



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
PROTEÇÃO DE PLANTAS



ADSO LEVI SOARES DE FIGUEIREDO MENDES

**VARIABILIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DO  
BEGOMOVÍRUS *Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus*  
(CnMLDV) INFECTANDO *Cnidoscolus urens* (L.) Arthur (cansanção)**

Rio Largo – AL  
2017

**ADSO LEVI SOARES DE FIGUEIREDO MENDES**

**VARIABILIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES  
DO BEGOMOVÍRUS *Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus*  
(CnMLDV) INFECTANDO *Cnidoscolus urens* (L.) Arthur  
(cansanção)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Proteção de Plantas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Iraildes Pereira Assunção

Coorientador: Dr. Roberto Ramos Sobrinho

Rio Largo – AL  
2017

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

M538v Mendes, Adso Levi Soares de Figueiredo.  
Variabilidade e estrutura genética de populações do begomovírus *Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus* (CnMLDV) infectando *Cnidosculus urens* (L.) Arthur (Cansação) / Adso Levi Soares de Figueiredo Mendes. – 2017.  
68 f. : il.

Orientadora: Iraíldes Pereira Assunção.  
Coorientador: Roberto Ramos Sobrinho.  
Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) - Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2017.

Bibliografia: f. 53-68.

1. Proteção de plantas. 2. Infecção de plantas . 3. Begomovírus. 4. Plantas não cultivadas. 5. Evolução molecular. I. Título.

CDU: 581.2

ADSO LEVI SOARES DE FIGUEIREDO MENDES

**VARIABILIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES  
DO BEGOMOVÍRUS *Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus*  
(CnMLDV) INFECTANDO *Cnidoscolus urens* (L.) Arthur  
(cansação)**

Dissertação submetida ao corpo docente do  
Programa de Pós-Graduação em Proteção  
de Plantas, do Centro de Ciências Agrárias  
da Universidade Federal de Alagoas, e  
aprovada em 22 de fevereiro de 2017.



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Iraildes Pereira Assunção - Universidade Federal de Alagoas  
(Orientadora)

**Banca Examinadora:**



---

Dr. Alessandro Riffel – Embrapa Tabuleiros Costeiros (Examinador Externo)



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sarah Jacqueline Cavalcanti da Silva – Universidade Federal de Alagoas  
(Examinador Interno)

Rio Largo – AL  
2017

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, em especial aos meus pais Maria de Fátima e Hermano, e à minha irmã Camila pelo amor, incentivo e compreensão.

A Aryanna Regina, minha companheira, por todo o amor, pela compreensão quando fui ausente, pelo constante apoio e por todos os momentos compartilhados.

Ao Centro de Ciências Agrárias e ao Programa de Pós-graduação em Proteção de Plantas pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À professora Iraídes Pereira Assunção, minha orientadora, e ao professor Gaus Silvestre de Andrade Lima pela orientação, pela confiança em mim depositada, pelos conhecimentos compartilhados e pela dedicação em viabilizar este trabalho em todas as suas etapas, incluindo a desenvolvida na Universidade Federal de Viçosa.

Ao Dr. Roberto Ramos Sobrinho, meu coorientador, pelos ensinamentos, pelo incentivo, por acreditar e confiar em mim, pela amizade dentro e fora do Laboratório de Fitopatologia Molecular e Virologia Vegetal e por mediar a minha ida à Universidade Federal de Viçosa, propiciando uma experiência bastante enriquecedora.

Ao professor Francisco Murilo Zerbini Júnior por me receber por um semestre no Laboratório de Virologia Vegetal Molecular da Universidade Federal de Viçosa, onde desenvolvi uma etapa essencial do trabalho, e conheci pessoas incríveis.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Fitopatologia Molecular e Virologia Vegetal (Mayra, Frederico, Nayana, Lucas Fonseca, Izabella, Lucas Jobim, Antonio, Dr. Leonardo, Thiago, Tamires, Rafaela, Prof.<sup>a</sup> Sarah, Caio, Janaíne, Mayara, Lauristela, Jussara, Jackeline, Gilberlan, Daniel e Raphael) e do Laboratório de Virologia Vegetal Molecular (Camila, Adriana, César, Rafaela, Murilo Alves, Diogo, Larissa, Angélica, João Andrade, João Silva, Sarah, Hermano, Talita, Elton, Sílvia, Osvaldo, Ana Caroline e Gabriela) pela ajuda que me deram, pelo aprendizado propiciado ou pela agradável e divertida companhia que tornou mais leve e alegre a rotina de laboratório. Destes, faço um agradecimento especial a Camila por me acompanhar durante toda a minha passagem pela UFV, compartilhando comigo conhecimentos inestimáveis e indispensáveis para a execução do trabalho, e pela divertida companhia e amizade; a Mayra pela amizade e por me auxiliar desde o

começo do trabalho; a Nayana pelo constante incentivo e pela amizade; e a Fred e Lucas Fonseca pela incomparável alegria que transmitiram diariamente.

A Michele por sempre ser solícita e por toda ajuda em questões administrativas.

Aos grandes amigos do Centro de Ciências Agrárias Alison, Luan e Ariane pela amizade e pelas conversas e reuniões produtivas ou apenas divertidas.

Aos amigos da vida Daniella, Eric, Jéssica e Victor por estarem comigo há tantos anos, sempre presentes nos momentos de alegrias e adversidades.

Ao amigo Wagner José pela inspiração e pelo exemplo de dedicação.

Ao meu chefe, Alan Souza, pela amizade e compreensão.

A todos que contribuíram para a execução deste trabalho.

## RESUMO

Vírus da família *Geminiviridae* possuem genoma de DNA circular de fita simples encapsidado em partículas geminadas quasi-icosaédricas, sendo divididos em sete gêneros (*Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus*) com base no tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros, organização genômica e relacionamento filogenético. *Begomovirus* são transmitidos pelo complexo de espécies crípticas de mosca-branca *Bemisia tabaci*, e causam grandes prejuízos em culturas de importância econômica em todo o mundo. Além de plantas cultivadas, begomovírus infectam hospedeiras daninhas/silvestres que podem servir como reservatório viral. Com o objetivo de avaliar a variabilidade e estrutura genética de populações de begomovírus infectando a planta não-cultivada *Cnidoscolus urens* (L.) Arthur (cansanção), amostras foliares apresentando sintomas indicativos de infecção por begomovírus foram coletadas em diferentes localidades do Estado de Alagoas em 2015 e 2016. O DNA total foi extraído a partir de cada amostra e utilizado como molde para amplificação por círculo rolante (RCA), seguida de clonagem e sequenciamento. Análise de comparações pareadas de sequências nucleotídicas do DNA-A mostrou que todos os isolados pertencem a uma única espécie: *Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus* (CnMLDV). Análises filogenética e de estruturação de populações mostraram a divisão dos isolados de CnMLDV em duas subpopulações (Norte e Sul), as quais apresentam altos valores de variabilidade nucleotídica. Análises de recombinação e de evolução em rede mostraram fortes evidências de eventos de recombinação ocorrendo entre isolados de CnMLDV. Finalmente, foi detectada forte pressão de seleção negativa atuando sobre os genes *CP* e *Rep* de CnMLDV. Juntos, esses resultados mostram que a alta variabilidade genética observada para os isolados CnMLDV está diretamente relacionada a eventos frequentes de recombinação ocorrendo ao longo do genoma, e que seleção purificadora atua de forma a manter a sequência de aminoácidos das proteínas virais. Além disso, mutação foi determinada como um dos principais fatores atuando na diversificação dos isolados de CnMLDV.

**Palavras-chave:** Geminiviridae. Plantas não-cultivadas. Evolução molecular.

## ABSTRACT

Viruses in the Family *Geminiviridae* have circular single-stranded DNA genome that is encapsidated into twinned quasi-icosahedral particles and are divided into four genera (*Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus*) based on the type of insect vector, genome organization, host range and phylogenetic relationship. *Begomovirus* are transmitted by whiteflies within the *Bemisia tabaci* cryptic species complex and cause great losses in economically important crops worldwide. Besides being able to infect crop plants begomoviruses also infect weed/wild plants which serve as viral reservoir. Aiming to evaluate the genetic variability and population structure of begomoviruses infecting the non-cultivated host *Cnidocolus urens* (L.) Arthur, leaf samples showing indicative symptoms of begomoviral infection were collected in different locations within Alagoas State in the years 2015 and 2016. Total DNA was extracted from each sample and used as template for rolling circle amplification (RCA) followed by cloning and sequencing. Pairwise sequence comparisons analysis of DNA-A showed that all isolates belong to a single species: *Cnidocolus mosaic leaf deformation virus* (CnMLDV). Phylogenetic and population structure analyses showed that CnMLDV isolates are separated in two subpopulations (North and South) which have high nucleotide variability values. Recombination and network evolution analyses showed strong evidence of recombination events occurring between CnMLDV isolates. Finally, strong negative selection pressure acting upon *CP* and *Rep* genes of CnMLDV was detected. Taken together these results show that the high genetic variability observed in CnMLDV isolates is directly related to frequent recombination events occurring along the virus genome and that strong purifying selection acts in a way to maintain the viral proteins amino acid sequences. Furthermore, mutation was determined as one of the main factors acting in the diversification of CnMLDV isolates.

**Keywords:** Geminiviridae. Non-cultivated plants. Molecular evolution.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Organização genômica dos begomovírus . . . . . 17
- Figura 2 – Matriz de identidades de sequências do DNA-A de isolados de CnMLDV . . . . . 34
- Figura 3 – Árvores filogenéticas de inferência bayesiana construídas para CnMLDV. A. DNA-A. B. Gene *CP*. C. Gene *Rep*. Isolados da população sul estão marcados em azul, e os da população norte em vermelho. O isolado recombinante BR-Mes5-16 está indicado em preto . . . . . 36
- Figura 4 – Gráfico de barras gerado pela análise de estruturação de subpopulações no software STRUCTURE. As cores representam as subpopulações Sul (azul) e Norte (vermelho). Cada barra vertical representa um isolado viral cuja distribuição de cores é proporcional à estimativa de cada indivíduo pertencer a cada subpopulação . . . . . 37
- Figura 5 – Análise reticulada baseada no DNA-A de CnMLDV. Isolados da subpopulação Sul estão marcados em azul e da subpopulação Norte em vermelho. O isolado recombinante BR-Mes5-16 está indicado em preto . . . . . 41
- Figura 6 – Análise reticulada baseada para CnMLDV. A. Gene *CP*. B. Gene *Rep*. Isolados da subpopulação Sul estão marcados em azul e da subpopulação Norte em vermelho. O isolado recombinante BR-Mes5-16 está indicado em preto . . . . . 42
- Figura 7 – Árvores filogenéticas de inferência bayesiana com remoção de blocos recombinantes. A. Bloco da posição 330 a 888 deletado do alinhamento. B. Bloco da posição 1332 a 2538 deletado do alinhamento . . . . . 47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Isolados de CnMLDV utilizados neste trabalho . . . . .	32
Tabela 2 – Diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) de isolados de CnMLDV . . . . .	38
Tabela 3 – Sítios selecionados positiva e negativamente nos genes <i>CP</i> e <i>Rep</i> de CnMLDV . . . . .	39
Tabela 4 – Teste de neutralidade <i>D</i> de Tajima para as ORFs <i>CP</i> e <i>Rep</i> das subpopulações de CnMLDV . . . . .	40
Tabela 5 – Eventos de recombinação detectados entre os isolados de CnMLDV.	43
Tabela 6 – Eventos de recombinação detectados entre isolados de CnMLDV e begomovírus do Novo Mundo . . . . .	44

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1</b>	<b><i>Cnidoscolus urens</i> (L.) Arthur</b> .....	<b>12</b>
<b>2.2</b>	<b>A família <i>Geminiviridae</i></b> .....	<b>12</b>
<b>2.3</b>	<b>O gênero <i>Begomovirus</i></b> .....	<b>14</b>
2.2.1	Organização genômica e funções das proteínas dos begomovírus .....	16
2.2.2	Variabilidade e estrutura genética de populações de begomovírus .....	20
2.2.3	Satélites .....	22
2.2.4	Begomovírus em plantas não cultivadas .....	24
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>Coleta do material vegetal e extração de DNA</b> .....	<b>27</b>
<b>3.2</b>	<b>Clonagem e sequenciamento do genoma completo de begomovírus</b> ..	<b>27</b>
<b>3.3</b>	<b>Análise de sequências e demarcação de espécies</b> ..	<b>28</b>
<b>3.4</b>	<b>Alinhamento e análises filogenéticas</b> .....	<b>28</b>
<b>3.5</b>	<b>Estrutura genética e índices de variabilidade</b> .....	<b>29</b>
<b>3.6</b>	<b>Análise de seleção</b> .....	<b>30</b>
<b>3.7</b>	<b>Análise de recombinação</b> .....	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1</b>	<b>Conjunto de dados</b> .....	<b>31</b>
<b>4.2</b>	<b>Demarcação de espécies</b> .....	<b>31</b>
<b>4.3</b>	<b>Análise filogenética</b> .....	<b>35</b>
<b>4.4</b>	<b>Estrutura genética e índices de variabilidade</b> .....	<b>35</b>
<b>4.5</b>	<b>Análise de seleção</b> .....	<b>38</b>
<b>4.6</b>	<b>Análise de recombinação</b> .....	<b>40</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>52</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>53</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A família *Geminiviridae* é composta por vírus de genoma de DNA circular de fita simples (~2,6-5,2 kb) encapsidados em partículas geminadas quasi-icosaédricas (BROWN et al., 2015; GILBERTSON et al., 2015). A família é dividida em sete gêneros (*Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* and *Turncurtovirus*), classificados de acordo com o tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros, organização genômica e relacionamento filogenético (VARSANI et al., 2017; ZERBINI et al., 2017). Nos últimos 20 anos, emergiram como o grupo de vírus de plantas com maior número de espécies descritas, e causando prejuízos em diversas culturas de importância econômica em todo o mundo (GILBERTSON et al., 2015; INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016).

