGAGTCCTA 3'
MB1BP-2 BGMV	MB1BP2- <i>Sal</i> I	F 5' CGCGTCGACTTGAAAATGACCCCAT 3'
		R 5' TAGGTCGACGGAAGATCTGCTAGAG 3'
MB1BP-2 BGMV	MB1BP2- <i>Sac</i> I	F 5' GACGAGCTCTCGTTCAAAGTCTCT 3'
		R 5' GACGAGCTCAATCGGGGTACACCCT 3'

*Os sítios de restrição incluídos nos primers estão sublinhados. **Fonte:** Dados da pesquisa.

Após a reação da PCR, os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese e bandas de 2,6 Kb, com tamanhos esperados para componente DNA-A completo de begomovírus BGMV foram eluídas do gel de agarose, usando o protocolo descrito no item 4.8. Os fragmentos eluídos foram clonados de acordo com o item 4.9, os clones recombinantes de interesse foram selecionados conforme o item 4.10 e DNAs plasmidiais de interesse foram isolados, selecionados e submetidos para sequenciamento de acordo com os itens 4.10.1, 4.10.2 e 4.11, respectivamente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A diversidade de begomovírus presente em áreas do estado de Paraíba e do Distrito Federal foi acessada a partir do vetor *Bemisia tabaci*, por amplificação parcial do DNA-A viral, sequenciamento e comparação com sequências de outros begomovírus já estudados.

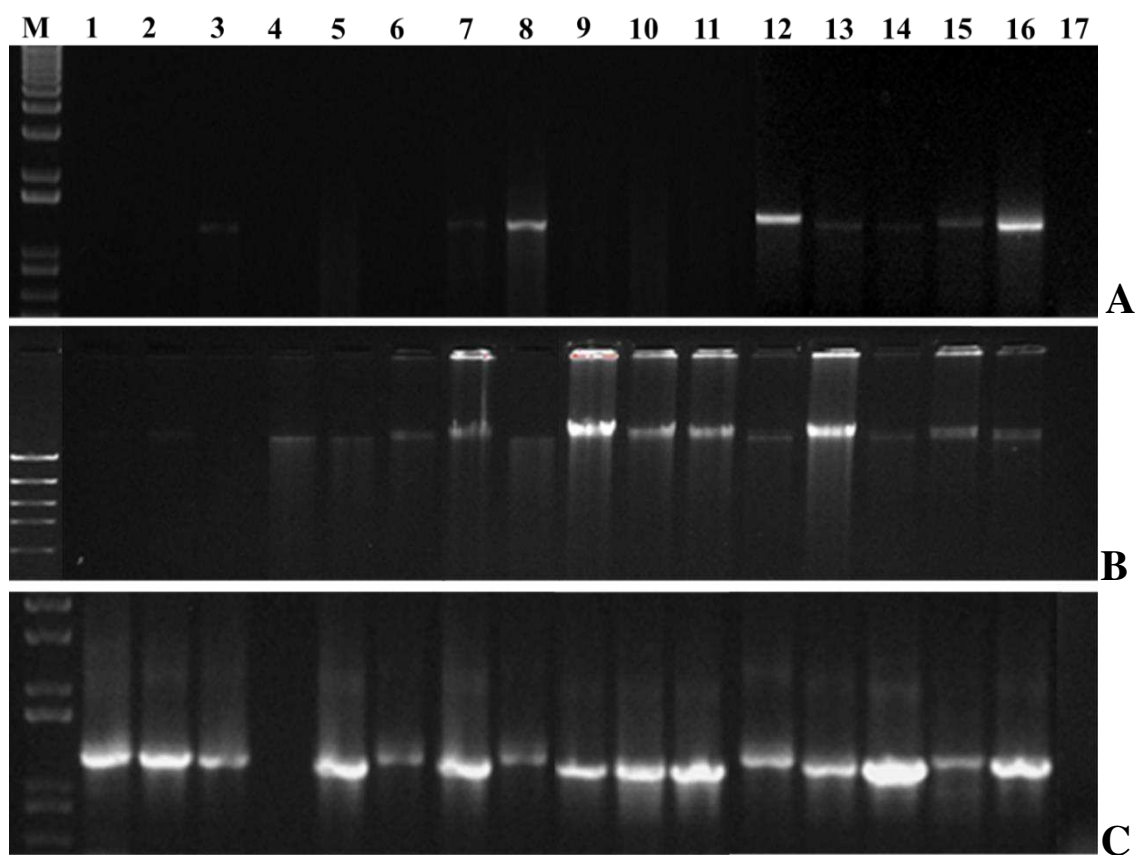
5.1 Isolamento de fragmentos genômicos de begomovírus a partir de moscas brancas

Do DNA total isolado de 17 amostras de *B. tabaci* coletadas em 12 espécies vegetais em áreas da Paraíba, Minas Gerais e Distrito Federal, em apenas 8 amostras foram amplificados por PCR fragmentos únicos de tamanho esperado (1,2 Kb), usando os primers específicos (PAL1v 1978 e PAR1c 496) para o genoma parcial do componente DNA-A de begomovírus bipartidos (Figura 5A). Das duas amostras de moscas brancas coletadas em plantas de algodoeiro em locais diferentes do estado da Paraíba, a presença de banda esperada para o DNA viral foi observada apenas na amostra da EMEPA-PB (poço 3). Isto pode ter ocorrido devido ao fato de que as moscas dessa amostra EMEPA-PB foram coletadas em campo aberto, com maior oportunidade de terem se alimentado também em outras espécies de plantas infectadas, que por ventura estivessem presentes no local.

Das 9 amostras de moscas brancas coletadas em plantas em locais diferentes da área do CENARGEN-DF, somente em 3 delas (soja e Emília 1 e leiteiro) foi obtida amplificação de fragmentos esperados para o DNA-A parcial de begomovírus. Já nas

4 amostras de moscas brancas coletadas no Lago Norte-DF, em todas foram observados amplicons únicos específicos. Por outro lado, nenhum fragmento foi amplificado a partir dos DNAs isolados de 2 amostras de moscas brancas coletadas em Buritis-MG (Figura 5A).

FIGURA 5. Produtos da amplificação por PCR (A), RCA (B) e PCR-RCA (C) de DNA-A de begomovírus a partir de DNA total isolado de moscas brancas coletadas em 11 espécies vegetais. As amostras em cada poço estão identificadas pela numeração entre parênteses, conforme a Tabela 1. **1.** algodão (1). **2.** Soja (2). **3.** algodão (3). **4.** algodão (4). **5.** caruru (5). **6.** sida (6). **7.** soja (8). **8.** Emília (10). **9.** picão preto (9). **10.** Emília (11). **11.** barba-de-falcão (12). **12.** jatrofa 1 (14). **13.** jatrofa 2 (15). **14.** berinjela (16). **15.** malvona (17). **16.** Leiteiro (13). **17.** feijão (7). C+, amostra sabidamente infectada por begomovírus. M, Marcador de massa molecular 1 Kb Ladder plus (Invitrogen).



Fonte: Dados da pesquisa.

Um dos fatores que pode ter influenciado a não amplificação do DNA-A de begomovírus a partir de DNA total extraído de moscas brancas é a concentração do DNA viral presente no DNA total. A concentração de DNA viral em DNA total extraído de moscas brancas vai depender do número de plantas infectadas em que elas se alimentaram, assim como da concentração de vírus nas plantas e tempo de alimentação. Ainda, recentemente foi demonstrado que a quantidade de vírus dentro de moscas brancas adultas aumenta significativamente como resultado da replicação viral dentro do vetor, embora ocorram alterações no sistema imune e respostas de defesa do inseto que podem culminar com a supressão da replicação viral (PAKKIANATHAN et al., 2015). Portanto, é possível que o DNA viral esteja presente em outras amostras de moscas brancas examinadas, mas que a concentração não tenha sido suficiente para sua detecção por PCR, sendo necessária a aplicação de técnicas mais específicas que aumentem a concentração do DNA viral.

Neste sentido, o enriquecimento do DNA viral foi obtido por RCA, a partir do DNA total extraído de moscas brancas coletadas em plantas das áreas de Buritis-MG (algodão e soja); da EMBRAPA Algodão-PB (algodão) e do CENARGEN-DF (caruru, sida, picão preto, Emília 2 e barba-de-falcão), levando à amplificação de fragmentos esperados para o DNA-A de begomovírus em 7 amostras anteriormente consideradas negativas por PCR (Figura 5B). Enriquecimento de DNA-A de begomovírus promovido por RCA foi observado ainda nas amostras 7, 13 e 15 (Figura 5B), em que a intensidade do fragmento esperado apresentou-se maior do que aquela obtida por PCR (Figura 5A), indicando que deve ter ocorrido um aumento na concentração do DNA viral.

No ano 2004, INOUE-NAGATA et al. descreveram a utilização de RCA para a amplificação do DNA genômico de geminivírus, como uma estratégia que permitiu o aumento do número de moléculas virais presentes em DNAs extraídos de amostras de plantas sintomáticas, facilitando o estudo desses vírus. O produto gerado pela RCA é uma série de concatâmeros das moléculas circulares virais que podem ser visualizados em gel de agarose como uma banda de alta massa molecular, como demonstrado na Figura 6. Entretanto, deve-se ressaltar que o produto desta reação de RCA é dependente da concentração inicial de moléculas virais na amostra.

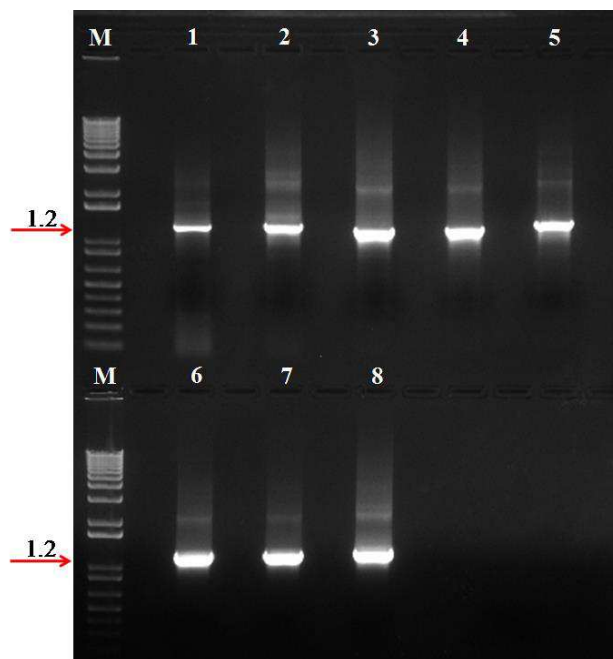
Visando um maior enriquecimento do DNA viral, alíquotas de RCA foram usadas como molde para amplificação de segmentos parciais de DNA-A de begomovírus por PCR

(PCR-RCA), os quais foram observados em 15 amostras como bandas únicas específicas, com alta intensidade quando visualizadas em gel de agarose (Figura 5C). Estas bandas foram obtidas a partir de 7 amostras consideradas positivas também para PCR e RCA (7, 8, 12, 13, 14, 15, e 16) e em outras 7 amostras consideradas enriquecidas pela RCA (1, 2, 4, 5, 9, 10 e 11), visto que não apresentaram produtos da PCR.