O gênero *Begomovirus* possui atualmente 322 espécies reconhecidas pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV* (<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>), sendo o mais diverso de toda taxonomia viral (BROWN et al., 2015). O genoma dos begomovírus pode ser composto por um (monopartidos) ou dois (bipartidos) componentes genômicos conhecidos como DNA-A e DNA-B. No caso dos begomovírus bipartidos, ambos os componentes genômicos são necessários para que ocorra infecção sistêmica da planta hospedeira (BROWN et al., 2012; 2015).

Os begomovírus são transmitidos pelo grupo de espécies crípticas de mosca-branca do complexo *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) e infectam uma ampla gama de hospedeiras dicotiledôneas, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (MORALES; ANDERSON, 2001; NAVAS-CASTILLO; FIALLO-OLIVÉ; SÁNCHEZ-CAMPOS, 2011; BROWN et al., 2015). Além de espécies cultivadas, os begomovírus infectam plantas silvestres/daninhas em diferentes famílias botânicas (MORALES; ANDERSON, 2001). Essas plantas podem servir como hospedeiras alternativas/reservatórios para vírus provenientes de hospedeiras cultivadas (ALABI et al., 2008; BARBOSA et al., 2009; BARRETO et al., 2013; ROCHA et al., 2013), evitando-se assim a extinção da população viral na ausência da espécie cultivada. Além disso, alguns vírus detectados originalmente em plantas silvestres são capazes de infectar plantas cultivadas (IDRIS et al., 1999; BARRETO et al., 2013; LIMA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Infecções mistas são comuns entre os begomovírus, o que possibilita a ocorrência de recombinação e

pseudorecombinação entre espécies e estirpes distintas, portanto contribuindo para a evolução desses vírus (SEAL; VAN DEN BOSCH; JEGER, 2006; ALABI et al., 2008; GARCÍA-ANDRÉS et al., 2006; MONDE et al., 2010; ROCHA et al., 2013; STEWART et al., 2014; VAGHI MEDINA; MARTIN; LÓPEZ LAMBERTINI, 2015).

Diversas espécies de begomovírus têm sido relatadas infectando hospedeiras não-cultivadas dentro da família botânica Euphorbiaceae: *Euphorbia mosaic virus* (EuMV; HERNÁNDEZ-ZEPEDA et al., 2007), *Croton yellow vein virus* (CYVV; HUSSAIN et al., 2011), *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV; FERNANDES et al., 2011), *Dalechampia chlorotic mosaic virus* (DCMV; FIALLO-OLIVÉ et al., 2013), *Jatropha mosaic virus* (JMV; SIMMONDS-GORDON et al., 2014), e *Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus* (CnMLDV; MELO et al., 2016). Apesar dessa crescente diversidade de espécies, poucos estudos avaliando a variabilidade e estrutura genética de populações desses begomovírus têm sido realizados (LEMOS, 2013; MELO, 2015; NASCIMENTO, 2015). É amplamente conhecido que a diversidade genética de begomovírus infectando plantas cultivadas e/ou não-cultivadas no Brasil é alta (AMBROZEVICIUS et al., 2002; CALEGARIO et al., 2007; CASTILLO-URQUIZA et al., 2008; LIMA et al., 2013; ROCHA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014; FERRO, C. et al., 2017), e que populações desses vírus apresentam estruturação biogeográfica (ROCHA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014), com as subpopulações infectando predominantemente hospedeiros silvestres exibindo maior variabilidade (SILVA et al., 2012; GONZÁLEZ-AGUILERA et al., 2012; LIMA et al., 2013; ROCHA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014; FERRO, M. et al., 2017).

Estudos sobre a diversidade e estrutura genética de populações de begomovírus têm ajudado a entender as forças evolutivas atuando sobre esses patógenos em condições de campo (PRASANNA et al., 2010; GONZÁLEZ-AGUILERA et al., 2012; SILVA et al., 2012; LIMA et al., 2013; ROCHA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014; FERRO, M. et al., 2017), e tais informações podem ser úteis para o desenvolvimento de estratégias de manejo voltadas para a obtenção de plantas resistentes (GONZÁLEZ-AGUILERA et al., 2012). Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a variabilidade e estrutura genética de populações de CnMLDV infectando a euforbiácea *Cnidoscolus urens* (L.) Arthur (cansanção) no estado de Alagoas, bem como estimar as forças evolutivas que atuam sobre esse begomovírus.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Cnidoscolus urens* (L.) Arthur

O gênero *Cnidoscolus* Pohl (Euphorbiaceae) é constituído por cerca de 50 espécies, todas facilmente reconhecidas pelos seus tricomas urticantes (BURGER; HUFT, 1995). São plantas endêmicas do Novo Mundo, encontradas principalmente no México e região Nordeste do Brasil (WEBSTER, 1994; BURGER; HUFT, 1995; MELO; SALES, 2008). No Brasil, ocorrem cerca de 18 espécies (aproximadamente dez espécies já foram relatadas no Nordeste) (MELO; SALES, 2008). Entretanto, apesar desta alta diversidade, o gênero é pouco estudado no país.

*Cnidoscolus urens* (cansanção, urtiga-cansanção) é a espécie dentro do gênero mais amplamente distribuída, ocorrendo desde o Leste do México até a Argentina (BURGER; HUFT, 1995; MELO; SALES, 2008). No Brasil, *C. urens* já foi relatada nas regiões Nordeste (exceto nos Estados do Ceará e Maranhão), Sudeste (exceto São Paulo), e no Distrito Federal (MELO; SALES, 2008). A planta de cansanção possui tricomas urticantes por quase todas as suas partes vegetativas e florais. Quando introduzidos no corpo humano, liberam uma substância que provoca fortes dores, urticárias e até inchaços, palpitações e desmaio (LUTZ, 1914; MELO, 2008).

Plantas silvestres/não-cultivadas são amplamente conhecidas por serem hospedeiras de fitovírus, incluindo os begomovírus (SILVA et al., 2012; LIMA et al., 2013; ROCHA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014; FERRO, C. et al., 2017). Infecção de *C. urens* por begomovírus foi relatada há mais de dez anos (ASSUNÇÃO et al., 2006), porém só recentemente foi publicado o primeiro genoma completo de um begomovírus ocorrendo naturalmente neste hospedeiro, o qual foi identificado como *Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus* (CnMLDV; MELO, 2016).

### 2.2 A família *Geminiviridae*

A família *Geminiviridae* é constituída por sete gêneros (*Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus*) que se diferenciam pelo tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros, organização genômica e relacionamento filogenético (BROWN et al., 2012; VARSANI et al.,

2014). Os geminivírus possuem genoma de DNA circular de fita simples (ssDNA), com tamanho variando entre 2,6 a 5,2 kb, e encapsidado em partículas geminadas quasi-icosaédricas (junção de dois icosaedros incompletos,  $T = 1$ ) (BROWN et al., 2012; 2015). Com exceção do gênero *Begomovirus*, que pode ter integrantes mono ou bipartidos, todos os demais representantes da família são monopartidos (BROWN et al., 2012). Cada partícula geminada possui uma única molécula de ssDNA, e no caso dos *Begomovirus* bipartidos, dois vírions contendo os diferentes componentes genômicos (DNA-A e DNA-B) são necessários para o estabelecimento da infecção sistêmica da planta hospedeira (BROWN et al., 2012; 2015).

Os geminivírus são geralmente transmitidos por insetos vetores, e emergiram como o maior (em número de espécies) grupo de vírus de plantas nos últimos 20 anos, sendo capazes de infectar espécies cultivadas de grande importância econômica em todo o mundo (INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016). Além de plantas cultivadas, os geminivírus infectam plantas ornamentais e daninhas/silvestres (HANLEY-BOWDOIN et al., 2013). Algumas doenças induzidas por esses fitovírus causam grandes prejuízos na agricultura: os begomovírus *Bean golden mosaic virus* (BGMV) e *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) infectando feijões nas Américas; *Beet curly top virus* (BCTV; *Curtovirus*) infectando beterraba açucareira na América do Norte e Oriente Médio; *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV; *Begomovirus*) infectando tomates em todo o mundo; *African cassava mosaic virus* (ACMV; *Begomovirus*) infectando mandioca, *Maize streak virus* (MSV; *Mastrevirus*) infectando milho na África; e *Cotton leaf curl virus* (CLCuV; *Begomovirus*) infectando algodão na Ásia (HANLEY-BOWDOIN et al., 2013; INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016), com algumas espécies sendo capazes de provocar perdas de até 100% (LEGG; FAUQUET, 2004; SHEPHERD et al., 2010; SATTAR et al., 2013).

Alguns vírus com características de geminivírus foram relatados recentemente, porém são altamente divergentes dos gêneros até então descritos para esta família: *Citrus chlorotic dwarf-associated virus* (CCDaV) na Turquia (LOCONSOLE et al., 2012); *Euphorbia caput-medusae latent virus* (EcmLV) na África do Sul (BERNARDO et al., 2013); *French bean severe leaf curl virus* (FbSLCV) na Índia (não publicado); *Grapevine red blotch associated virus* (GRBaV) nos Estados Unidos (AL RWAHNIH et al., 2013); *Alfafa leaf curl virus* (ALCV) na França (ROUMANGNAC et al., 2015); *Temperate fruit decay-associated virus*

(TFDaV) no Brasil (BASSO et al., 2015); *Apple geminivirus* (AGV; LIANG et al., 2015) e *Mulberry mosaic dwarf-associated virus* (MMDaV; MA et al., 2015) na China. Para EcMLV, FbSLCV e ALCV, o gênero *Capulavirus* (*Euphorbia caput-medusae latente virus*) foi proposto (BERNARDO et al., 2013; ROUMANGNAC et al., 2015). Foi proposto ainda que algumas dessas espécies divergentes infectando videira (KRENZ et al., 2012; AL RWAHNIH et al., 2013; POOJARI et al., 2013) sejam classificadas como uma única espécie, *Grapevine redleaf-associated virus* (GRLaV), dentro do possível novo gênero *Graingemvirus* (*grapevine-infecting geminivirus*) (POOJARI et al., 2013). Com a era da metagenômica, e a crescente diversidade viral, é provável que novas ordens, famílias e gêneros de vírus sejam criados num futuro próximo (SIMMONDS et al., 2017).

### 2.3 O gênero *Begomovirus*

Apesar da diversidade geral que a família *Geminiviridae* apresenta, o gênero *Begomovirus* é incomparavelmente o maior em número de espécies (NAVAS-CASTILLO; FIALLO-OLIVÉ; SÁNCHEZ-CAMPOS, 2011), com 322 atualmente reconhecidas pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* – ICTV (<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>), sendo o gênero mais diverso de toda taxonomia viral (BROWN et al., 2015).

Begomovírus são capazes de infectar uma ampla gama de plantas dicotiledôneas e são transmitidos por insetos do grupo de espécies crípticas *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) (BROWN et al., 2012; 2015), constituindo um grupo de vírus de grande importância econômica em regiões tropicais e subtropicais (MORALES; ANDERSON, 2001; NAVAS-CASTILLO; FIALLO-OLIVÉ; SÁNCHEZ-CAMPOS, 2011; BROWN et al., 2015). Nos últimos 20 anos, tem sido observada uma rápida expansão/disseminação de begomovírus em todas as regiões do mundo, provocada principalmente pelo inseto vetor *B. tabaci* Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1; anteriormente conhecida como biótipo B) (NAVAS-CASTILLO; FIALLO-OLIVÉ; SÁNCHEZ-CAMPOS, 2011; GILBERTSON et al., 2015). Esta recente expansão na distribuição geográfica, incidência, diversidade de espécies, e importância econômica de espécies ainda não relatadas (e também de espécies já conhecidas), define os begomovírus como um grupo de fitovírus emergentes (GILBERTSON et al., 2015).

As perdas econômicas ocasionadas por begomovírus são difíceis de avaliar. Entretanto, é estimado que as perdas causadas por begomovírus associados ao mosaico da mandioca (*Cassava Mosaic Disease*) chegam a US\$ 2 bilhões por ano na África (PATIL; FAUQUET, 2009). No Brasil, é estimado que as begomoviroses causaram perdas de US\$ 5 bilhões no período de 1995 a 2000 (JESKE, 2009). O tomateiro e o feijoeiro são as principais culturas afetadas por begomovírus no Brasil, com perdas que podem chegar a 100% (LIMA; HAJI, 1998; MORALES; ANDERSON 2001). Para os feijões (*Phaseolus spp.*), perdas médias anuais de 20% têm sido estimadas (FARIA et al., 2014).

Diferentes sintomas como nanismo, deformação foliar, uma combinação de mosaico/mosqueado de verde-claro a amarelo-dourado, amarelecimento venal ou intervenal, e pontos amarelos nas folhas podem ser induzidos por begomovírus (INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016). Diferentes isolados de uma mesma espécie podem causar sintomas que variam significativamente, dependendo do background genético do hospedeiro, das condições ambientais e do estágio de crescimento e condições fisiológicas do hospedeiro no momento da infecção (PICÓ; DÍEZ; NUEZ, 1996).

A correta identificação de espécies de begomovírus requer o uso de técnicas moleculares como RCA (*rolling circle amplification*) e PCR (*polymerase chain reaction*), seguidos de sequenciamento (INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016). A amplificação por círculo rolante utiliza a DNA Polimerase do bacteriófago  $\Phi 29$ , e é capaz de amplificar DNA circular sem prévio conhecimento de sua sequência com o uso de primers randômicos (INOUE-NAGATA et al., 2004). Esta técnica simplificou e agilizou sobremaneira a amplificação e clonagem de genomas completos de novos begomovírus e outros geminivírus (frequentemente muito divergentes), possibilitando um aumento significativo no número de novas espécies descritas em hospedeiros cultivados e não-cultivados (BROWN et al., 2015). Recentemente, os critérios para demarcação de espécies dentro do gênero *Begomovirus* foram revisados (BROWN et al., 2015), ficando estabelecido o limiar (para identificação de espécies) de  $\geq 91\%$  de identidade para sequências nucleotídicas do DNA-A em comparações pareadas utilizando-se o programa *Sequence Demarcation Tool* (SDT; MUHIRE et al., 2014).

### 2.2.1 Organização genômica e funções das proteínas dos begomovírus

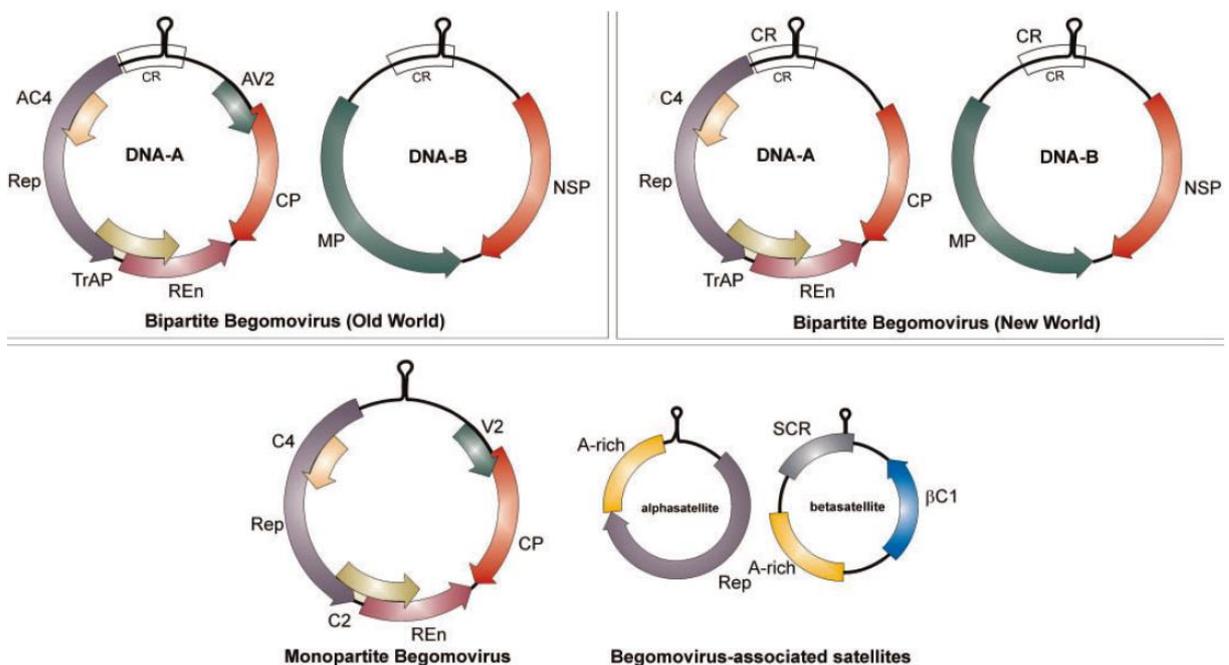
Os begomovírus podem ser mono (apenas um componente genômico) ou bipartidos (dois componentes genômicos conhecidos como DNA-A e DNA-B). Os componentes genômicos dos vírus bipartidos apresentam uma região conservada de aproximadamente 200 nucleotídeos (região comum) que abriga a origem de replicação (*ori*) numa estrutura em forma de grampo com o nonanucleotídeo conservado 5'-TAATATTAC-3' (JESKE, 2009; BROWN et al., 2012; BROWN et al., 2015).

Geograficamente, os begomovírus são separados em dois grandes grupos (provavelmente por consequência da deriva continental): Velho Mundo/Old World (VM/OW), que compreende África, Europa, Ásia e Austrália; e Novo Mundo/New World (NM/NW), compreendendo as Américas (GILBERTSON et al., 2015; INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016). Os begomovírus do VM são em sua maioria monopartidos, com alguns representantes bipartidos, e frequentemente associados a DNAs satélites; por sua vez, os begomovírus do NM são quase que exclusivamente bipartidos (BROWN et al., 2015; INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016). Os poucos begomovírus monopartidos nativos do NM são: *Tomato leaf deformation virus* (ToLDeV; SÁNCHEZ-CAMPOS et al., 2013; MELGAREJO et al., 2013); *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV); e *Tomato severe leaf curl virus* (ToSLCV; GILBERTSON et al., 2015).

O genoma dos begomovírus possui ORFs (*open reading frames*) que codificam proteínas multifuncionais. A multifuncionalidade de proteínas destaca a plasticidade através da qual a evolução junta diferentes domínios, aparentemente não relacionados, em uma única cadeia polipeptídica (WALSH; MOHR, 2006), o que, no caso dos geminivírus, acaba sendo uma compensação ao pequeno tamanho do genoma (FONDONG, 2013). É geralmente aceito que begomovírus possuem de seis a oito ORFs (Fig. 1), considerando que quatro estão no sentido complementar do DNA-A/genoma (bipartido/monopartido) [AC1/C1 (*replication initiator protein* ou *replication-associated protein* – Rep), AC2/C2 (*transcription activator protein* – TrAP), AC3/C3 (*replication enhancer protein* – RE<sub>n</sub>) e AC4/C4] e uma no sentido viral [V1 (*coat protein*)] (LI et al., 2015). De fato, este é o número de ORFs que revisões recentes abordam para begomovírus (FONDONG et al., 2013; HANLEY-BOWDOIN, 2013), porém, sequências codificantes da ORF AC5/C5 têm sido anotadas para

muitos begomovírus de maneira crescente (LI et al., 2015). O DNA genômico dos begomovírus monopartidos do VM possuem uma ORF adicional no sentido viral (V2) que codifica a PCP (*precoat protein*), a qual também está presente na maioria dos begomovírus bipartidos do VM (MELGAREJO et al., 2013). Além das ORFs, os begomovírus apresentam uma região intergênica (*intergenic region* – IR) onde estão localizados a origem de replicação e os promotores da RNA polimerase II do hospedeiro (um no sentido viral e outro no sentido complementar) (HANLEY-BOWDOIN et al., 2000; JESKE, 2009).

**Figura 1 – Organização genômica dos begomovírus.**



Fonte: Elaborada pelo autor da pesquisa, 2017 – Adaptado de SATTAR et al., 2013.

No início da infecção, o ssDNA viral é liberado do vírion. Através de mecanismos que dependem exclusivamente de proteínas do hospedeiro, primers de RNA são sintetizados e se anelam à fita simples de DNA viral iniciando a síntese de uma fita complementar pela DNA polimerase do hospedeiro (SAUNDERS; LUCY; STANLEY, 1992; HANLEY-BOWDOIN et al., 2013; BRIDDON, 2015). A molécula de dsDNA (dupla fita) resultante serve como molde para transcrição, permitindo a síntese da Rep (HANLEY-BOWDOIN et al., 2013). Esta proteína, produto da ORF AC1/C1, é a única proteína viral absolutamente necessária para a replicação e, apesar de não ter atividade de polimerase, estimula células já diferenciadas a entrar

na fase S para facilitar a replicação do DNA viral (JESKE, 2009; BRIDDON, 2015). A Rep se liga a sequências repetidas específicas da região intergênica chamadas de *iterons* e cliva a fita de DNA no nonanucleotídeo, entre os últimos T e A (5'-TAATATT//AC-3'), iniciando a replicação por círculo rolante (*rolling circle replication* – RCR) (FONTES; LUCKOW; HANLEY-BOWDOIN, 1992). A fita de ssDNA circular recém-sintetizada pode ser convertida em dsDNA para entrar num novo ciclo de replicação ou encapsidada em vírions após a síntese da proteína capsidial (HANLEY-BOWDOIN et al., 2013). A Rep ainda está ligada à regulação gênica, uma vez que sua ligação à origem de replicação reprime a expressão de genes no sentido complementar (incluindo sua própria expressão) (EAGLE et al., 1994), mas aparentemente não reprime a expressão de genes no sentido viral (SHIVAPRASAD et al., 2005). A TrAP, produto da ORF AC2/C2, por sua vez, atua como um fator de transcrição necessário para a expressão dos genes no sentido viral CP (AV1/V1) e NSP (*nuclear shuttle protein*; BV1) em begomovírus bipartidos (SUNTER; BISARO, 1992). Essa regulação de expressão mediada por Rep e TrAP sugere a existência de um mecanismo de controle temporal que permite trocar de expressão gênica inicial (sentido complementar) para expressão gênica tardia (sentido viral), sintetizando as proteínas necessárias no tempo apropriado durante a infecção (BRIDDON, 2015). A TrAP ainda está envolvida na supressão de silenciamento gênico transcricional (TGS) e pós-transcricional (PTGS) (VANITHARANI et al., 2004; WANG et al., 2005; RAJA et al., 2008).

O produto da ORF AC3/C3 (Ren) é uma proteína que, apesar de não ser essencial, está envolvida na replicação e interage com a Rep, aumentando a replicação e o acúmulo de DNA viral (SUNG; COUTTS, 1995; SUNTER et al., 1990). A AC4/C4 é uma ORF que está completamente contida na ORF Rep, porém numa fase de leitura diferente, sendo também a menos conservada entre os begomovírus (FONDONG, 2013). Seu produto é uma proteína supressora de PTGS (VANITHARANI et al., 2004), mas que em begomovírus monopartidos atua no movimento célula-à-célula em conjunto com outras proteínas como CP e V2 (ROJAS et al., 1998; ROJAS et al., 2001). A ORF AC5/C5 codifica uma proteína que aparentemente não tem papel essencial no ciclo da infecção viral para alguns begomovírus ou isolados virais (KHEYR-POUR et al., 2000; FONTENELLE et al., 2007; MELGAREJO et al., 2013), mas sua ausência em mutantes ocasionou sintomas menos severos (MELGAREJO et al., 2013). Um estudo mais detalhado

com o *Mungbean yellow mosaic India virus* (MYMIV; LI et al., 2015) revelou o papel multifuncional desta proteína, que pode atuar no desenvolvimento de sintomas, na supressão do TGS e do PTGS, e na indução de uma resposta similar a de hipersensibilidade (*hipersensitive-like response* – HLR).