Das 15 amostras que se mostraram positivas para a amplificação parcial de DNA-A de begomovírus por PCR-RCA, 8 foram selecionadas para estudos posteriores de clonagem e identificação da espécie viral presente em cada amostra. O primeiro critério de seleção adotado foi estudar amostras de moscas brancas coletadas em espécies vegetais com poucos relatos associados à infecção por begomovírus. Como segundo critério considerou-se os resultados observados nos géis de agarose das reações de PCR, RCA e PCR da RCA (Figuras 5). Entre as amostras selecionadas que se mostraram positivas nas 3 reações incluiu-se a amostra oriunda de moscas brancas de algodão da EMEPA-PB que, apesar de não apresentar amplicons por meio da reação da RCA, ela foi positiva nas demais reações. Sua inclusão ocorreu por se tratar de uma amostra da região da Paraíba, cujo interesse de ser estudada se deve ao fato de ter sido coletada em plantas de uma cultura de grande importância para agricultores e comerciantes de toda região.

Em síntese, as amostras escolhidas foram isoladas de moscas brancas presentes em algodão EMEPA-PB; três amostras coletadas no CENARGEN (Emília 1, picão preto e barba-de-falcão); além de quatro amostras coletadas no Lago Norte (jatrofa 1, jatrofa 2, berinjela e malvona). Em seguida, como resultado de nova PCR da RCA para as 08 amostras selecionadas, bandas únicas de tamanho esperado de 1,2 Kb foram obtidas em grande intensidade (Figura 6), confirmando mais uma vez os dados anteriores.

FIGURA 6. Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos da amplificação por PCR a partir de DNA de begomovírus amplificados por círculo rolante para eluição de amplicons de interesse. As amostras estão identificadas entre parênteses conforme a Tabela 1. **M**, Marcador de massa molecular 1 kb Ladder Plus (Invitrogen). **1.** algodão (3). **2.** Emília (11). **3.** picão preto (9). **4.** barba-de-falcão (13). **5.** jatrofa 1 (14). **6.** jatrofa 2 (15). **7.** berinjela (16). **8.** malvona (17).



Fonte: Dados da pesquisa

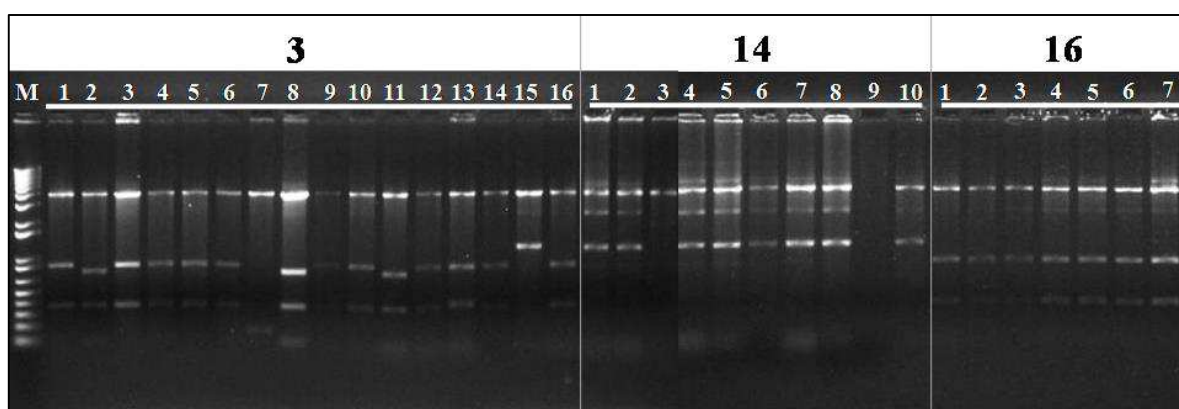
As 8 bandas eluídas do gel de agarose foram clonadas em vetor Topo TA 2.1 com sucesso. Nas placas foram observadas colônias azuis e brancas, das quais as colônias brancas foram selecionadas, pois indicam que o vetor está ligado ao inserto, interrompendo a expressão do gene *LacZ*. A presença da proteína expressa pelo gene *LacZ* é responsável pela cor azul das colônias na presença do substrato X-Gal, indicando que nestas o vetor não possui inserto.

Para as clonagens dos 8 fragmentos de 1,2 Kb de begomovírus indicados na Figura 8, a presença dos insertos foi confirmada por padrões de restrição gerados pelas enzimas *EcoR* I e *Msp* I em DNAs plasmidiais extraídos de colônias brancas selecionadas em meio líquido, contendo o antibiótico canamicina. Na Figura 7 estão representados os padrões de restrição obtidos para DNAs plasmidiais extraídos e digeridos com *EcoR* I para 16 clones

selecionados da clonagem dos fragmentos amplificados de DNAs de moscas brancas coletadas em Algodão EMEPA-PB, 10 clones da clonagem a partir de barba-de-falcão e 7 de jatropa 1.

A enzima *EcoR* I corta nas extremidades do inserto liberando os fragmentos de vetor e de insertos. Com exceção dos clones 7 (algodão), 3 e 9 de barba-de-falcão, todos os demais clones apresentaram inserto. Em algumas amostras observaram-se bandas com padrões diferentes daqueles esperados, porém em muitas amostras pode-se observar que a soma do tamanho dessas bandas apresenta o tamanho total esperado do inserto de 1,2 Kb, indicando a ocorrência de outro sítio de restrição da enzima dentro do inserto (Figura 7). Foram também analisados 4 clones da clonagem a partir de picão preto, 1 clone de Emília 1, 6 clones de jatropa 2, 7 clones de berinjela e 3 de malvona (dados não mostrados), totalizando 54 clones.

FIGURA 7. Amostragem representativa de fragmentos de restrição gerados pela enzima *EcoR* I em DNAs plasmidiais isolados de colônias selecionadas nas clonagens de insertos de 1,2 Kb de begomovírus amplificados a partir de DNAs isolados de moscas brancas coletadas em algodão (3), barba-de-falcão (12) e jatropa 1 (14). As amostras estão identificadas entre parênteses conforme a Tabela 1. **M**, Marcador de massa molecular 1 Kb Ladder plus (Invitrogen).

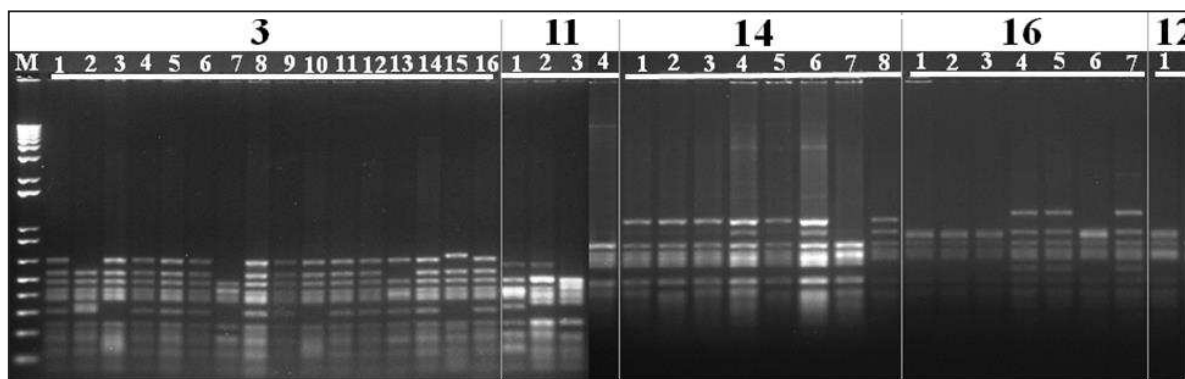


Fonte: Dados da pesquisa.

A análise do padrão de restrição gerada pela enzima *Msp*I em todos os clones recombinantes selecionados levou a observação de pelo menos 15 padrões de restrição

diferentes entre e dentro das amostras (Figura 8). Dos 16 DNAs plasmidiais da clonagem a partir de algodão EMEPA-PB foram observados 6 padrões de restrição diferentes. Da clonagem a partir de picão preto, os 4 DNAs plasmidiais digeridos apresentaram padrões diferentes. Nas 8 amostras de clones da clonagem a partir de barba-de-falcão foi possível observar 3 padrões de restrição diferentes e nas 7 amostras da clonagem a partir de jatropa 1 foram identificados apenas 2 padrões diferentes. Da clonagem a partir de Emília1 só foi possível a obtenção de 1 clone positivo, apresentando, portanto, apenas um padrão de restrição.

FIGURA 8. Amostragem representativa de fragmentos de restrição gerados pela enzima *Msp* I em DNAs plasmidiais isolados de colônias selecionadas no sistema azul/branco e na canamicina de clonagens de insertos de 1,2 Kb de begomovírus amplificados a partir de DNAs isolados de moscas brancas coletadas em algodão (3), picão preto (9), barba-de-falcão (12), jatropa1 (16) e Emília (11). As amostras estão identificadas entre parêntesis conforme a Tabela 1. **M**, Marcador de massa molecular 1 Kb Ladder plus (Invitrogen).



Fonte: Dados da pesquisa

Estes padrões diferentes podem indicar possivelmente a presença de begomovírus diferentes nas amostras ou podem ser devido ao posicionamento do inserto quando da entrada e incorporação no vetor Topo TA 2.1. Por isso, com base nestes resultados dos perfis de restrição gerados pelas duas enzimas citadas, DNAs plasmidiais de 27 amostras que apresentaram padrões de restrição diferentes foram selecionadas e sequenciadas em ambos os sentidos.

5.2 Diversidade de begomovírus presente em moscas brancas de áreas da Paraíba e do Distrito Federal

DNA-A sequenciado a partir de 27 clones obtidos de amostras de moscas brancas coletadas em 07 espécies vegetais na Paraíba e no Distrito Federal compartilharam entre 89% a 99% de identidade de sequências de nucleotídeos com vírus apenas do gênero *Begomovirus* (Tabela 4).

TABELA 4. Identidade via BLASTn de sequências de nucleotídeos isoladas a partir de moscas brancas com begomovírus. SiYBV (Sida yellow blotch virus); CoMoV (Corchorus mottle virus); SiMMV (Sida micranta mosaic virus); BGMV (Bean golden mosaic virus); SiGLSV (Sidastrum golden leaf spot virus). *Na sigla dos clones, por exemplo, MB1GH1, estão indicadas as abreviaturas de mosca branca (MB), identificação da amostra coletada (1), o nome científico da planta hospedeira (GH-*G. hirsutum*) e número do clone (1).