No sentido viral, a ORF AV1/V1 codifica a proteína da capa proteica (CP), que além de formar o capsídeo viral, media a transmissão pelo inseto vetor (BRIDDON et al., 1990). A CP de begomovírus monopartidos também tem a função de transportar o DNA viral do núcleo para o citoplasma e do citoplasma para o núcleo (LIU et al., 1999), função exercida pela NSP de begomovírus bipartidos (NOUEIRY; LUCAS; GILBERTSON, 1994), além de atuar no movimento célula-à-célula e na infecção sistêmica do hospedeiro (BOULTON et al., 1989; LIU; BOULTON; DAVIES, 1997; PITAKSUTHEEPONG, 1999 *apud* FONDONG et al., 2013). A CP dos begomovírus se liga à proteína GroEL (sintetizada por endossimbiontes no intestino das moscas-brancas vetoras) e à proteína codificada pela própria mosca-branca HSP16 (*heat shock protein* 16; OHNESORGE; BEJARANO, 2009; RANA et al., 2012). Estas interações podem estabilizar o vírion durante a passagem pelo intestino e/ou facilitar sua transferência através do epitélio do intestino para a hemolinfa (HANLEY-BOWDOIN et al., 2013). As duas hipóteses são compatíveis com dados que mostram que diferentes isoformas de GroEL, sintetizadas por diferentes endossimbiontes, afetam a eficiência de transmissão (GOTLIEB et al., 2010; HANLEY-BOWDOIN et al., 2013).

A outra proteína sintetizada no sentido viral é a AV2/V2, que em begomovírus monopartidos do VM funciona como proteína do movimento (POORNIMA-PRIYADARSHINI et al., 2011). Além da função de movimento, a AV2/V2 também atua como proteína anti-defesa, inibindo o silenciamento gênico (CHOWDA-REDDY et al., 2008; ZHANG et al., 2012).

O DNA-B possui duas ORFs que codificam proteínas envolvidas no movimento do vírus. No sentido viral, a NSP é responsável pelo transporte do ssDNA ou dsDNA viral do núcleo para o citoplasma (NOUEIRY; LUCAS; GILBERTSON, 1994). A NSP se liga ao DNA viral formando o complexo NSP-ss/dsDNA, que é transportado para o citoplasma, onde interage com a MP, que direciona o complexo para a periferia da célula vegetal para ser transportado à célula adjacente (SANDERFOOT; LAZAROWITZ, 1995; 1996; SANDERFOOT; INGHAM; LAZAROWITZ, 1996).

No sentido complementar o DNA-B codifica a MP que é envolvida no transporte célula-à-célula através do mecanismo de aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas (NOUEIRY; LUCAS; GILBERTSON, 1994). A MP de *Squash leaf curl virus* (SqLCV) interage com o retículo endoplasmático de células procambiais (células vasculares imaturas) para formar túbulos que conectam uma célula a outra, sugerindo que o complexo NSP-ssDNA viral pode ser transportado através de tais estruturas (WARD et al., 1997).

### 2.2.2 Variabilidade e estrutura genética de populações de begomovírus

Vírus possuem um grande potencial para a geração de variação genética e rápida evolução por apresentarem alta taxa de replicação, curto período de geração e por constituírem grandes populações (DOMINGO; HOLLAND, 1997; ROOSSINCK, 1997; GARCÍA-ARENAL; FRAILE; MALPICA, 2001). Esta variação genética é gerada por erros durante a replicação dos genomas virais (mutação), e amplificada por recombinação, e no caso de vírus com mais de um componente genômico, pseudorrecombinação (GARCÍA-ARENAL; FRAILE; MALPICA, 2001; SEAL; VAN DEN BOSCH; JEGER, 2006).

Mutação é o processo pelo qual nucleotídeos que não estão presentes na fita molde são incorporados na nova fita durante a replicação do genoma (GARCÍA-ARENAL; FRAILE; MALPICA, 2001). Begomovírus replicam o seu ssDNA utilizando DNA polimerases do hospedeiro, que possuem mecanismos de correção de erro. Entretanto, apresentam taxas de mutação semelhantes às de vírus de RNA, cujas polimerases não possuem função de correção de erros (DUFFY; HOLMES, 2008; 2009). É sugerido que tais mecanismos de correção que atuam na replicação de DNA em eucariotos talvez não sejam tão eficientes no processo de replicação por círculo rolante e/ou na replicação de DNA de fita simples (VAN DER WALT et al., 2008).

A dinâmica mutacional é o fator primário na diversificação de populações virais (ROOSSINCK, 1997; GARCÍA-ARENAL et al., 2003), porém a recombinação pode ter uma contribuição significativa (MARTIN et al., 2011; LIMA et al., 2013). Recombinação é o processo pelo qual segmentos de informação genética de uma fita de ácidos nucléicos são incorporados à fita de outro indivíduo durante a replicação (GARCÍA-ARENAL; FRAILE; MALPICA, 2001; SEAL; VAN DEN BOSCH;

JEGER, 2006). Este processo facilita a transferência genética entre geminivírus, até mesmo entre espécies distantemente relacionadas, de tal maneira que se acredita que sua organização genômica evoluiu para maximizar seu valor adaptativo e minimizar efeitos deletérios (MARTIN et al., 2011). A alta frequência de recombinação que é observada em begomovírus pode ser parcialmente explicada pelo mecanismo de replicação dependente de recombinação (*recombination-dependent replication* – RDR) que ocorre nos begomovírus e nos DNAs satélites associados (JESKE; LUTGEMEIER; PREISS, 2001; ALBERTER et al., 2005). A função primária da recombinação poderia ser a de reparar defeitos no ssDNA viral gerados por mutações. Recombinantes que tivessem vantagem seletiva se tornariam mais prevalentes no campo (SEAL; VAN DEN BOSCH; JEGER, 2006).

Pseudorrecombinação é a troca de componentes genômicos inteiros entre vírus segmentados (GARCÍA-ARENAL; FRAILE; MALPICA, 2001). Em begomovírus, esses rearranjos entre DNA-A e DNA-B já foram relatados para vírus do NM e VM (GARRIDO-RAMIREZ et al., 2000; PITA et al., 2001; IDRIS et al., 2003; RAMOS et al., 2003). Este fenômeno foi primeiramente observado experimentalmente (STANLEY; TOWNSEND; CURSON, 1985), mas também ocorre naturalmente (PAPLOMATAS et al., 1994). É mais comum que ocorra entre estirpes diferentes de uma mesma espécie (FARIA et al., 1994; PITA et al., 2001), mas também ocorre entre espécies distintas (GILBERTSON et al., 1993; ANDRADE et al., 2006). Pseudorecombinantes infecciosos entre o DNA-A do *Chino del tomate virus* (CdTV) e o DNA-B do BGYMV foram obtidos mesmo havendo uma baixa identidade de sequência da região comum (68%), porém o pseudorecombinante recíproco (DNA-B de CdTV e DNA-A de BGYMV) não foi infeccioso quando inoculado em feijoeiro (GARRIDO-RAMIREZ et al., 2000). Essa assimetria entre a viabilidade de pseudorrecombinantes recíprocos indica que este é um fenômeno complexo e que envolve fatores dos vírus e também do hospedeiro (HILL et al., 1998).

A estrutura genética de populações de vírus de plantas é entendida como a quantidade e a distribuição da variabilidade genética dentro e entre subpopulações. A distribuição da variação gerada por mutação, recombinação e pseudorrecombinação nas populações virais depende de dois principais processos evolutivos: deriva genética e seleção (GARCÍA-ARENAL; FRAILE; MALPICA, 2001). Os efeitos destes dois processos dependem de fatores ecológicos/ambientais como: tamanho e fragmentação da população, taxa de transmissão, distribuição do vetor e

do hospedeiro (FONT et al; 2007). Deriva genética ocorre quando as populações dos organismos não são grandes o suficiente para garantir que cada variante dentro delas tenha representação na próxima geração, de maneira que efeitos estocásticos ocorreriam durante a transmissão de características genéticas para as próximas gerações. Por outro lado, seleção é um processo direcional pelo qual variantes com maior adaptabilidade aumentam suas frequências na população (seleção positiva), enquanto que variantes com menor adaptabilidade teriam suas frequências diminuídas (seleção negativa ou purificadora) nas gerações seguintes (GARCÍA-ARENAL; FRAILE; MALPICA, 2001).

### 2.2.3 Satélites

Satélites são agentes subvirais que não possuem genes que codifiquem funções necessárias para a sua replicação e dependem de um vírus auxiliar coinfectando uma célula hospedeira para poderem se multiplicar. São divididos em duas classes: 1) vírus satélites, que codificam uma proteína estrutural que encapsida seu genoma; 2) ácidos nucleicos satélites (DNA ou RNA), que não codificam nenhuma proteína ou apenas proteínas que não sejam estruturais (BRIDDON et al., 2012; LOZANO et al., 2016). Begomovírus, principalmente os monopartidos do VM, são frequentemente associados a DNAs satélites de duas classes: alfassatélites (que são normalmente encontrados em associação com um complexo betassatélite-begomovírus) e betassatélites (BRIDDON et al., 2012; ZHOU et al., 2013; LOZANO et al., 2016; ROSARIO et al., 2016).

Alfassatélites (anteriormente conhecidos como DNA-1) são moléculas com tamanho aproximado de 1400 nucleotídeos (aproximadamente metade do genoma/componente genômico de seu vírus auxiliar) que codificam uma proteína (*Replication-associated protein*, Rep) responsável por iniciar a replicação, independentemente do vírus auxiliar. Sendo assim, tais moléculas não são consideradas satélites num senso estrito, apesar de continuarem dependendo do vírus auxiliar para encapsidação, movimento na planta e transmissão pelo inseto vetor (BRIDDON; STANLEY, 2006; BRIDDON et al., 2012; ZHOU et al., 2013; LOZANO et al., 2016; ROSARIO et al., 2016). Alfassatélites são semelhantes aos componentes genômicos que codificam a Rep (DNA-R) dos nanovírus (*Nanoviridae*), além de compartilharem o mesmo nonanucleotídeo 5'-TAGTATTAC-3', sugerindo

que estas moléculas evoluíram a partir deste grupo de vírus (BRIDDON et al., 2004; BRIDDON; STANLEY, 2006; BRIDDON et al., 2012; ZHOU et al., 2013). A associação de alfassatélites com begomovírus (com ou sem betassatélites) não apresenta uma relação direta com o desenvolvimento de sintomas na planta hospedeira, porém, em alguns casos pode resultar na atenuação dos sintomas (ZHOU et al., 2013).

Betassatélites (anteriormente conhecidos por DNA- $\beta$ ) possuem tamanho aproximado de 1300-1350 nucleotídeos e apresentam uma ORF que codifica a proteína  $\beta$ C1, de caráter multifuncional. Essa proteína atua na supressão de TGS e PTGS e na repressão de outras respostas de defesa da planta, resultando comumente em aumento da severidade dos sintomas da doença (em alguns casos são até indispensáveis para o desenvolvimento dos sintomas virais típicos em plantas hospedeiras, sendo consideradas fatores de patogenicidade) (ZHOU et al., 2013; ROSARIO et al., 2016). Betassatélite não possuem similaridade de sequência com o vírus auxiliar, exceto pelo nonanucleotídeo conservado 5'-TAATATTAC-3', nem com alfassatélites, exceto por uma região rica em adenina (HUANG et al., 2013; LOZANO et al., 2016).

As primeiras associações begomovírus-satélite no Brasil foram relatadas em 2010 para *Cleome leaf crumple virus* (CILCrV) e *Euphorbia mosaic virus* (EuMV) (PAPROTKA; METZLER; JESKE, 2010). No mesmo ano, um satélite foi detectado em associação com *Melon chlorotic mosaic virus* (MeCMV) na Venezuela (ROMAY et al., 2010). Recentemente, alguns satélites foram detectados em mosca-branca com a abordagem VEM (*vector enabled metagenomics*) na Guatemala e em Porto Rico (ROSARIO et al., 2016). Todos estes relatos foram de associações entre begomovírus e alfassatélites, e sugerem que a distribuição destas moléculas estão bem difundidas pelo continente americano (ROSARIO et al., 2016). Até a presente data, nenhum betassatélite foi detectado em associação com vírus nativos do NM, apesar das tentativas de detecção direcionadas especificamente para estas moléculas enquanto se investigava alfassatélites (ROMAY et al., 2010; ROSARIO et al., 2016).

Uma nova classe de DNAs satélites foi identificada associada a begomovírus infectando malváceas em Cuba (FIALLO-OLIVÉ et al., 2012). Satélites semelhantes haviam sido detectados usando a abordagem VEM em adultos de moscas-brancas na Flórida (EUA) (NG et al., 2011), mas sua estrutura genômica

não foi descrita em detalhes (FIALLO-OLIVÉ et al., 2012). LOZANO e colaboradores (2016) propõem o nome de deltassatélites para a classe e incluem nela, além dos satélites cubanos (que juntamente com os satélites da Flórida são chamados de deltassatélites do NM) (FIALLO-OLIVÉ et al., 2012), os DNAs satélites associados a sweepovírus infectando *Ipomoea* spp. na Espanha (LOZANO et al., 2016) e demais deltassatélites [ToLCV-Sat, primeiro DNA satélite associado ao begomovírus *Tomato leaf curl virus* (DRY et al., 1997); o satélite associado a *Sweet potato leaf curl virus* infectando *Merremia dissecta* (LOZANO et al., 2016)].

Rosario e colaboradores (2016) expandiram o conhecimento sobre essa nova classe utilizando a abordagem VEM e detectaram satélites muito relacionados com aqueles associados a begomovírus de *Ipomoea* spp. (LOZANO et al., 2016). Além disso, os autores propuseram para essa mesma classe o nome de gammassatélites, apesar de parecer que o termo deltassatélites tende a ser mais aceito, uma vez que outras publicações já usaram tal termo (FIALLO-OLIVÉ; TOVAR; NAVÁS-CASTILLO, 2016; HASSAN et al., 2016).

#### 2.2.4 Begomovírus em plantas não cultivadas

Várias espécies de plantas não-cultivadas de diferentes famílias botânicas têm sido relatadas como hospedeiras de begomovírus em todo o mundo (AMBROZEVICIUS et al., 2002; IDRIS et al., 2003; JOVEL et al., 2004; AMARAKOON et al., 2008; CASTILLO-URQUIZA et al., 2008; FIALLO-OLIVÉ et al., 2012; SILVA et al., 2012; STEWART et al., 2014; KUMAR et al., 2016; ROMAY et al., 2016), com algumas destas espécies virais sendo capazes de infectar plantas cultivadas (IDRIS et al., 1999; FERNANDES et al., 2009; FERNANDES et al., 2011; BARBOSA et al., 2012; BARRETO et al., 2013; LIMA et al., 2013; ROCHA et al., 2013; FERNANDES et al., 2014; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Além disso, alguns begomovírus afetando culturas de importância econômica podem infectar alternativamente hospedeiros silvestres, as quais servem como reservatórios virais, prevenindo extinções locais desses vírus na ausência do hospedeiro cultivado (BRACERO, 2003; ALABI et al., 2008; BARBOSA et al., 2009; ROCHA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014).

Diante da grande diversidade de espécies de begomovírus que podem infectar plantas não-cultivadas, é comum a ocorrência de infecções mistas (ALABI et

al., 2008; GARCÍA-ANDRÉS et al., 2006; MONDE et al., 2010; STEWART et al., 2014), o que amplia as oportunidades de recombinação entre espécies próximas ou mesmo distantemente relacionadas (GARCÍA-ANDRÉS et al., 2006; SEAL; VAN DEN BOSCH; JEGER, 2006; LIMA et al.; 2013; RAMOS-SOBRINHO, et al. 2014; STEWART et al., 2014.). A infecção por begomovírus recombinantes naturais tem sido a causa de doenças de grande severidade e impacto econômico em mandioca na África Oriental (ZHOU et al., 1997; PITA et al., 2001), em tomate na Espanha (MONCI et al., 2002; GARCÍA-ANDRÉS et al., 2006; GARCÍA-ANDRÉS et al., 2007a; GARCÍA-ANDRÉS et al., 2007b), e em algodão e quiabo no Paquistão (ZHOU et al., 1998; IDRIS; BROWN, 2002; BRIDDON et al., 2014).

Plantas não-cultivadas da família Euphorbiaceae têm sido relatadas como hospedeiras naturais de begomovírus há bastante tempo. Na década de 1930, *Jatropha gossypifolia* L. foi descrita como hospedeira de begomovírus (COOK, 1931 *apud* SIMMONDS-GORDON, 2014). No Brasil, um begomovírus causando mosaico em *Euphorbia heterophylla* L. (syn. *Euphorbia prunifolia*) foi relatado em 1950 (COSTA; BENNET, 1950), e provavelmente corresponde a *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV), o primeiro begomovírus de euforbiáceas completamente caracterizado no país (FERNANDES et al., 2011). Com o passar dos anos, diversas espécies têm sido descritas infectando principalmente *J. gossypifolia* (ROYES; COLLINS; MAXWEL, 2006; SNEHI et al, 2011a; 2011b), *Croton bonplandianus* Baill (AMIN et al., 2002; HUSSAIN et al., 2011) e *Euphorbia* spp. (MA et al., 2004; HERNÁNDEZ-ZEPEDA et al., 2007; FERNANDES et al., 2011). Em 2016, uma nova espécie foi descrita infectando *Cnidioscolus urens* (CnMLDV; MELO et al., 2016) ampliando a gama de hospedeiras euforbiáceas para esse grupo de vírus.

No continente africano, a cultura de base alimentar mais importante é a mandioca (*Manihotis esculenta* L.; Euphorbiaceae), e o principal fator limitante à sua produção é um complexo de espécies de begomovírus (*cassava mosaic begomoviruses* – CMBs) que causam epidemias em praticamente todos os países africanos produtores (LEGG; FAUQUET, 2004; ALABI; KUMAR; NAIDU, 2011). Acredita-se que estes vírus sejam nativos da África e que infectavam originalmente plantas indígenas antes da introdução da mandioca no continente (PATIL; FAUQUET, 2009; ALABI; KUMAR; NAIDU, 2011). Apesar de não haver provas diretas confirmando que os CMBs sejam originados de plantas daninhas (FAUQUET; FARGETTE, 1990; LEGG; FAUQUET, 2004), de fato, este salto de

hospedeiro de plantas nativas para plantas introduzidas/exóticas já foi relatado para outras culturas na África (THRESH; FARGETTE, 2003).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta do material vegetal e extração de DNA

Amostras foliares de *Cnidoscolus urens* apresentando sintomas indicativos de infecção por begomovírus como mosaico, mosqueado, amarelecimento e deformação foliar foram coletadas em diferentes localidades do Estado de Alagoas (AL) em 2015 e 2016. O material vegetal foi armazenado na forma de exsiccatas ou congelado em ultrafreezer a -80 °C no Laboratório de Fitopatologia Molecular e Virologia Vegetal (LFMVV) do Centro de Ciências Agrárias (CECA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). DNA total foi extraído a partir das amostras vegetais ainda frescas, herborizadas ou congeladas segundo protocolo de Doyle & Doyle (1987).

#### 3.2 Clonagem e sequenciamento do genoma completo de begomovírus

As etapas de clonagem foram realizadas no Laboratório de Virologia Vegetal Molecular (LVVM) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Estado de Minas Gerais.

O DNA total obtido a partir de cada amostra vegetal foi utilizado como molde para amplificação por círculo rolante (RCA) com o uso da enzima  $\Phi$ 29 DNA Polimerase (INOUE-NAGATA et al., 2004). Alíquotas dos produtos de RCA foram submetidas, individualmente, a digestão com endonucleases de restrição (*Apal*, *KpnI*, ou *SacI*) e posterior análise por eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídeo (5  $\mu$ g/mL) e visualizado sob luz ultravioleta. Produtos das digestões que resultaram em fragmentos de ~2,6 kb (correspondentes a uma cópia completa de cada componente genômico de begomovírus típicos do NM) foram ligados ao vetor plasmidial pBluescript KS+ (Stratagene) previamente linearizado com a mesma enzima, defosforilado e purificado com o kit *illustra*<sup>®</sup> *GFX*<sup>®</sup> *PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare). As ligações (vetor plasmidial + inserto viral) foram utilizadas para transformação de células ultracompetentes de *Escherichia coli* estirpe DH5 $\alpha$  por eletroporação utilizando-se o equipamento Gene Pulser Xcell<sup>®</sup> (BioRad). Após incubação em placas de Petri contendo meio LB (Luria-Bertani), ampicilina e X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) por 16h a 37°C, colônias brancas, que possivelmente continham o plasmídeo

recombinante, foram selecionadas e repicadas para meio LB líquido com ampicilina e incubadas por 16h a 37 °C sob agitação orbital a 200 rpm. Posteriormente, foi realizada extração de DNA plasmidial das culturas com os kits *illustra*<sup>®</sup> *plasmidPrep Mini Spin* (GE Healthcare) ou *Wizard*<sup>®</sup> *Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega). A clonagem foi confirmada através do padrão eletroforético do DNA plasmidial digerido com a enzima utilizada para clonagem. Alíquotas dos minipreps dos clones confirmados foram submetidas a digestão com a enzima *HaeIII* para seleção dos clones que foram enviados para sequenciamento por *primer walking* na Macrogen, Inc. (Coréia do Sul).

### 3.3 Análise de sequências e demarcação de espécies

As sequências completas do DNA-A foram montadas utilizando o programa *CodonCode Aligner* v.6.0.2 ([www.codoncode.com](http://www.codoncode.com)) e organizadas para iniciar no ponto de clivagem do nonanucleotídeo conservado (5'-TAATATT//AC-3'). Cada sequência foi analisada no ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) para verificar as ORFs presentes neste componente genômico. As sequências obtidas foram inicialmente analisadas com o algoritmo BLAST $n$  (ALTSCHUL et al., 1990) e o banco de dados de nucleotídeos não-redundante GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)) para determinar as espécies virais com as quais elas compartilham maior identidade de sequência. Além das sequências geradas a partir das amostras coletadas neste trabalho, foram utilizadas sequências de CnMLDV obtidas por MELO (2015) e MELO et al. (2016). Comparações pareadas foram realizadas para o conjunto de dados de DNA-A utilizando-se o programa *Sequence Demarcation Tool* (SDT) v.1.2 (MUHIRE et al., 2014). Para correta taxonomia dos novos isolados virais, foi utilizado o critério de identidade  $\geq 91\%$  para sequências completas de DNA-A, estabelecido pelo *Geminiviridae Study Group* do *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) para demarcação de espécies dentro do gênero *Begomovirus* (BROWN et al., 2015).

### 3.4 Alinhamento e análises filogenéticas

Alinhamentos múltiplos das sequências nucleotídicas foram preparados através do algoritmo MUSCLE implementado no pacote MEGA6 (TAMURA et al., 2013) e ajustados manualmente. Árvores filogenéticas para os conjuntos de dados

DNA-A, CP e Rep, além do DNA-A sem os blocos recombinantes detectados em CP e Rep foram construídas utilizando-se o método de Inferência Bayesiana com a software MrBayes (RONQUIST et al., 2012) v.3.2.6 disponibilizado no web-portal CIPRES (MILLER et al., 2010). Os genes *CP* e *Rep* representam cerca de 70% do DNA-A e são essenciais para transmissão pelo inseto vetor e replicação viral. Os modelos de substituição de nucleotídeos e distribuição de heterogeneidade foram escolhidos com o auxílio dos programas PAUP v.4.0b10 (SWOFFORD, 2003) e MrModelTest2 v.2.3 (NYLANDER, 2004), sendo GTR+I+G o melhor modelo para todos os conjuntos de dados. As análises foram rodadas por 10 milhões de gerações com amostragem a cada 1000 passos, totalizando 10.000 árvores, com as 2.500 primeiras sendo descartadas como uma fase de *burn-in*. Probabilidades posteriores (RANNALA; YANG, 1996) foram determinadas a partir de uma árvore consenso *majority-rule* gerada com as 7.500 árvores remanescentes. As árvores foram visualizadas e editadas nos programas FigTree v.1.4 ([ztree.bio.ed.ac.uk/software/figtree](http://ztree.bio.ed.ac.uk/software/figtree)) (RAMBAUT, 2014) e Inkscape (<https://inkscape.org/pt/>).