Amostras	Local de Coleta	*Clones	Vírus	Númerode Acesso	Identidade via BLASTn
Algodão (<i>Gossypium hirsutum</i>)	EMEPA-PB	MB1GH_1	SiYBV	JX871382.1	89%
	EMEPA-PB	MB1GH_2	SiYBV	JX871382.1	89%
	EMEPA-PB	MB1GH_3	SiYBV	JX871382.1	89%
	EMEPA-PB	MB1GH_8	SiYBV	JX871382.1	89%
	EMEPA-PB	MB1GH_13	SiYBV	JX871382.1	89%
	EMEPA-PB	MB1GH_15	CoMoV	JQ805781.1	93%
Emília (<i>Emilia sonchifolia</i>)	CENARGEN-DF	MB1EM_1	SiMMV	JX415194.1	98%
Picão preto (<i>Bidens pilosa</i>)	CENARGEN-DF	MB1BP_1	BGMV	KJ939817.1	99%
	CENARGEN-DF	MB1BP_2	BGMV	KJ939817.1	99%

	CENARGEN-DF	MB1BP_3	BGMV	KJ939817.1	99%
	CENARGEN-DF	MB1BP_4	BGMV	KJ939817.1	99%
Barba-de-falcão (<i>Crepis japonica</i>)	CENARGEN-DF	MB1CJ_2	BGMV	KJ939849.1	99%
	CENARGEN-DF	MB1CJ_7	BGMV	KJ939849.1	99%
	CENARGEN-DF	MB1CJ_8	BGMV	KJ939849.1	99%
Jatrofa 1 (<i>Jatropha padagrica</i>)	Lago Norte-DF	MB1JP_1	SiMMV	FJ686693.1	96%
	Lago Norte-DF	MB1JP_2	SiMMV	FJ686693.1	96%
	Lago Norte-DF	MB1JP_4	SiMMV	FJ686693.1	96%
	Lago Norte-DF	MB1JP_5	SiMMV	FJ686693.1	96%
	Lago Norte-DF	MB1JP_6	SiMMV	FJ686693.1	96%
	Lago Norte-DF	MB1JP_7	SiMMV	FJ686693.1	96%
Jatrofa 2 (<i>Jatropha padagrica</i>)	Lago Norte-DF	MB2JP_1	BGMV	KJ939849.1	99%
	Lago Norte-DF	MB2JP_6	BGMV	KJ939849.1	99%
	Lago Norte-DF	MB2JP_7	BGMV	KJ939849.1	90%
Berinjela (<i>Solanum melongena</i>)	Lago Norte-DF	MB1SM_2	BGMV	KJ939849.1	99%
	Lago Norte-DF	MB1SM_7	BGMV	KJ939849.1	99%
Malvona (<i>Sidastrum sp.</i>)	Lago Norte-DF	MB1SR_1	SiGLSV	HM357458.2	90%
	Lago Norte-DF	MB1SR_2	SiGLSV	HM357458.2	89%

Fonte: Dados da pesquisa.

A diversidade de begomovírus encontrada em *B. tabaci* coletada em folhas de 7 espécies vegetais nos locais estudados foi representada por 5 diferentes espécies: SiYBV, CoMoV, SiMMV, BGMV e SiGLSV, e não necessariamente reflete a diversidade de

begomovírus presente nas plantas de onde foram coletadas. Espécies de moscas brancas têm a capacidade de voar a curtas e longas distâncias, indo até 7 km distantes das plantas onde foram primeiramente encontradas. Podem também ser observadas desde 10 cm acima da superfície do solo até 300 m de altura (GALLO et al., 2012). Com bastante autonomia de vôo, moscas brancas podem visitar várias plantas e adquirir vírus em uma área relativamente grande. Dessa maneira, pode-se inferir que moscas brancas podem adquirir diferentes vírus de plantas infectadas próximas ou distantes da planta onde foram coletadas.

Interessantemente, dos 6 clones isolados de moscas brancas coletadas em folhas de algodoeiro EMEPA-PB, 5 deles continham sequências que compartilharam 89% de identidade com DNA-A de *Sida* yellow blotch virus (JX871382.1) e 1 compartilhou 93% com *Corchorus* mottle virus (JQ805781.1). SiYBV, ainda não descrito infectando algodoeiro, foi primeiramente isolado de plantas de *Sida urens* no estado de Alagoas (TAVARES et al., 2012) e mais recentemente de plantas de *Sida* sp. coletada na região do município de Ibimirim, Pernambuco (RIBEIRO et al., dados não publicados), sugerindo que esse vírus encontra-se amplamente disseminado, pelo menos em plantas daninhas, na área da região Nordeste que engloba os estados de Alagoas, Paraíba e Pernambuco. Da mesma forma, CoMoV foi descrito em *Cochorus hirtus* (L.), uma planta da mesma família do algodão (Malvaceae) na região do município de São Joaquim do Monte, em Pernambuco, nesta mesma região (BLAWID et al., 2013). Na nova revisão de nomenclatura proposta pelo ICTV <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>, o CoMoV (JQ805781) foi renomeado para Abutilon mosaic Brazil virus (AbMBV).

O begomovírus AbMBV foi identificado infectando a planta *Abutilon* sp. (Malvaceae) no estado da Bahia, apresentando componentes genômicos diferentes da espécie ABMV proveniente do oeste da Índia. O potencial de transmissão do vírus para a espécie *Malva parviflora* foi demonstrado artificialmente por inoculação via biobalística, o que levou a sinais característicos de clareamento de nervuras e mosaico (PAPROTKA; METZLER; JESKE, 2010). Portanto, a identificação desse vírus agora no estado da Paraíba revela sua disseminação na região Nordeste do Brasil e presenças de moscas brancas coletadas em plantas da família Malvaceae, neste trabalho.

Na cultura do algodoeiro, AbMBV foi descrito em algodoeiros de baixa frequência, no estado de São Paulo, sem expressão econômica (KITAJIMA, 2014), entretanto, trata-se

de descrições antigas, sem evidência molecular, baseadas principalmente em sintomas e transmissão. O primeiro begomovírus que foi isolado e sequenciado a partir desta cultura foi o Cotton chlorotic spot virus, isolado de plantas coletadas em Campina Grande, PB (ALMEIDA, 2013). Considerando os critérios da atual taxonomia de vírus, se faz necessário evidência molecular para confirmar a descrição e presença de AbMBV em algodoeiro. Neste sentido, embora a identificação de AbMBV em moscas brancas coletadas em folhas de algodoeiro na Paraíba indique apenas a presença desse vírus na área da coleta, se faz importante o estudo diagnóstico de AbMBV em folhas de algodoeiro do local da coleta estudado para verificar sua presença nesta cultura, e é assunto das próximas pesquisas.

Predominante foi a presença de isolados de Bean golden mosaic virus em DNAs clonados de moscas brancas coletadas em picão preto (4 clones), barba-de-falcão (3 clones), jatropa 2 (3 clones) e em berinjela (2 clones), sendo que todos compartilharam identidade de sequências com DNA-A de isolados de BGMV descritos infectando leguminosas no Brasil (SOBRINHO et al., 2014). As sequências de nucleotídeos dos 4 clones de picão preto compartilharam 99% de identidade com sequências de DNA-A do isolado BGMV (KJ939817.1), apenas 01 clone de jatropa 2 apresentou 90% de identidade com o isolado BGMV (KJ939849.1), enquanto que os 7 clones restantes apresentaram 99% de identidade com o isolado BGMV (KJ939849.1).

Para estudar a variabilidade entre os isolados de BGMV, uma matriz de identidade de sequências foi gerada, revelando que a identidade variou de 98,7 a 99,7% entre si (Dados não mostrados). Brown et al. (2015) propuseram um limiar de 91% e 94% de identidade para o componente A completo, para a demarcação de espécie e estirpe (*strain*) de begomovírus, respectivamente, baseado na identidade de pares verdadeiros de genomas calculada por alinhamentos com a exclusão de caracteres *gap*. Portanto, as sequências dos isolados de BGMV deste trabalho deverão ser analisadas por este critério para confirmar a hipótese de pertencerem à mesma estirpe. Apesar de ter sido identificado BGMV em moscas brancas coletadas em berinjela, não existem relatos da infecção de berinjela por este begomovírus. Portanto, é possível que estas moscas brancas tenham adquirido BGMV em outras plantas presentes na área do Lago Norte, DF.

Isolados de *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV) foram identificados nas amostras de DNAs clonados de moscas brancas coletadas nas plantas Emilia (1 clone) e jatropa 1 (6 clones), compartilhando 98% e 96% de identidade de sequencias com o isolado SiMMV(JX415194.1), descrito em plantas sintomáticas de tomate no Brasil Central (BARRETO et al., 2013), e com o isolado SiMMV (FJ686693.1), descrito em plantas de soja infectadas no município de Santo Antonio de Goiás, GO (FERNANDES et al., 2009), respectivamente. Curiosamente, begomovírus diferentes foram encontrados nas duas plantas de jatropa (1 e 2) coletadas no Lago Norte-DF, SiMMV e BGMV, respectivamente. O begomovírus SiMMV é aparentemente de rápida expansão e apresenta uma gama de hospedeiras, incluindo espécies de Malvaceae, Solanaceae e leguminosas (FERNANDES et al., 2009).

DNAs clonados (2 clones) de moscas brancas coletadas na planta malvona (*Sidastrum* sp.) compartilharam 89% e 90% de identidade de sequencias com o DNA-A do isolado *Sidastrum golden leaf spot virus* - SiGLSV (HM357458.2) identificado em plantas de *Sidastrum* sp. (FONSECA et al., 2011). Este vírus foi relatado no depósito da sequência do componente completo do DNA-A como um novo begomovírus infectando *Sidastrum* no Distrito Federal, Brasil, por submissão direta no banco de dados GenBank/NCBI sob número de acesso HM357458.2. Este vírus também consta na lista completa de isolados de begomovírus datada de 05 de março de 2015, que foi preparada por membros do Grupo de Estudos Geminiviridae e contém os nomes oficiais das espécies, nome do isolado e abreviação para todos os isolados de begomovírus cujas sequencias estão depositadas no GenBank, regularmente atualizada e disponibilizada pelo ICTV para pelo endereço www.talk.ictvonline.org/ictv_wikis/m/files_gemini/5120/download.aspx.

Portanto, é possível que moscas brancas coletadas na planta malvona, apresentando sintomas característicos de infecção por begomovírus (Figura 1M), tenham adquirido o vírus SiGLSV durante sua alimentação nas mesmas. Entretanto, esta hipótese precisa ser confirmada pela detecção e sequenciamento de segmentos do genoma de DNA-A desse vírus a partir do DNA total extraído das folhas coletadas na referida planta.