### 3.5 Estrutura genética e índices de variabilidade

A estrutura genética de populações para os isolados de CnMLDV foi analisada utilizando o software STRUCTURE v.2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000). O modelo de ancestralidade escolhido foi o *Admixture Model* com frequências alélicas independentes entre as populações. Foram determinadas 10.000 iterações de *burn-in* e 1.000.000 de iterações após o *burn-in*. O número de populações (K) testadas variou de um a dez, sendo dez corridas para cada K avaliado. O valor de  $\Delta K$  (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005) foi calculado no web-site/programa Structure Harvester v.0.6.94 (EARL; VONHOLDT, 2012). Partindo dos resultados obtidos com o STRUCTURE, a estrutura de subpopulações foi testada para DNA-A e genes *CP* e *Rep* através do cálculo do índice de fixação F de Wright ( $F_{ST}$ ; WRIGHT, 1951) no programa DnaSP v.5.10 (ROZAS et al., 2003). O DnaSP foi ainda utilizado para estimar a variabilidade genética de CnMLDV através da média do número de diferenças de nucleotídeos por sítio (diversidade nucleotídica,  $\pi$ ; NEI, 1987) para os conjuntos de dados DNA-A, CP e Rep da população total e das subpopulações.

### 3.6 Análise de seleção

Para detectar evidências de seleção, os conjuntos de dados CP e Rep foram analisados com o uso de dois diferentes métodos baseados em máxima verossimilhança (ML) disponíveis no servidor DataMonkey ([www.datamonkey.org](http://www.datamonkey.org)): *Single-Likelihood Ancestor Counting* (SLAC), *Fixed-Effect Likelihood* (FEL) (KOSAKOVSKY-POND; FROST, 2005; SCHEFFLER et al., 2006). SLAC e FEL indicam sítios (aminoácidos) sob pressão de seleção positiva ou negativa. Para evitar erros na obtenção dos resultados, apenas grupos de sequências predominantemente não-recombinantes detectados pelo *Genetic Algorithm Recombination Detection* (GARD; KOSAKOVSKY-POND; FROST, 2005) foram utilizados nas análises. O SLAC foi ainda utilizado para estimar a média da razão entre as taxas de substituições não-sinônimas (por sítio não-sinônimo) e sinônimas (por sítio-sinônimo),  $dN/dS$ , para CP e Rep com base nas árvores filogenéticas inferidas pelo GARD. Adicionalmente, foi realizado o teste estatístico  $D$  de Tajima (TAJIMA, 1989) no DnaSP. Este é um teste de neutralidade com o qual pode-se inferir sobre evidências de seleção natural ou de eventos demográficos ocorrendo nas subpopulações.

### 3.7 Análise de recombinação

A análise de recombinação foi realizada considerando dois conjuntos de dados: sequências de CnMLDV; e sequências de CnMLDV + 122 sequências de diferentes espécies de begomovírus do NM. Possíveis sequências parentais e pontos (*breakpoints*) de recombinação foram determinados utilizando-se os métodos RDP, Geneconv, Bootscan, Maximum Chi Square, Chimaera, SisterScan e 3Seq implementados no pacote RDP4 (MARTIN et al., 2015). Os alinhamentos foram analisados com configurações padrão para os diferentes métodos e a significância estatística foi inferida por um valor  $P$  menor que o valor de corte de *Bonferroni* corrigido de 0,05. Apenas eventos de recombinação detectados por pelo menos quatro diferentes métodos foram considerados confiáveis. As evidências de evolução em rede foram avaliadas com o método Neighbor-Net implementado no programa SplitsTree v.4.10 (HUSON; BRYANT, 2006).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Conjunto de dados

Um total de 25 clones de DNA-A foram completamente sequenciados no presente trabalho. Adicionalmente, foram utilizadas 18 sequências de DNA-A obtidas por Melo (2015), totalizando 43 isolados. As sequências variaram entre 2641 a 2677 nt de comprimento, e a organização dos genes é típica de begomovírus do NM (Tabela 1). Curiosamente, todos os isolados provenientes de amostras coletadas no litoral Norte de AL apresentam uma ORF AC5 de 105 aa (aminoácidos), a qual não foi encontrada nos isolados provenientes de outras regiões do Estado, aqui denominadas como Sul de AL (Tabela 1).

### 4.2 Demarcação de espécies

Seguindo os critérios estabelecidos para demarcação de espécies dentro do gênero *Begomovirus* (BROWN et al., 2015), a análise de comparações pareadas de sequências nucleotídicas do DNA-A mostrou que todos os isolados pertencem a uma única espécie: *Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus* (CnMLDV). Entretanto, foi observada a formação de dois grupos de sequências bastante divergentes (Fig. 2). Desconsiderando o isolado recombinante BR-Mes5-16 (ver análise de recombinação abaixo), pode-se observar que os isolados presentes no litoral Norte (Municípios de Japaratinga, Paripueira e Porto de Pedras) são mais proximamente relacionados entre si, apresentando identidades de sequências variando entre 90,7-100%, enquanto os isolados provenientes de outras regiões do Estado (Municípios de Branquinha, Maceió, Marechal Deodoro e Messias) apresentaram identidades de sequências entre 89,5-99,9% entre si. Quando comparados isolados presentes nesses dois grupos principais, foi observado que as identidades de sequência variaram entre 87,2-91,5%.

Tabela 1 – Isolados de CnMLDV utilizados neste trabalho.

(continua)

Código da Amostra	Local de Coleta	Data de coleta	Isolado*	Tamanho do DNA-A	CP	Rep	TrAP	REn	AC4	AC5
182AL	Branquinha	Julho/2015	<b>BR-Bra1-15</b>	2642 nt	257 aa	357 aa	129 aa	132 aa	97 aa	-
186AL	Branquinha	Julho/2015	<b>BR-Bra2-15</b>	2641 nt	257 aa	357 aa	129 aa	132 aa	97 aa	-
195AL	Branquinha	Julho/2015	<b>BR-Bra3-15</b>	2642 nt	257 aa	357 aa	129 aa	132 aa	97 aa	-
4	Branquinha	Abril/2016	<b>BR-Bra4-16</b>	2641 nt	257 aa	357 aa	129 aa	132 aa	97 aa	-
5	Branquinha	Abril/2016	<b>BR-Bra5-16</b>	2641 nt	257 aa	357 aa	129 aa	132 aa	97 aa	-
7	Branquinha	Abril/2016	<b>BR-Bra6-16</b>	2662 nt	257 aa	357 aa	129 aa	132 aa	97 aa	-
C33	Maceió	Maio/2015	BR-Mac2-15A	2676 nt	257 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	-
C01	Messias	Maio/2015	BR-Mes1-15A	2642 nt	257 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	-
C03	Messias	Maio/2015	BR-Mes2-15A	2653 nt	257 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	-
C04	Messias	Maio/2015	BR-Mes3-15A	2641 nt	257 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	-
1	Messias	Abril/2016	<b>BR-Mes4-16</b>	2663 nt	257 aa	357 aa	129 aa	132 aa	97 aa	-
3	Messias	Abril/2016	<b>BR-Mes5-16</b>	2643 nt	257 aa	357 aa	129 aa	132 aa	97 aa	-
C10	Marechal Deodoro	Maio/2015	BR-Md1-15A	2677 nt	257 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	-
C11	Marechal Deodoro	Maio/2015	BR-Md2-15A	2676 nt	257 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	-
C13	Marechal Deodoro	Maio/2015	BR-Md4-15A	2663 nt	257 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	-
C14	Marechal Deodoro	Maio/2015	BR-Md5-15A	2652 nt	265 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	-
C15	Marechal Deodoro	Maio/2015	BR-Md6-15A	2652 nt	265 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	-
C16	Marechal Deodoro	Maio/2015	BR-Md7-15A	2652 nt	265 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	-
C17	Marechal Deodoro	Maio/2015	BR-Md8-15A	2651 nt	265 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	-
C19	Marechal Deodoro	Maio/2015	BR-Md9-15A	2675 nt	257 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	-
C20	Marechal Deodoro	Maio/2015	BR-Md10-15A	2676 nt	257 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	-
27C	Japaratinga	Novembro/2015	<b>BR-Jap1-15</b>	2659 nt	257 aa	382 aa	172 aa	132 aa	97 aa	105 aa
27C	Japaratinga	Novembro/2015	<b>BR-Jap2-15</b>	2659 nt	257 aa	382 aa	172 aa	132 aa	97 aa	105 aa
28C	Japaratinga	Novembro/2015	<b>BR-Jap3-15</b>	2663 nt	257 aa	382 aa	129 aa	132 aa	97 aa	105 aa
C24	Paripueira	Maio/2015	BR-Par3-15A	2663 nt	257 aa	356 aa	132 aa	129 aa	97 aa	105 aa
C25	Paripueira	Maio/2015	BR-Par4-15A	2662 nt	257 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	105 aa
C27	Paripueira	Maio/2015	BR-Par6-15A	2661 nt	265 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	105 aa
C29	Paripueira	Maio/2015	BR-Par8-15A	2661 nt	257 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	105 aa
C31	Paripueira	Maio/2015	BR-Par9-15A	2663 nt	257 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	105 aa
21C	Paripueira	Novembro/2015	<b>BR-Par10-15</b>	2663 nt	257 aa	357 aa	129 aa	132 aa	97 aa	105 aa

**Tabela 1** – Isolados de CnMLDV utilizados neste trabalho.

(conclusão)

<b>Código da Amostra</b>	<b>Local de Coleta</b>	<b>Data de coleta</b>	<b>Isolado*</b>	<b>Tamanho do DNA-A</b>	<b>CP</b>	<b>Rep</b>	<b>TrAP</b>	<b>REn</b>	<b>AC4</b>	<b>AC5</b>
22C	Paripueira	Novembro/2015	<b>BR-Par11-15</b>	2663 nt	257 aa	357 aa	129 aa	132 aa	97 aa	105 aa
22C	Paripueira	Novembro/2015	<b>BR-Par12-15</b>	2663 nt	257 aa	357 aa	129 aa	132 aa	97 aa	105 aa
23C	Paripueira	Novembro/2015	<b>BR-Par13-15</b>	2663 nt	257 aa	357 aa	129 aa	132 aa	97 aa	105 aa
24C	Paripueira	Novembro/2015	<b>BR-Par14-15</b>	2663 nt	257 aa	357 aa	129 aa	132 aa	97 aa	105 aa
24C	Paripueira	Novembro/2015	<b>BR-Par15-15</b>	2664 nt	257 aa	357 aa	129 aa	132 aa	97 aa	105 aa
25C	Paripueira	Novembro/2015	<b>BR-Par16-15</b>	2662 nt	257 aa	357 aa	129 aa	132 aa	97 aa	105 aa
25C	Paripueira	Novembro/2015	<b>BR-Par17-15</b>	2662 nt	257 aa	357 aa	129 aa	132 aa	97 aa	105 aa
3C	Porto de Pedras	Novembro/2015	<b>BR-Pdp1-15</b>	2665 nt	257 aa	357 aa	129 aa	132 aa	97 aa	105 aa
4C	Porto de Pedras	Novembro/2015	<b>BR-Pdp2-15</b>	2663 nt	257 aa	357 aa	129 aa	132 aa	97 aa	105 aa
7C	Porto de Pedras	Novembro/2015	<b>BR-Pdp3-15</b>	2663 nt	257 aa	357 aa	129 aa	132 aa	97 aa	105 aa
13C	Porto de Pedras	Novembro/2015	<b>BR-Pdp4-15</b>	2663 nt	257 aa	357 aa	129 aa	132 aa	97 aa	105 aa
13C	Porto de Pedras	Novembro/2015	<b>BR-Pdp5-15</b>	2663 nt	257 aa	357 aa	129 aa	132 aa	97 aa	105 aa
14C	Porto de Pedras	Novembro/2015	<b>BR-Pdp6-15</b>	2663 nt	257 aa	357 aa	129 aa	132 aa	97 aa	105 aa

\*Os isolados obtidos neste trabalho estão marcados em negrito.

Fonte: Elaborada pelo autor da pesquisa, 2017.