Os percentuais de 89% e 90% de identidade de sequencias com o DNA-A do isolado SiGLSV (HM357458.2), observados para os 2 clones deste trabalho por meio da análise usando o Programa BLASTn, precisam ser confirmados por análise de demarcação

de espécie e isolados usando sequencias completas do componente de DNA-A de begomovírus a partir do DNA total isolado das moscas brancas/malvona, para a classificação e taxonomia correta de begomovírus presente nestas amostras, de acordo com Brown et al. (2015).

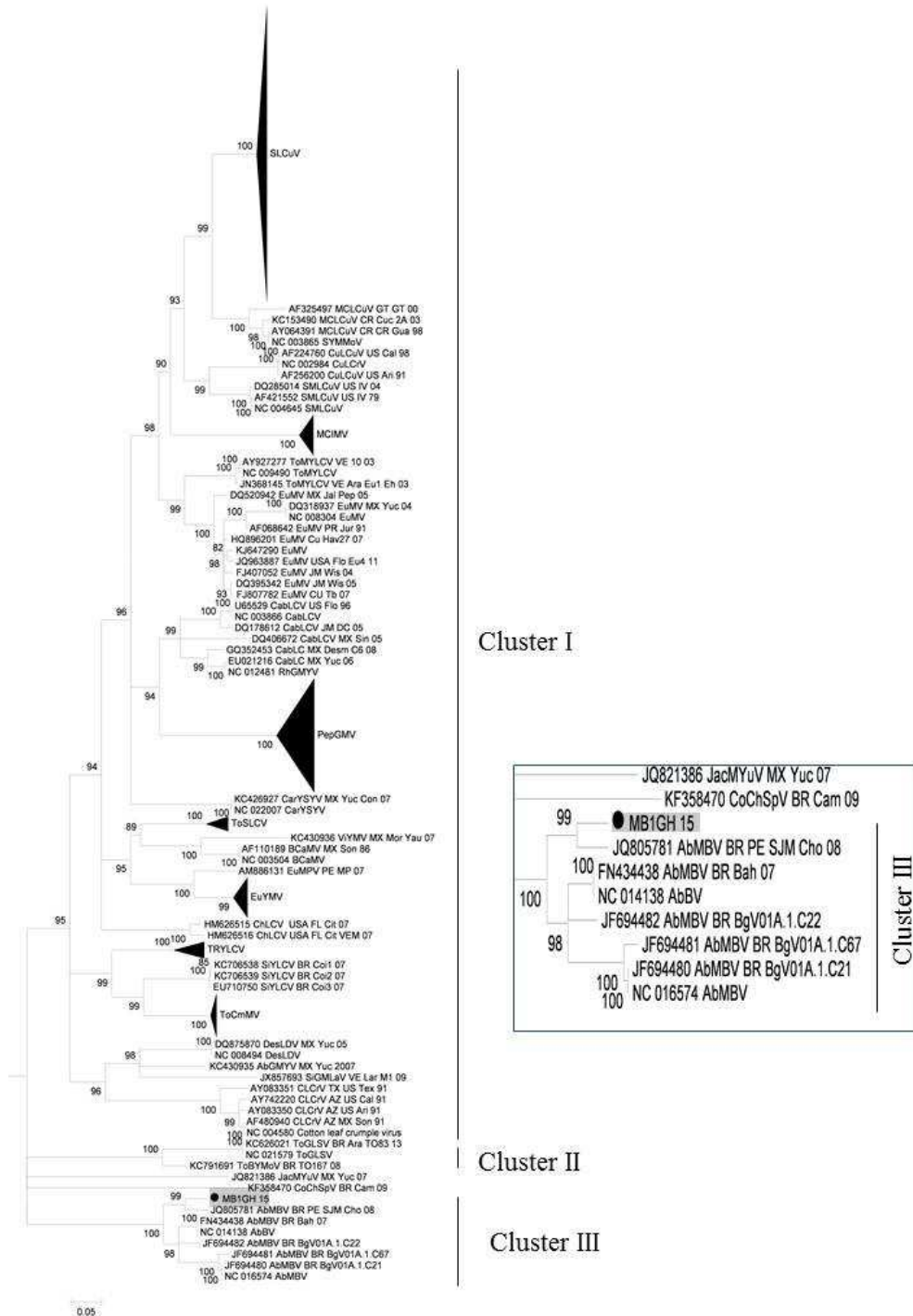
Em síntese, nenhum dos 5 begomovírus identificados em moscas brancas coletadas em áreas da Paraíba e do Distrito Federal foram descritos infectando as plantas de onde as moscas foram coletadas (SiYBV/algodão, SiMMV/jatrofa e Emília, e BGMV/ picão preto, barba de falcão, berinjela e jatrofa). Portanto, é possível que as moscas brancas coletadas tenham adquirido estes vírus em outras plantas presentes na área de coleta. Esta descoberta reflete a importância da estratégia utilizada neste trabalho para detectar a diversidade de begomovírus presente em uma determinada área, a partir do vetor mosca branca, considerando que os vírus identificados podem ser transmitidos para novas plantas hospedeiras em potencial.

5.3 Filogenia de begomovírus da Paraíba e do Distrito Federal

Suporte filogenético foi dado para todas as 27 sequencias novas isoladas neste trabalho, identificadas na Tabela 3, agrupando-as em 4 ramos que foram destacados de uma árvore filogenética maior, gerada após alinhamento com 1812 sequencias parciais de DNA-A de begomovírus disponíveis no banco de dados internacional GenBank (Figuras 9 a 12).

Na Figura 9 está representado o ramo da árvore que apresenta o clone MB1GH-15 isolado de moscas brancas coletadas em algodão, EMEPA-PB. Neste ramo, o clone MB1GH-15 foi agrupado no cluster III, intimamente relacionado com o CoMoV (sinônimo Abutilon mosaic Brazil virus – AbMBV, acesso JQ805781.1), o mesmo vírus que compartilhou 99% de identidade no resultado do BLASTn, juntamente com mais 6 sequencias de isolados de AbMBV. A variabilidade presente entre os isolados foi refletida pela diferença entre os comprimentos dos braços que abrigaram as sequencias, em relação aos nós internos de ancestralidade.

FIGURA 9. Ramo da árvore filogenética onde a sequência MB1GH15 detectada neste estudo foi agrupada por análise de máxima verossimilhança quando comparada com outras sequências do GenBank. Os ramos com suporte (aLRT) <80% foram colapsados.

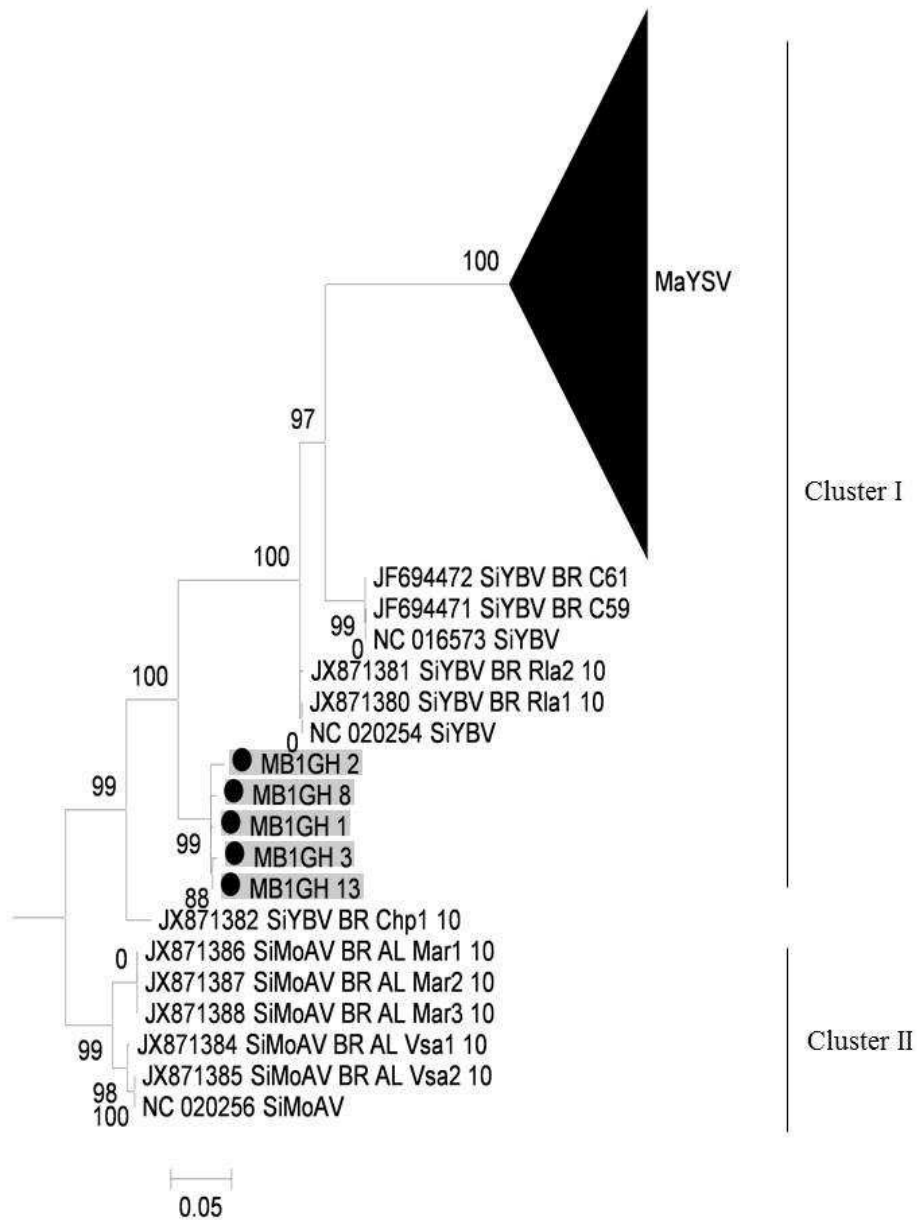


Fonte: Dados da pesquisa.

Na Figura 10 encontra-se o ramo da árvore filogenética para segmentos de DNA-A de begomovírus, apresentando 2 clusters bem definidos onde foram agrupadas as demais sequências isoladas de moscas brancas coletadas de folhas de algodoeiro EMEPA-PB (clones MB1GH2, MB1GH8, MB1GH1, MB1GH3, MB1GH13) comparadas por identidade com sequências de begomovírus do GenBank. As 5 sequências desse trabalho agruparam todas juntas no Cluster I, intimamente relacionadas as sequências de isolados de SiYBV, como esperado.

Compondo o Cluster 2 estão 6 sequências de isolados de SiMoAV (Sida mottle Alagoas virus) disponíveis no GenBank, indicando relações ancestrais entre estas 2 duas espécies de begomovírus. Isolados de SiMoAV também foram identificados nos estados de Bahia, Ceará, Pernambuco na Região Nordeste, além da região norte do estado de Minas Gerais infectando tomateiro por Souza e Nagata (2013), compondo a diversidade de begomovírus nesta região da Caatinga do Brasil.

FIGURA 10. Ramo da árvore filogenética onde as sequências MB1GH1, MB1GH2, MB1GH3, MB1GH8 e MB1GH13, geradas no trabalho, foram agrupadas por análise de máxima verossimilhança quando comparada com outras sequencias do GenBank. Ramo da árvore filogenética onde. Os ramos com suporte (aLRT) <80% foram colapsados.



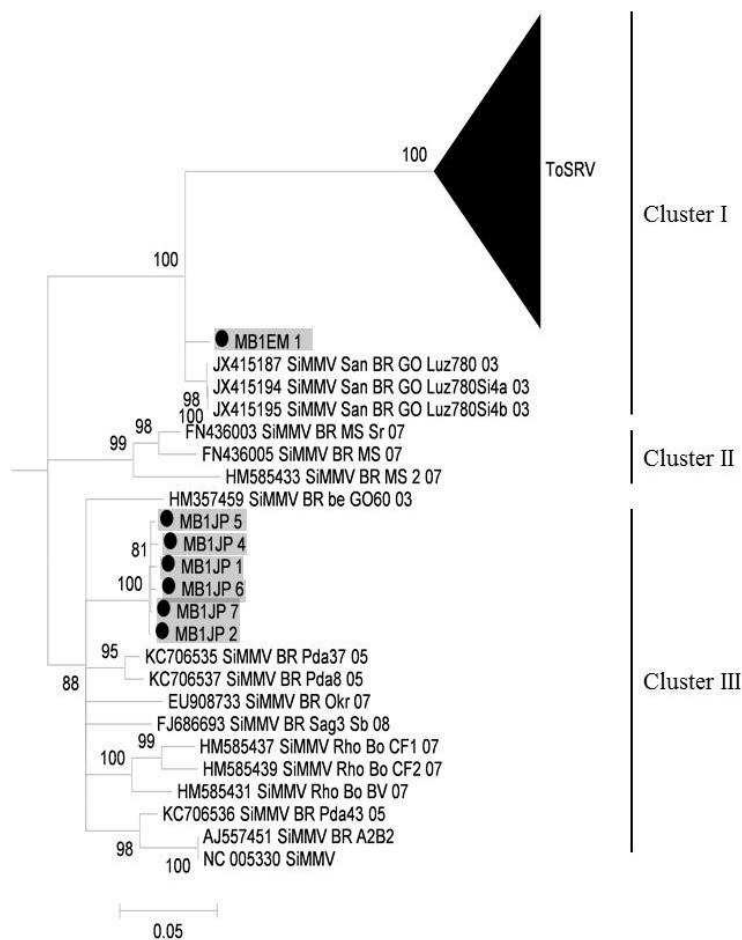
Fonte: Dados da pesquisa.

Na Figura 11 está representado o ramo da árvore filogenética contendo sequências de isolados de *Sida micrantha* mosaic virus (SiMMV) agrupadas em 3 clusters, suportados pela análise de máxima verossimilhança, onde as sequências de DNA-A de begomovírus isoladas de moscas brancas coletadas na planta Emília (MB1EM1) e na planta jatrofa 1 (MB1JP1, MB1JP2, MB1JP4, MB1JP5, MB1JP6, MB1JP7) foram agrupadas com sequências isolados de SiMMV do GenBank em 2 Clusters distintos (I e III), respectivamente, indicando que os isolados de Emília e de jatrofa podem ser variantes de SiMMV.

O isolado detectado de SiMMV em moscas brancas coletadas em Emília neste trabalho agrupou no cluster I junto com sequências de isolados de descritos em plantas na região do Goiás GO. No Cluster II foram agrupadas apenas sequências de 3 isolados de SiMMV descritos em plantas do Mato Grosso do Sul MS. Por outro lado, no cluster III foi agrupada uma maior variabilidade de sequências de isolados de SiMMV, apresentada em 7 subgrupos, onde as 6 sequências isoladas de moscas brancas coletas em jatrofa 1 agruparam juntas em dos subgrupos, tendo sido observado ainda um subgrupo composto apenas por 3 sequências de isolados de SiMMV descritas em plantas na Bolívia.

Segundo Castillo-Urquiza et al. (2008), o begomovírus SiMMV é caracterizado por infectar plantas invasoras como *Sida* spp., mas que também já foi descrito infectando plantas cultivadas como o tomateiro. Essas ocorrências podem ser justificadas pela habilidade desses vírus se adaptarem rapidamente às hospedeiras cultivadas, através de mecanismos de evolução característicos de membros da família Geminiviridae como a recombinação, deriva genética e principalmente mutação (ROCHA et al., 2013).

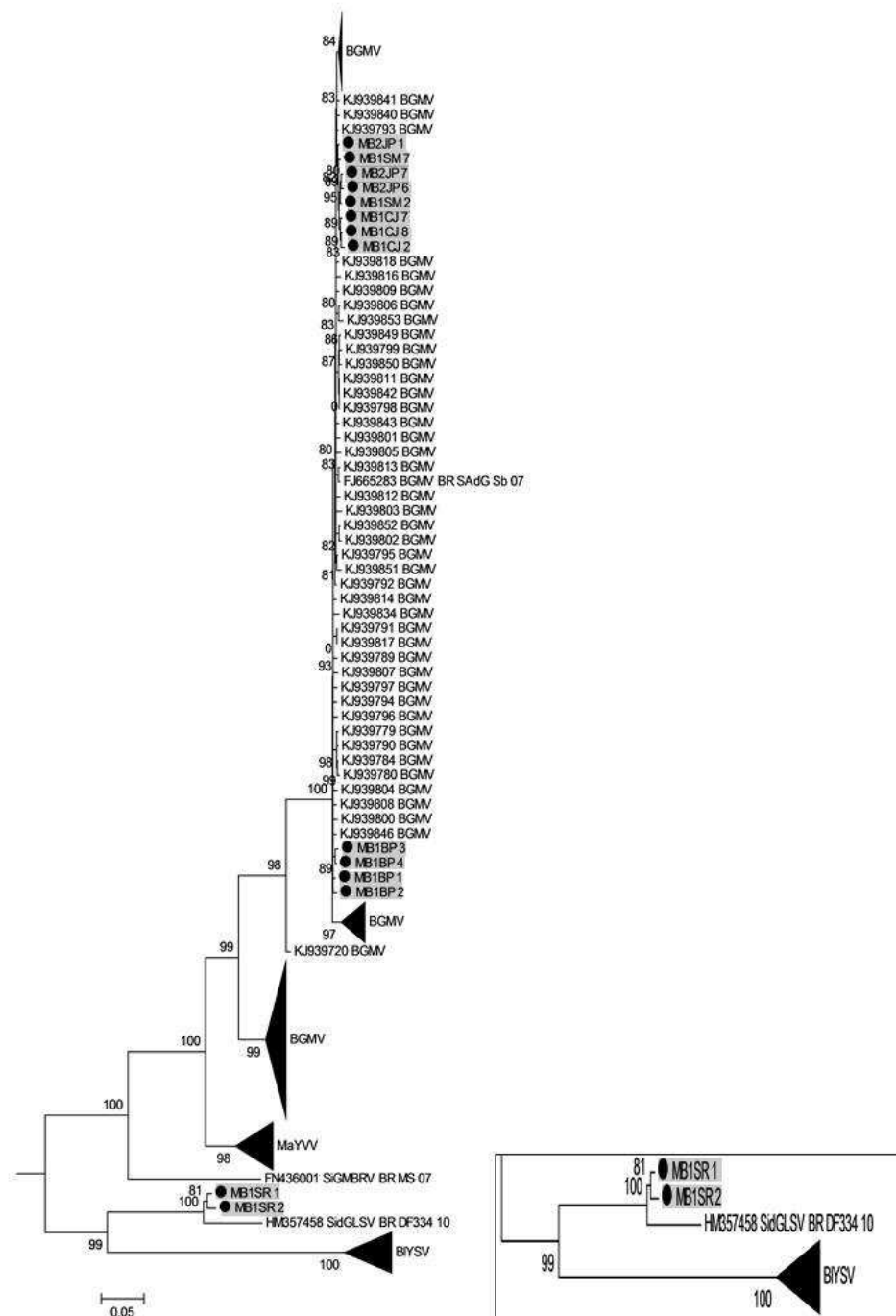
FIGURA 11. Ramo da árvore filogenética onde as sequências MB1EM1 e MB1JP1; MB1JP2; MB1JP4; MB1JP5; MB1JP6; MB1JP7, geradas no trabalho, foi agrupada por análise de máxima verossimilhança quando comparada com outras sequências do GenBank. Os ramos com suporte (aLRT) <80% foram colapsados.



Fonte: Dados da pesquisa.

Na Figura 12 está representado o ramo da árvore filogenética contendo 2 Clusters, onde foram agrupadas juntas no Cluster I as 14 sequências de nucleotídeos isoladas de moscas brancas coletadas em folhas de picão preto (4), de barba-de-falcão (3), de jatrofa 2 (3) e de berinjela (2) com sequências intimamente relacionadas com DNA-A de isolados de BGMV do GenBank. No Cluster II foram agrupadas as 2 sequências de nucleotídeos isoladas de moscas brancas coletadas em malvona juntamente com 1 sequência de begomovírus SiGLSV.

FIGURA 12. Ramo da árvore filogenética onde as sequências MB1SR1; MB1SR2; MB1BP1; MB1BP2; MB1BP3; MB1BP4; MB1SM2; MB1SM7; MB1CJ2; MB1CJ7; MB1CJ8; MB2JP1; MB2JP6 e MB2JP7, geradas no trabalho, foram agrupadas. Os ramos com suporte (aLRT) <80% foram colapsados.