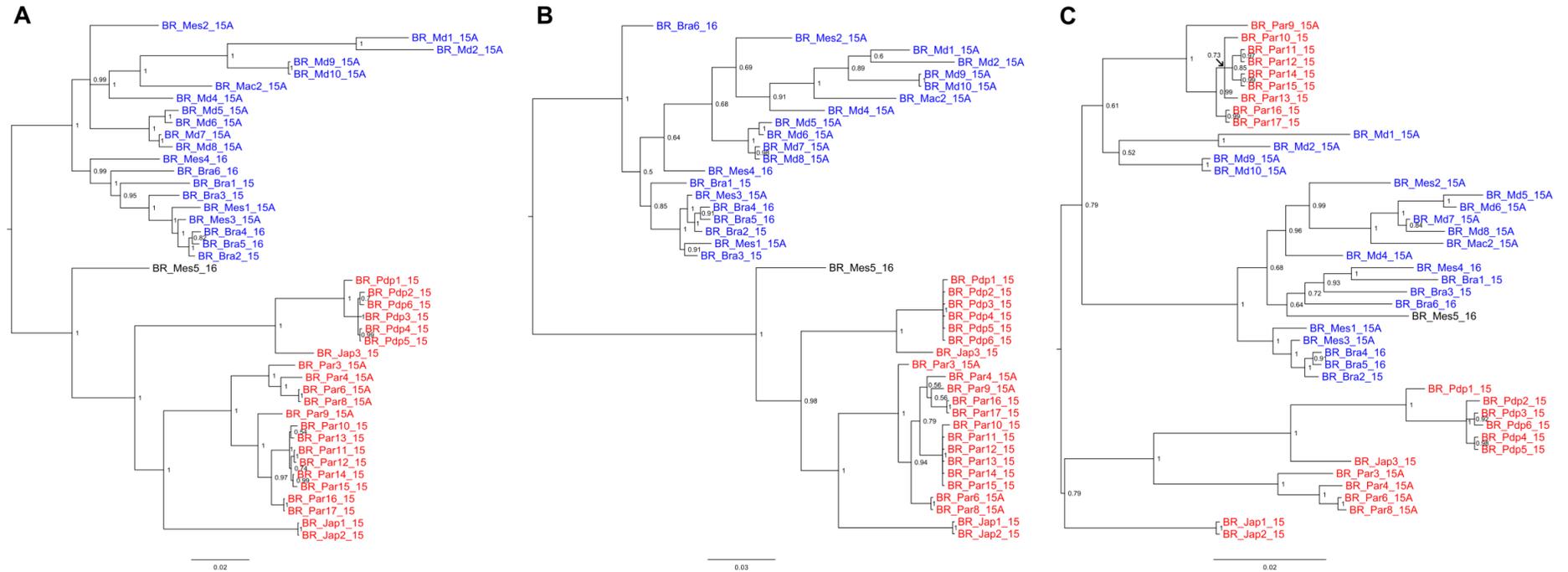
### 4.3 Análise filogenética

A árvore filogenética do DNA-A mostrou que os isolados de CnMLDV estão distribuídos em dois grupos bem sustentados, com isolados localizados no litoral Norte (Fig. 3A; em vermelho) se agrupando em um mesmo clado, e separados dos demais isolados (Fig. 3A; em azul), sugerindo a existência de estruturação de subpopulações. Concordando com os resultados obtidos na análise de comparações pareadas, o isolado BR-Mes5-16 não seguiu o padrão de agrupamento segundo local de coleta, sendo posicionado junto aos isolados do litoral Norte (Fig. 3A; em preto). Nas filogenias baseadas nas sequências nucleotídicas dos genes *CP* e *Rep* (Fig. 3B e 3C), pode-se observar algumas incongruências topológicas, sugerindo a existência de recombinação entre alguns isolados de CnMLDV. A topologia da árvore para a *CP* é similar à observada para o DNA-A. Entretanto, diferentemente das filogenias para DNA-A e *CP*, o isolado BR-Mes5-16 se agrupou segundo origem geográfica apenas na árvore da *Rep*. Evidências de recombinação podem ainda ser observadas entre alguns isolados provenientes do município de Paripueira (litoral Norte), os quais se agruparam com isolados de outras regiões na filogenia para o gene *Rep* (Fig. 3C).

### 4.4 Estrutura genética e índices de variabilidade

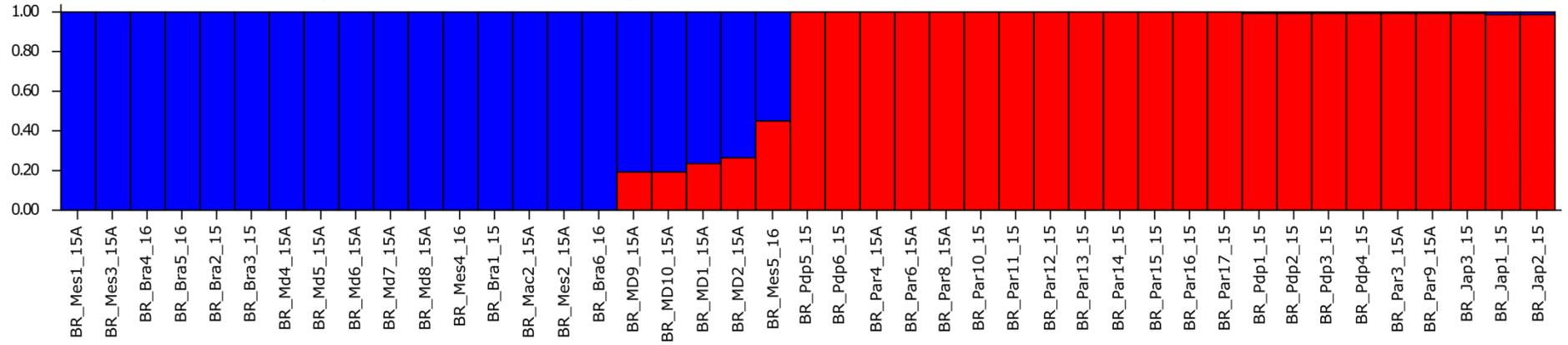
De acordo com o método Evanno (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005), o maior valor de  $\Delta K$  calculado (229,96) foi para  $K=2$ , indicando a existência de duas subpopulações geneticamente distintas para CnMLDV, consistente com o que foi observado nas reconstruções filogenéticas e comparações pareadas. Além disso, a análise no STRUCTURE sugere a existência de fluxo gênico entre as duas subpopulações (Fig. 4). Adicionalmente, o teste de fixação de Wright ( $F_{ST}$ ) indicou um alto grau de diferenciação genética ( $F_{ST/DNA-A} = 0,43798$ ) entre as duas subpopulações. Resultados similares foram observados quando avaliados os conjunto de dados *CP* ( $F_{ST} = 0,61685$ ) e *Rep* ( $F_{ST} = 0,30866$ ).

**Figura 3** – Árvore filogenéticas de inferência bayesiana construídas para CnMLDV. **A.** DNA-A. **B.** Gene *CP*. **C.** Gene *Rep*. Isolados da população Sul estão marcados em azul, e os da população Norte em vermelho. O isolado recombinante BR-Mes5-16 está indicado em preto



Fonte: Elaborada pelo autor da pesquisa, 2017.

**Figura 4** – Gráfico de barras gerado pela análise de estruturação de subpopulações no software STRUCTURE. As cores representam as subpopulações Sul (azul) e Norte (vermelho). Cada barra vertical representa um isolado viral cuja distribuição de cores é proporcional à estimativa de cada indivíduo pertencer a cada subpopulação.



Fonte: Elaborada pelo autor da pesquisa, 2017.

Em geral, altos valores de diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) foram observados para as subpopulações de CnMLDV (Tabela 2). A população total apresentou os maiores índices de variabilidade genética, em todos os conjuntos de dados (DNA-A, CP e Rep), quando comparada com as subpopulações locais estruturadas segundo local de coleta. Entre as subpopulações, pode-se observar que o conjunto de dados CP da subpopulação Sul é mais variável que o da subpopulação Norte (os outros conjuntos de dados apresentaram índices de variabilidade semelhantes).

**Tabela 2 – Diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) de isolados de CnMLDV.**

População	Número de sequências	DNA-A $\pi^*$ (SD)†	CP $\pi$ (SD)	Rep $\pi$ (SD)
CnMLDV (Total)	43	0,07670 ( $\pm$ 0,00270)	0,10776 ( $\pm$ 0,00330)	0,05726 ( $\pm$ 0,00225)
CnMLDV (Sul)	21	0,05901 ( $\pm$ 0,00565)	0,07293 ( $\pm$ 0,00810)	0,04335 ( $\pm$ 0,00421)
CnMLDV (Norte)	22	0,05542 ( $\pm$ 0,00468)	0,05305 ( $\pm$ 0,00558)	0,04970 ( $\pm$ 0,00306)

\* Par-a-par, diversidade nucleotídica por sítio. / † Desvio padrão.

Fonte: Elaborada pelo autor da pesquisa, 2017.

#### 4.5 Análise de seleção

A análise de seleção utilizando os métodos SLAC e FEL indicou que grande parte dos sítios presentes nos genes *CP* e *Rep* estão sob pressão de seleção negativa, com alguns poucos sítios identificados sob seleção positiva (Tabela 3). Adicionalmente, os valores de  $dN/dS$  (calculados utilizando SLAC) para *CP* (0,06367) e *Rep* (0,17317), indicam uma forte pressão de seleção purificadora atuando em ambos os genes.

O teste de neutralidade Tajima's  $D$  retornou valores negativos para a subpopulação Sul e positivos para a subpopulação Norte (Tabela 4), indicando que eventos demográficos como expansão ou contração no tamanho populacional, respectivamente, podem ter ocorrido recentemente nessas subpopulações. Como estes valores foram estatisticamente não significativos, a hipótese de evolução neutra (KIMURA, 1983) também deve ser considerada.

**Tabela 3 – Sítios selecionados positiva e negativamente nos genes *CP* e *Rep* de CnMLDV.**

Conjunto de dados	Número de haplótipos	Métodos			
		SLAC		FEL	
		Positiva	Negativa	Positiva	Negativa
CP	31	ND†	<b>9,13,14,16,28,30,35,40,56,61,63,66,70,74,75,77,78,81,84,85,86,87,90,93,94,106,109,110,111,112,114,117,118,120,121,124,125,126,127,132,134,136,141,142,143,146,148,149,152,153,157,158,160,161,162,164,165,166,167,169,173,174,178,179,181,183,186,187,188,191,194,195,199,200,203,206,207,209,213,215,216,230,244,245,255</b>	17	<b>6,9,10,13,14,15,16,23,24,27,28,30,31,34,35,36,37,38,40,52,56,60,61,63,66,69,70,71,72,74,75,76,77,78,79,80,81,84,85,86,87,90,93,94,96,98,103,106,109,110,111,112,113,114,115,117,118,119,120,121,124,125,126,127,129,132,134,136,140,141,142,143,144,146,148,149,150,152,153,156,157,158,160,161,162,164,165,166,167,169,173,174,177,178,179,181,183,186,187,188,190,191,193,194,195,196,197,198,199,200,201,202,203,206,207,209,210,211,213,215,216,229,230,233,234,244,245,254,255</b>
Rep	38	ND	<b>3,13,17,18,25,27,33,34,40,45,47,49,63,64,72,73,75,90,100,101,102,104,120,161,163,164,165,168,172,173,175,202,217,227,228,230,233,247,251,253,257,259,267,284,294,299,303,306,310,317,328,329,332,348</b>	105,145,224	<b>3,8,9,10,13,16,17,18,20,22,25,27,28,33,34,36,40,45,47,49,58,63,64,66,71,72,73,75,77,79,83,84,90,96,100,101,102,104,106,120,123,125,147,156,159,161,162,163,164,165,166,168,169,171,172,173,175,185,189,198,199,201,202,213,217,222,223,227,228,229,230,233,234,239,240,242,243,247,251,253,257,259,267,273,282,284,286,294,299,303,306,310,312,317,328,329,332,333,348</b>

\* Sítios detectados por mais de um método estão em negrito. / † Não detectado.

Fonte: Elaborada pelo autor da pesquisa, 2017.