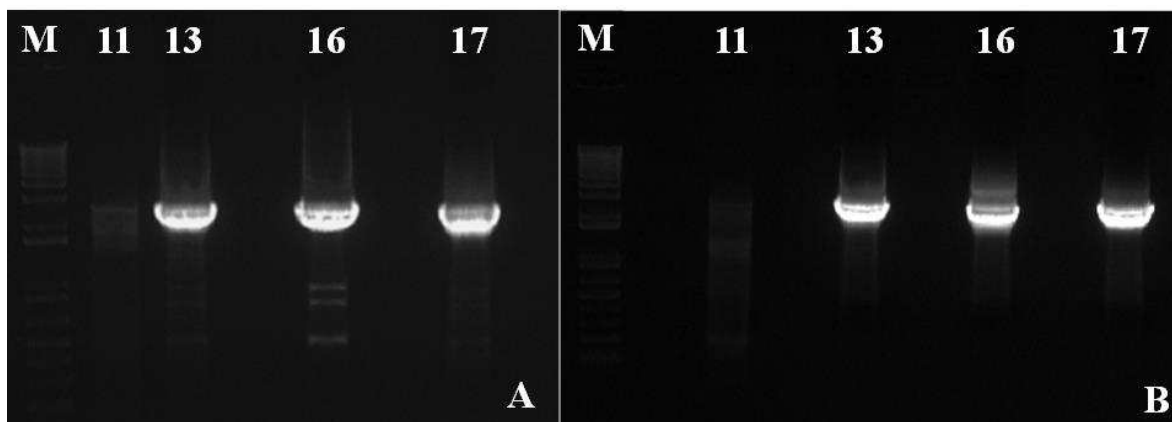
Fonte: Dados da pesquisa

5.4 Isolamento do componente DNA-A de begomovirus de áreas do Distrito Federal

A amplificação por PCR de tamanho esperado (2,6 Kb) para o componente DNA-A de begomovirus foi obtida a partir de moscas brancas coletadas nas plantas de picão preto (9), barba-de-falcão (12), jatrofa 2 (15) e berinjela (16), no Distrito Federal, utilizando as combinações de primers MB1BP_2 *Sal* I e MB1BP_2 *Sac* I, específicos para BGMV (FIGURAS 13 e 14).

Uma elevada quantidade de amplicons específicos para o componente DNA-A de begomovirus foi amplificada a partir das amostras de moscas brancas coletas em barba-de-falcão, jatrofa 2 e berinjela pela enzima Taq DNA polimerase Long Amp (NEB), usando as duas combinações de primers (Figura 13A e B), o que não foi observado para a amostra de mosca branca coletada em picão preto.

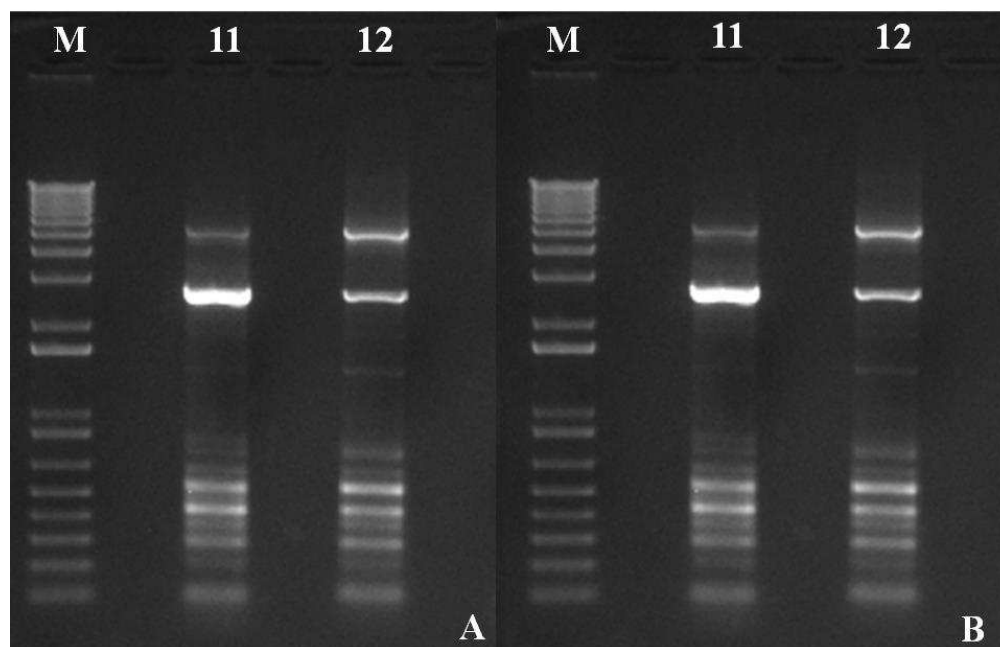
FIGURA 13. Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos da amplificação por PCR de componente DNA-A de begomovirus completo, a partir de moscas brancas coletadas em picão preto (9), barba-de-falcão (12), jatrofa 2 (15) e berinjela (16), usando a enzima Taq DNA polimerase Long Amp (NEB) e as combinações de primers MB1BP_2 *Sal* I (A) e MB1BP_2 *Sac* I (B), específicos para BGMV.



Fonte: Dados da pesquisa.

Curiosamente, o uso da enzima DNA Polimerase Phusion High fidelity (New England BioLabs) promoveu elevadas quantidades de amplicons do tamanho esperado para o DNA-A completo de begomovirus a partir da amostra de moscas brancas coletadas em picão preto, utilizando as duas combinações de primers (Figura 14 A e B).

FIGURA 14. Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos da amplificação por PCR de DNA-A completo de begomovírus a partir de moscas brancas coletadas em picão preto na área do Distrito Federal, utilizando a enzima DNA Polimerase Phusion High fidelity (New England BioLabs) e os pares de primers MB1BP_2 *Sal* I (A) e MB1BP_2 *Sac* I (B), específicos para BGMV. **11.** DNA de picão preto concentrado. **12.** DNA de picão preto diluído.



Fonte: Dados da pesquisa.

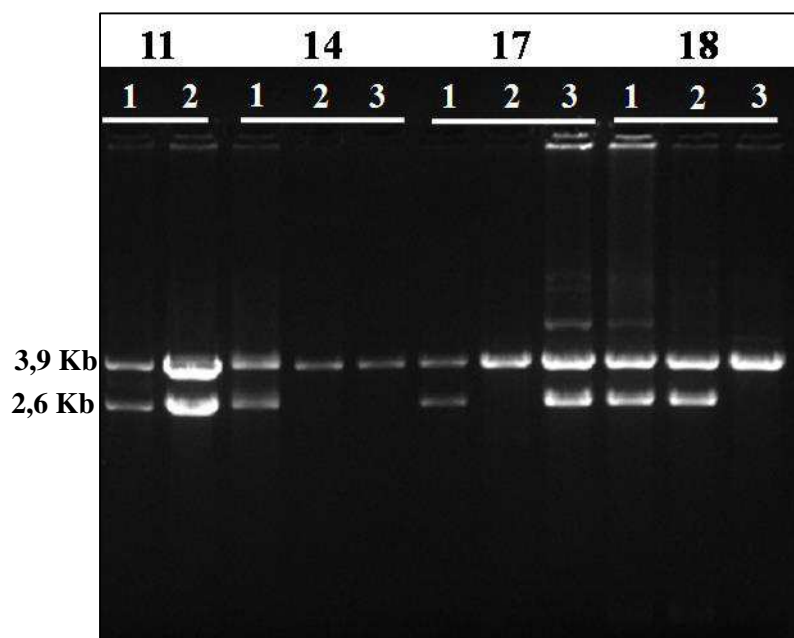
A amplificação do segmento genômico do componente DNA-A completo confirmou a presença de begomovírus nas amostras de moscas brancas coletadas em picão preto, barba-de-falcão, jatrofa 2 e berinjela, no Distrito Federal, já validada anteriormente por sequenciamento (item 5.2), sendo possivelmente da espécie BGMV, devido a especificidade dos primers utilizados.

Os fragmentos do componente DNA-A completo amplificados pela combinação de primers MB1BP_2 *Sal* I a partir das quatro amostras isoladas de moscas brancas coletadas em picão preto, barba-de-falcão, jatrofa 1 e berinjela, sendo 02, 03, 03 e 03 clones, respectivamente, foram eluídos e clonados em vetor Topo TA 2.1.

A clonagem dos fragmentos de DNA viral foi analisada por padrões de restrição obtidos pelas enzimas *EcoR* I e *Msp* I em DNAs plasmidiais extraídos de colônias brancas

selecionadas em meio LB líquido, contendo o antibiótico canamicina. Todas as amostras digeridas com a enzima *EcoR* I apresentaram o fragmento de tamanho esperado para o vetor (3,9 Kb), porém a presença de fragmentos do componente DNA-A completo de begomovírus (2,6 Kb) foi confirmada para clones das quatro clonagens a partir de moscas coletadas em picão preto (clones 1 e 2), barba-de-falcão (clone 1), Jatrofa 02 (clones 1 e 3), e berinjela (clones 1 e 2) o tamanho esperado (Figura 15).

FIGURA 15. Eletroforese em gel de agarose 1% de fragmentos de restrição gerados pela enzima *EcoR* I em DNAs plasmidiais de amostragem representativa de clones (1-3) das clonagens de segmentos do componente DNA-A de begomovírus amplificados de moscas brancas coletadas em picão preto (9), barba-de-falcão (12), jatrofa 2 (15) e berinjela (16), usando a combinação de primers MB1BP_2 *Sal* I.

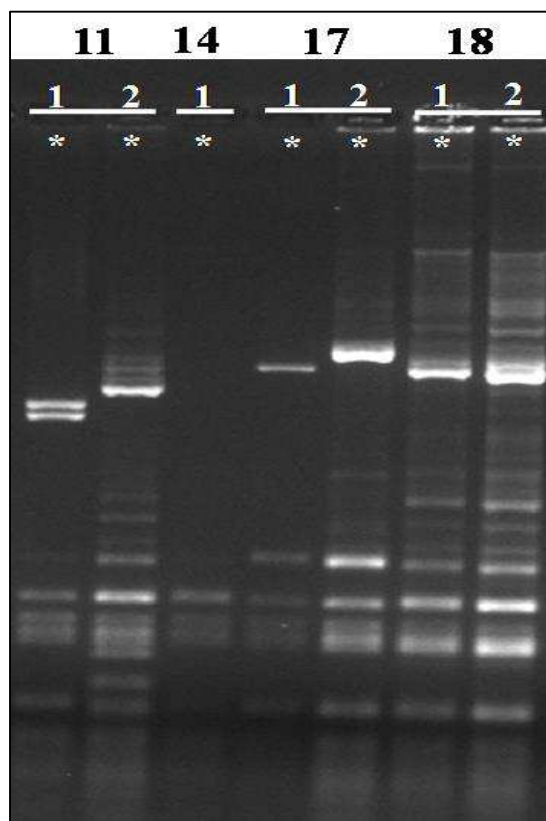


Fonte: Dados da pesquisa.

Seis padrões de restrição foram gerados pela enzima *Msp* I em sete DNAs plasmidiais recombinantes selecionados por perfil de restrição com *EcoR* I (Figura 16). Padrões de restrição diferentes foram observados dentro e entre os clones de DNA-A de begomovírus a partir de moscas coletadas em picão preto (clones 1 e 2), barba-de-falcão

(clone 1) e Jatrofa 02 (clones 1 e 3), enquanto que os dois clones de berinjela apresentaram padrão similar e berinjela (clones 1 e 2).

FIGURA 16. Eletroforese em gel de agarose 1% de fragmentos de restrição gerados pela enzima *Msp* I em DNAs plasmidiais de clones (1-3) das clonagens de segmentos do componente DNA-A de begomovírus amplificados de moscas brancas coletadas em picão preto (9), barba-de-falcão (12), jatrofa 2 (15) e berinjela (16), usando a combinação de primers MB1BP_2 *Sal* I.



Fonte: Dados da pesquisa.

Uma explicação para os diferentes padrões de restrição observados pode ser a posição em que os fragmentos de DNA-A de begomovírus tenham sido inseridos no vetor nas direções sentido e antissentido. Por outro lado, pode-se considerar ainda a presença de variabilidade genética interna entre os isolados virais.

Os sete DNAs plasmidiais conduzindo DNA-A de begomovírus, selecionados por padrões de restrição, foram devidamente identificados como MB1BP-1 e MB1BP-2 para

mosca branca 1 *Bidens pilosa* clones 1 e 2 (picão preto), MB1CJ-3 para mosca branca 1 *Crepis japonica* clone 1 (barba-de-falcão), MB2JP-1 e MB2JP-3 para mosca branca 1 *Jatropha podagrica* 2 clones 1 e 3 (jatrofa 2), e MB1SM-1 e MB1SM-2 para mosca branca 1 *Solanum melongena* 1 clones 1 e 2 (berinjela), e enviados para sequenciamentos na Coreia do Sul.

A estratégia de sequenciamento do genoma completo do componente do DNA-A begomovírus tem sido utilizada como critério para a atual taxonomia da Família de vírus Geminiviridae (VARSANI et al., 2014) e do gênero *Begomovirus*, demarcando espécies e isolados desse gênero (BROWN et al., 2015). De acordo Brown et al. (2015), o componente DNA-A é eficiente para realizar as funções essenciais dos vírus, relacionados com a replicação e ao movimento, enquanto o componente DNA-B não é considerado para demarcar novas espécies. Isto se deve ao fato de que begomovírus descritos no velho mundo podem apresentar genomas monopartidos, não apresentando o segmento DNA-B presente nos begomovírus bipartidos descritos no novo mundo. Desse modo, o segmento DNA-A estará presente em todos os begomovírus, sendo possível sua utilização para realizar caracterização e taxonomia de vírus deste gênero. A importância desse método é que, anteriormente, estudos de taxonomia eram realizados a partir dos sintomas e das espécies isoladas das plantas, porém hoje é mais confiável a realização do sequenciamento do genoma viral.

O fator inovador deste trabalho se faz notar pela estratégia de identificação da diversidade de begomovírus presente no vetor mosca branca, pela amplificação e sequenciamento do genoma completo do componente do DNA-A, descrita anteriormente somente por Ng et al. (2011) em abordagem metagenômica para explorar a diversidade de vírus em moscas brancas coletados em duas regiões agrícolas importantes na Flórida, EUA. Com o sequenciamento do genoma completo do DNA-A específico para isolados de BGMV descritos nesse estudo, espera-se que sejam identificados, pelo menos, os isolados encontrados a partir das moscas brancas coletadas nas espécies picão preto, barba-de-falcão, jatrofa e berinjela.

6 CONCLUSÕES

- Begomovírus das espécies SiYBV, CoMoV, SiMMV, BGMV e SiGLSV descritos neste trabalho evidenciam a diversidade de begomovírus presente em moscas brancas nas áreas estudadas, mas não necessariamente estão presentes nas respectivas plantas onde as moscas foram coletadas.
- Os primers PAL1v 1978 e PAR1c 496 descritos para detecção de DNA-A de begomovírus a partir de plantas são eficientes para detecção específica desse componente genômico viral a partir do vetor mosca branca.
- A detecção específica de DNA-A do componente de begomovírus por PCR a partir do DNA total extraído de moscas brancas é enriquecida pela amplificação por RCA e PCR-RCA.
- O begomovírus BGMV está predominantemente presente em moscas brancas coletadas em plantas na área do Distrito Federal.
- A diversidade presente nos isolados dos 5 vírus identificados neste trabalho está agrupada em 4 ramos filogenéticos, suportados pela porcentagem de identidade de sequências de nucleotídeos comparadas com sequências dos isolados de begomovírus disponíveis no GenBank.

7. PERSPECTIVAS

A diversidade de begomovírus presente nas moscas brancas deste estudo precisa ser confirmada pelo sequenciamento do genoma completo do componente DNA-A tanto a partir de DNAs totais isolados de todas as amostras de moscas brancas quanto das plantas onde as moscas brancas foram coletadas, e esta pesquisa já se encontra em andamento.

8. REFERÊNCIAS

- AMBROSE HE, CLEWLEY JP. Virus discovery by sequence- independent genome amplification. **Reviews In Medical Virology**. 16 (6):365-83, 2006.
- AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 8 set 2015.
- ALMEIDA, M. M. S. **Caracterização molecular de begomovirus de malváceas**. Dissertação (Mestre em Fitopatologia), Universidade de Brasília, Brasília 2013.
- AMBROZEVICIUS, L. P. et al. Genetic diversity of begomovirus infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 4, p. 372-377, 2002.
- AZEVEDO, F. de R. et al. Eficiência de produtos naturais para o controle de *Bemisia tabaci* biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) em meloeiro. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 1, p. 73-79, 2005.
- BALDIN, E. L. L.; VENDRAMIM, J. D.; LOURENÇÃO, A. L. Resistência de genótipos de tomateiro à mosca-branca *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 3, p. 435-441, 2005.
- BARBOSA, L. F. et al. Mosca-branca *Bemisia tabaci* biótipo Q identificado no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil In: **XXXVII Congresso Paulista de Fitopatologia**, Botucatu. 2014.
- BARRETO S.S. et al. Study of weeds as potential inoculum sources for a tomato-infecting begomovirus in central Brazil. **Phytopathology**, v. 103(5), p.436-44, 2013.
- BLAWID, R. et al. Molecular and biological characterization of corchorus mottle virus, a new *Begomovirus* from Brazil. **Archives of Virology**, v. 158, n. 12, p. 2603-2609, 2013.
- BROWN, J. K. et al. Family Geminiviridae. In *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 351-373. Edited by A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens E. Lefkowitz. San Diego: **Elsevier Academic Press**, 2012.
- BROWN J.K. et al. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. **Archives of Virology**, v. 160, n. 6, p. 1593-619, 2015.
- BROWN, J. K. The *Bemisia tabaci* complex: genetic and phenotypic variability drives begomovirus spread and virus diversification. **Plant Disease**, v. 1, p. 25-56, 2007.

- CASTILLO-URQUIZA, G. P. et al. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Archives of Virology**, v. 153, n. 10, p. 1985-1989, 2008.
- CLAUSSON et al. Compaction of rolling circle amplification products increases signal integrity and signal-to-noise ratio. **Scientific Reports**, 2015.
- COSTA, A. S. Three whitefly-transmitted virus diseases of beans in São Paulo, Brazil. **FAO Plant Protection Bulletin**, v. 13, n. 6, p. 1-12, 1965.
- DE BARRO, P. J. et al. *Bemisia tabaci*: a statement of species status. **Annual Review of Entomology**, v. 56, p. 1-19, 2011.
- DE SOUZA J. A.; et al. **Parasitismo de ninfas de Bemisia tabaci biótipo B, em cultivos de soja no estado de Goiás**. Resumo em anais de congresso In: XXV CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 2014.
- DINSDALE, A. et al. **Refined global analysis of Bemisia tabaci (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) Mitochondrial cytochrome oxidase 1 to identify species level genetic boundaries**. Annals of the Entomological Society of America, Lanham, v. 103, p. 196-208, 2010.
- DOYLE, J.J. DOYLE, J. L. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v 19, 11-15, 1987.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.
- EICHELKRAUT, K.; CARDONA, C. Biología, cria massal y aspectos ecológicos de la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae), com plaga del frijol comun. **Turrialba**, v. 39, n. 1, p. 55-62, 1989.
- ELBAZ, M.; LAHAV, N.; MORIN, S. Evidence for pre-zygotic reproductive barrier between the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Bulletin of Entomological Research**, Cambridge, v. 100, n. 5, p. 581-590, 2010.
- FARIA, J.C. et. al. Situação atual das geminiviruses no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 125-137, 2000.
- FAUQUET, C. M. et al. Virology division news: revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family Geminiviridae, and an updated list of begomovirus species. **Archives of Virology**, v. 148, n. 2, p. 405-421, 2003.
- FAUQUET, C. M. et al. Vírus taxonomy: classification and nomenclature of viruses; eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. San Diego: **Academic Press**. p. 1259, 2005.

FERNANDES, F. R. et al. Three distinct begomoviruses associated with soybean in central Brazil. **Archives of Virology**, v. 154, n. 9, p. 1567-1570, 2009.

FERNANDES, F. R. et al. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. **Virus Genes**, p. 251- 258, 2008.

FIRDAUS, S. et al. The *Bemisia tabaci* species complex: additions from different parts of the world. **Insect Science**, v. 20, n. 6, p. 723-733, 2013.

FONSECA, M. E. N. et al. **Sidastrum golden leaf spot virus isolate DF334 segment DNA-A, complete sequence** (HM357458) (Depósito de seqüência no GenBank / NCBI-submissão direta 26-JAN-2011).

FREITAS-ASTUA, J. et al. Traditional and transgenic strategies for controlling tomato-infecting begomoviruses. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 5, p. 437-449, 2002.

GALLO, D. et al. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, p. 920, 2002

GÁLVEZ, G. E.; MORALES, F. J. Whitefly-transmitted viruses. In: SCHWARTZ, H. F.; PASTOR CORRALES, M. A. (Ed.). **Bean production problems in the tropics**, Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, p. 379-408, 1989.

GERLING, Dan. Natural enemies of *Bemisia tabaci*, biological characteristics and potential as biological control agents: a review. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 17, n. 1, p. 99-110, 1986.

GIBBS, A.; OHSHIMA, K. Potyviruses and the digital revolution. **Annual Review of Phytopathology**, v.48 , p.205 - 23. 2010.

HAJI, F. N. P.; FERREIRA, R. C. F.; MOREIRA, A. N. Descrição Morfológica, aspectos biológicos, Danos e importância econômica. In: HAJI, F. N. P.; BLEICHER, E. (Ed.). **Avanços no manejo da mosca-branca *Bemisia tabaci* biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae)**. Petrolina, PE: Embrapa Semi-Árido, p. 21-30. 2004.

HARKINS, G. W. et al. Dating the origins of the maize-adapted strain of maize streak virus, MSV-A. **Journal of General Virology**, 90, 3066–3074, 2009.

HALL, T. A. Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: **Nucleic Acids Symposium series**. p. 95-98, 1999.

HIROSE, E. et al. **Danos causados por diferentes níveis de infestação de *Bemisia tabaci* Biotipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) em soja**. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA NA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, Brasília. Resumos. Londrina, Embrapa Soja, p. 84-86, 2010.

HOROWITZ, A. R. et al. Biotype Q of *Bemisia tabaci* identified in Israel. **Phytoparasitica**, v. 31, n. 1, p. 94-98, 2003.

INOUE-NAGATA, A. K. et al. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase. **Journal of Virological Methods**, v. 116, n. 2, p. 209-211, 2004.

JONES, DAVID R.; Plant viruses transmitted by whiteflies. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, n. 3, p. 195-219, 2003.

KEARSE, MATTHEW et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.

KITAJIMA, E. W. **Programa biota/micro-organismos: lista comentada dos vírus de plantas descritos no Brasil (1911-2013)**. Dept. Fitopatologia e Nematologia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, p. 59, 2014.

KORSMAN, STEPHEN N J et al. **Virologia**. Elsevier Brasil, Ed 1, p. 41, 2014.

LAPIDOT, M.; FRIEDMANN, M. Breeding for resistance to whitefly-transmitted geminiviruses. **Annals of Applied Biology**, v. 140, n. 2, p. 109-127, 2002.

LAZAROWITZ, S. G.; SHEPHERD, R. J. Geminiviruses: genome structure and gene function. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 11, n. 4, p. 327-349, 1992.

List of begomovirus isolates as of Species, Mar. 5th, 2015. Disponível em: www.talk.ictvonline.org/ictv_wikis/m/files_gemini/5120/download.aspx, Acessado em 10 de Setembro de 2015.

LIU, S. S.; WALLING, L. L.; WANG, X. W. Special Issue Introduction—The Whitefly *Bemisia tabaci* Species Complex and Begomoviruses: Research Progress and Future Prospects. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 11, n. 2, p. 171-175, 2012.

LOURENÇÃO, A. L. **Situação atual da mosca-branca no Brasil—medidas de controle**. **Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 153-155, 2002.

MARUBAYASHI, J. M. et al. At least two indigenous species of the *Bemisia tabaci* complex are present in Brazil. **Journal of Applied Entomology**, v. 137, n. 1-2, p. 113-121, 2013.

MICHEREFF-FILHO, M. et al. Resposta à mosca-branca (*Bemisia tabaci*) e ao Tomato severe rugose vírus de acessos de *Solanum* subgênero *Leptostemonum*. **Horticultura Brasileira**, n. 30, p. 440-445, 2012.

MOKILI, J. L.; ROHWER, F.; DUTILH, B E. Metagenomics and future perspectives in virus discovery. **Current Opinion in virology**, v. 2, n. 1, p. 63-77, 2012.

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.

MOREIRA, M. A. B. et al. **Alternativas para o controle da mosca-branca, *Aleurothrixus aepim* na cultura da mandioca em Sergipe**. Aracaju: EMBRAPA Tabuleiros Costeiros. p 4, 2006.

MOURA, A.P.; FILHO, M.M.; GUIMARÃES, J.A. **Manejo da resistência da mosca-branca *Bemisia tabaci* biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) a agrotóxicos utilizados em hortaliças**. Brasília: Embrapa Hortaliças. (Embrapa Hortaliças. Circular Técnica, 114) 10 p, 2013.

NAGATA, A.K.I.; ÁVILA, A.C.; VILLAS BÔAS, G.L. **Os geminivírus em sistema de produção integrada de tomate indústria**. Brasília: Embrapa Hortaliças, p. 12, 2009.

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

NG, T. F. F. et al. Exploring the diversity of plant DNA viruses and their satellites using vector-enabled metagenomics on whiteflies. **PloS One**, 2011.

OLIVEIRA, M. R. V. et al. **Moscas- brancas no Brasil e no mundo: identificação e expressão econômica** . In: OLIVEIRA, M.R.V.; BATISTA, M. F.; LIMA, L. H. C.; MARINHO, V.L.A.; FARIA, M.R. (Ed.) *Moscas-brancas (Hemiptera: Aleyrodidae)*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia p. 5-87, 2005.

OLIVEIRA, M. R. V. **Levantamento de moscas-brancas na cultura da mandioca no Brasil**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 20, 2001.

OLIVEIRA, M. R. V.; SILVA, O. L. R. **Prevenção e controle da mosca-branca, *Bemisia argentifolii* (Hemiptera: Aleyrodidae)**. Brasília: Ministério da Agricultura e do abastecimento, Departamento de Defesa e Insperção Vegetal. 1997.

OWOR, B.E. et al. Genetic analysis of Maize streak isolates from Uganda reveals widespread distribution of a recombinant variant. **Journal of General Virology**, v.88, p.3154- 3165. 2007.

PAKKIANATHAN et al. A replicação do Tomato yellow leaf curl virus no seu vector mosca branca *Bemisia tabaci*. **Journal of Virology**, v.89, 2015.

PAPROTKA, T.; METZLER, V.; JESKE, H. The first DNA 1-like α satellites in association with New World begomoviruses in natural infections. **Virology**, v. 404, n. 2, p. 148-157, 2010.

- PATEL, V. P. et al. Cloning biologically active geminivirus DNA using PCR and overlapping primers. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 5, p. 1325-1326, 1993.
- PERRING, T. M. The *Bemisia tabaci* species complex. **Crop Protection**, v. 20, n. 9, p. 725-737, 2001.
- POLSTON, J. E.; DE BARRO, P.; BOYKIN, L. M. Transmission specificities of plant viruses with the newly identified species of the *Bemisia tabaci* species complex. **Pest Management Science**, v. 70, n. 10, p. 1547-1552, 2014.
- PRICE, M. N.; DEHAL, P. S.; ARKIN, A. P. FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. **PloS One**, v. 5, n. 3, p. 9490, 2010.
- RIBEIRO, S. G. et al. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil*. **Archives of Virology**, v. 148, n. 2, p. 281-295, 2003.
- ROCHA, C. S. et al. Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly evolving, and segregated based on geographical location. **Journal of virology**, v. 87, n. 10, p. 5784-5799, 2013.
- ROJAS et. al. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly- transmitted geminiviruses. **Plant Disease** p. 340-347, 1993
- ROJAS, M. R. et al. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 361-394, 2005.
- SHIMODAIRA, H.; HASEGAWA, M. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 8, p. 1114-1116, 1999.
- SIMÓN, B.; CENIS, J. L.; DE LA RÚA, P. Distribution patterns of the Q and B biotypes of *Bemisia tabaci* in the Mediterranean Basin based on microsatellite variation. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 124, n. 3, p. 327-336, 2007.
- SCHOLTHOF, K. B., et al. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, 12 , 938 – 54, 2011
- SOBRINHO, R. R. et al. Contrasting genetic structure between two begomoviruses infecting the same leguminous hosts. **Journal General Virology**, v. 95, n. 11, p. 2540-52, 2014.
- SOUZA, J. O. D.; NAGATA, A. K. I. Estudo da diversidade de begomovírus em tomateiro cultivado na região da caatinga do Brasil. **46º Congresso Brasileiro de Fitopatologia**. 2013

STANLEY, J. Analysis of African cassava mosaic virus recombinants suggests strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. **Virology**, v. 206, n. 1, p. 707-712, 1995.

STANLEY, J. et al. Geminiviridae. *In*: FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; ALL, L.A. (eds) *Vírus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV*. Elsevier/Academic Press. London. 2005.

SUJII, E. R. et al. **Metodologia de amostragem de ninfas e avaliação preliminar de fungos entomopatogênicos contra a mosca branca no meloeiro**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 15, 2002.

SUN, D. B. et al. Incompatibilidade reprodutiva entre as B e Q biótipos de mosca branca *Bemisia tabaci*: evidências genéticas e comportamentais. **Entomological Research, Chichester**, v. 101, p. 211-220, 2011.

TANG P, CHIU C. Metagenomics for the discovery of novel human viruses. **Future Microbiol**, 2010.

TAVARES, S. S. et al. Further molecular characterization of weed-associated begomoviruses in Brazil with an emphasis on Sida spp. **Planta Daninha**, v. 30, n. 2, p. 305-315, 2012.

TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. **Estudo dos insetos**. Tradução da 7ª Edição de Borror and DeLong's introduction to the study of insects. São Paulo Cengage Learning, p. 809, 2011.

UNSELD, S.; FRISCHMUTH, T.; JESKE, H. Short deletions in nuclear targeting sequences of African cassava mosaic virus coat protein prevent geminivirus twinned particle formation. **Virology**, v. 318, n. 1, p. 90-101, 2004.

VARSANI, A., et al. Comparative analysis of Panicum streak virus and Maize streak virus diversity, recombination patterns and phylogeography. **Virology Journal**, 6:194, 2009.

VARSANI, A. et al. Establishment of three new genera in the family Geminiviridae: Becurtovirus, Eragrovirus and Turncurtovirus. **Archives of Virology**, v. 159, n. 8, p. 2193-2203, 2014.

VILLAS BOAS, G. L.; BRANCO, M. C. **Manejo integrado da Mosca-branca (*Bemisia tabaci* biótipo B) em sistema de produção integrada de tomate indústria (PITI)**. Técnica Circular, n.70, p. 1-16, 2009.

VILLAS BÔAS, G.L. **Manejo integrado de mosca-branca**. Brasília: Embrapa Hortaliças. p. 6, 2005.

VILLAS BÔAS, G.L. et al. **Manejo integrado da mosca-branca *Bemisia argentifolii***. Brasília, DF: EMBRAPA-CNPq, 11 p, 1997.

- WALKER, G.P.; PERRING, T.M.; FREEMAN, T.P. Life history, functional anatomy, feeding and mating behavior. In: STANSLY, P.A.; NARANJO, S.E (Ed.). **Bemisia: bionomics and management of a global pest**. Springer, Dordrecht, p. 109-160, 2010.
- WANG, Z. Y. et al. Biótipo e estado de resistência a inseticidas da mosca branca *Bemisia tabaci* da China. **Pest Management Science**. Chichester v.66, p.1360-1366, 2010.
- WANG, X. W. et al. Transcriptome analysis and comparison reveal divergence between two invasive whitefly cryptic species. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 458, 2012.
- XU, J.; BARRO, P. J.; LIU, S. S. Incompatibilidade reprodutiva entre os grupos genéticos de *Bemisia tabaci* suporta a proposição de que a mosca branca é um complexo de espécies crípticas. **Entomological Research, Chichester**, v. 100, p.359-366, 2010.
- YUKI, V. A. et al. Colonização de *Bemisia tabaci* (Genn)(Hemiptera: Aleyrodidae) em maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e transmissão de um geminivírus. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA**. p. 316, 2002.
- ZHANG, W. et al. Structure of the maize streak virus geminate particle. **Virology**, v. 279, n. 2, p. 471-477, 2001.