**Tabela 4 – Teste de neutralidade *D* de Tajima para as ORFs CP e Rep das subpopulações de CnMLDV.**

População	ORF*	<i>D</i> de Tajima
CnMLDV (Sul)	CP	-0,43073 (ns <sup>†</sup> )
	REP	-0,85380 (ns)
CnMLDV (Norte)	CP	0,45952 (ns)
	REP	0,90973 (ns)

\*Rep, *Replication-associated protein*; CP, *Coat protein*. / <sup>†</sup>ns, valores não significativos a  $P > 0,10$ \*

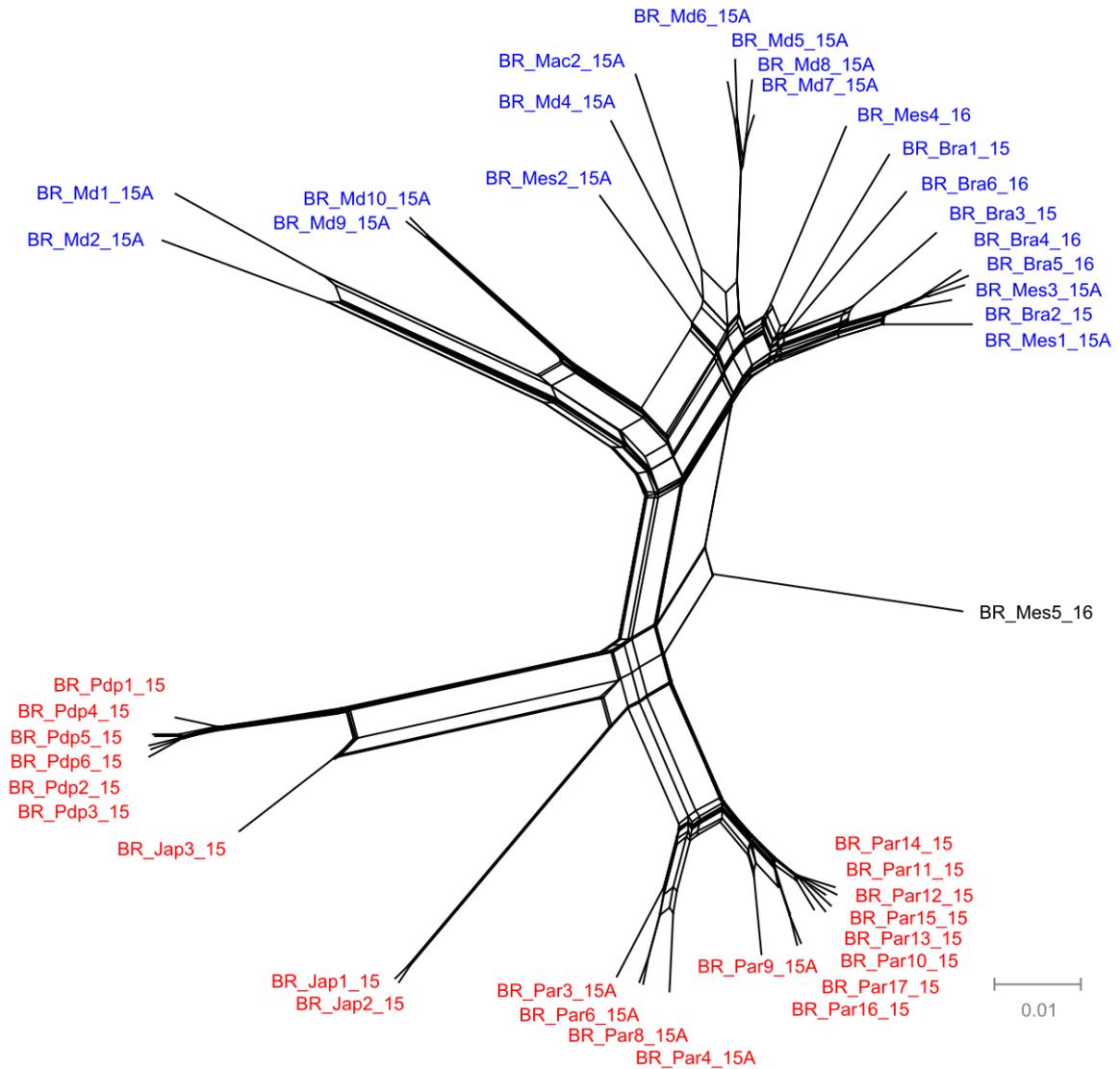
Fonte: Elaborada pelo autor da pesquisa, 2017.

#### 4.6 Análise de recombinação

A análise reticulada mostrou evidências de eventos de recombinação atuando na diversificação dos isolados de CnMLDV em todos os conjuntos de dados avaliados (DNA-A, CP e Rep; Figs. 5 e 6). Na rede para o DNA-A, podem ser observadas fortes evidências de que o isolado BR-Mes5-16 foi originado a partir de possíveis eventos de recombinação ocorrendo entre isolados presentes nas duas subpopulações (Fig. 5), como observado também para o conjunto de dados CP (Fig. 6A). Adicionalmente, possíveis eventos de recombinação entre isolados nas duas subpopulações foram evidenciado para o gene *Rep* (Fig. 6B).

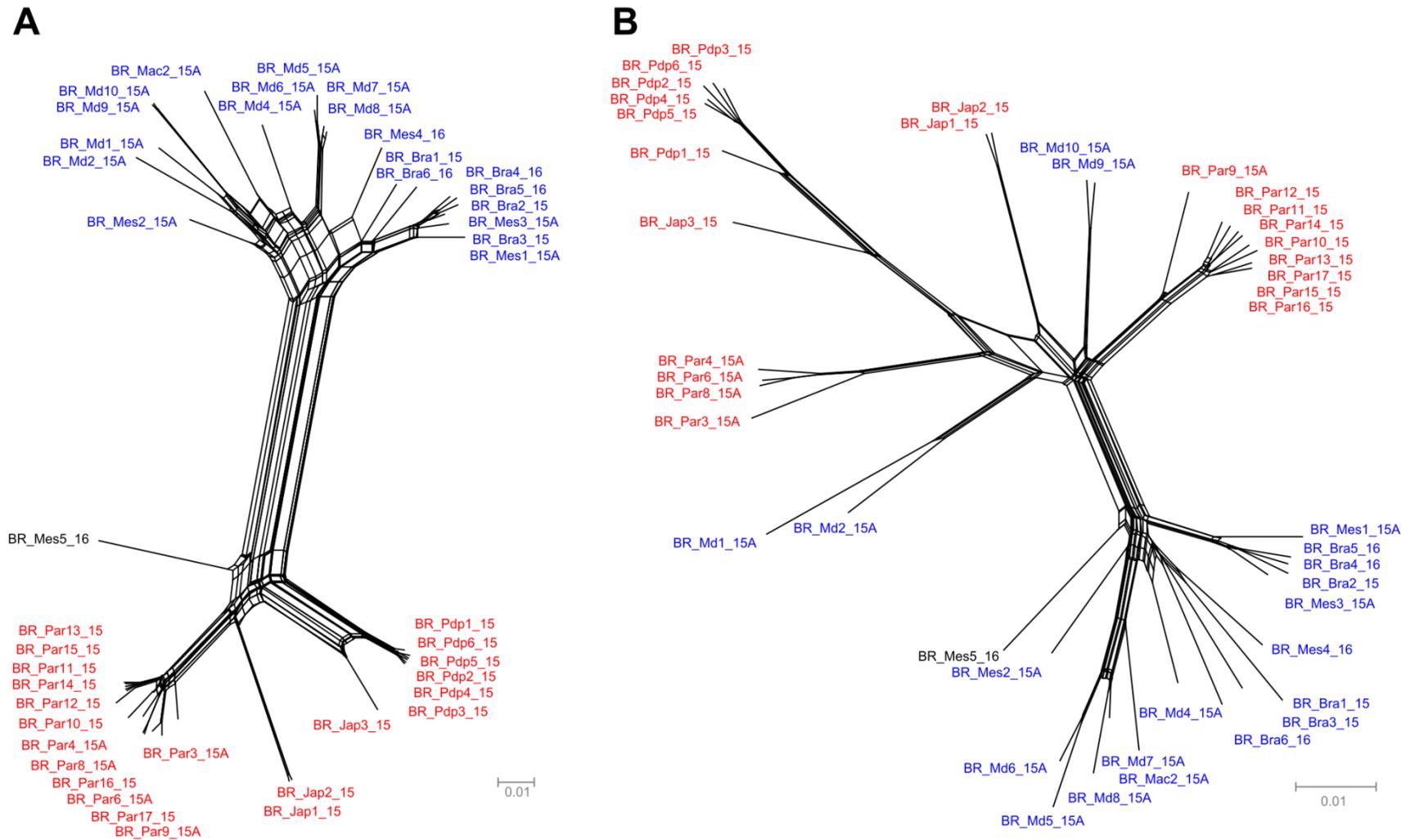
A análise de recombinação no pacote RDP4 revelou pelo menos sete eventos independentes de recombinação para o conjunto de dados formado exclusivamente por isolados de CnMLDV (Tabela 5). O evento quatro identificou o isolado BR-Mes5-16 como um recombinante, com possíveis *breakpoints* de recombinação localizados no gene *CP*, como evidenciado nas análises filogenéticas e de evolução em rede. Quando avaliado o conjunto de dados formado por CnMLDV e outros begomovírus do NM, foram identificados 12 eventos independentes, sendo os isolados de CnMLDV identificados como recombinantes ou possíveis parentais (Tabela 6). Os eventos três e quatro mostram os isolados BR-Md1-15A, BR-Md2-15A, BR-Md9-15A e BR-Md10-15A como possíveis recombinantes, com *breakpoints* de recombinação localizados na porção central do gene *Rep* e no final da porção 3' do gene *CP* (portanto, abrangendo a maior parte do gene *Rep*, os genes *REn* e a *TrAP* e uma pequena parte do gene *CP*), suportando as incongruências topológicas observadas nas filogenias para os genes *CP* e *Rep*.

Figura 5 – Análise reticulada baseada no DNA-A de CnMLDV. Isolados da subpopulação Sul estão marcados em azul e da subpopulação Norte em vermelho. O isolado recombinante BR-Mes5-16 está indicado em preto.



Fonte: Elaborada pelo autor da pesquisa, 2017.

Figura 6 – Análise reticulada dos isolados de CnMLDV. A. Gene *CP*. B. Gene *Rep*. Isolados da subpopulação Sul estão marcados em azul e da subpopulação Norte em vermelho. O isolado recombinante BR-Mes5-16 está indicado em preto.



Fonte: Elaborada pelo autor da pesquisa, 2017.

**Tabela 5 – Eventos de recombinação detectados entre os isolados de CnMLDV.**

Eventos	Pontos de recombinação		Recombinante	Sequências parentais		Métodos <sup>a</sup>	Valor P
	Início	Fim		Secundária	Principal		
1	2600	946	BR_Mac2_15A BR_Mes2_15A BR_Md5_15A BR_Md6_15A BR_Md7_15A BR_Md8_15A	BR_Md1_15A	BR_Mes5_16	RGBMCS3	4,38E-26
2	961 (?)	1784	BR_Md2_15A BR_Md1_15A	Unknown	BR_Md5_15A	RGBMS3	1,30E-21
3	2235	2636	BR_Jap3_15	BR_Jap2_15	BR_Pdp1_15	RGBMCS3	1,79E-13
4	273	851 (?)	BR_Mes5_16	BR_Par8_15A	Unknown	RGBMCS3	7,27E-13
5	886	2300	BR_Par17_15 BR_Par3_15A BR_Par4_15A BR_Par6_15A BR_Par8_15A BR_Par9_15A BR_Par10_15 BR_Par11_15 BR_Par12_15 BR_Par13_15 BR_Par14_15 BR_Par15_15 BR_Par16_15 BR_Jap1_15 BR_Jap2_15	BR_Mes3_15A	BR_Pdp2_15	RGBMCS3	7,27E-15
6	2325	2604	BR_Md2_15A	BR_Pdp2_15	BR_Mes4_16	RGBMCS3	5,44E-08
7	2587	207	BR_Jap2_15 BR_Jap1_15	Unknown	BR_Par9_15A	RMCS3	3,99E-06

<sup>a</sup>= R, RDP; G, GENECONV; B, Bootscan; M, Maxchi; C, Chimaera; S, SiScan; 3s, 3Seq.

Fonte: Elaborada pelo autor da pesquisa, 2017.

**Tabela 6 – Eventos de recombinação detectados entre isolados de CnMLDV e begomovírus do Novo Mundo.**

(continua)

Eventos	Pontos de recombinação		Recombinante	Sequências parentais		Métodos <sup>a</sup>	Valor <i>P</i>
	Início	Fim		Secundária	Principal		
1	96	2044	SiYMV_NC_004639	SiMoV_NC_004637	BR_Par13_15	RGBM <b>S</b> 3	1,85E-37
2	946	2600	BR_Mac2_15A BR_Mes2_15A BR_Md5_15A BR_Md6_15A BR_Md7_15A BR_Md8_15A	BR_Mes5_16	BR_Md1_15A	RGBM <b>C</b> 3	3,59E-24
3	1038	2048	BR_Md10_15A BR_Md9_15A	BR_Mes1_15A	BR_Md1_15A	RGM <b>C</b> 3	4,62E-19
4	899	1784	BR_Md2_15A BR_Md1_15A	Unknown	BR_Mes3_15A	RGBM <b>C</b> 3	1,20E-17
5	1930	2414	ToCMoV_NC_003664 MaYNV_NC_017001	BR_Par13_15	BGMV_NC_004042	<b>R</b> GMCS3	1,86E-14
6	52	852	BR_Bra5_16 BR_Mes1_15A BR_Mes2_15A BR_Mes3_15A BR_Mes4_16 BR_Mes5_16 BR_Bra4_16 BR_Bra6_16	Unknown	BR_Par16_15	RGBM <b>C</b> 3	2,64E-13

Tabela 6 – Eventos de recombinação detectados entre isolados de CnMLDV e begomovírus do Novo Mundo.

(conclusão)

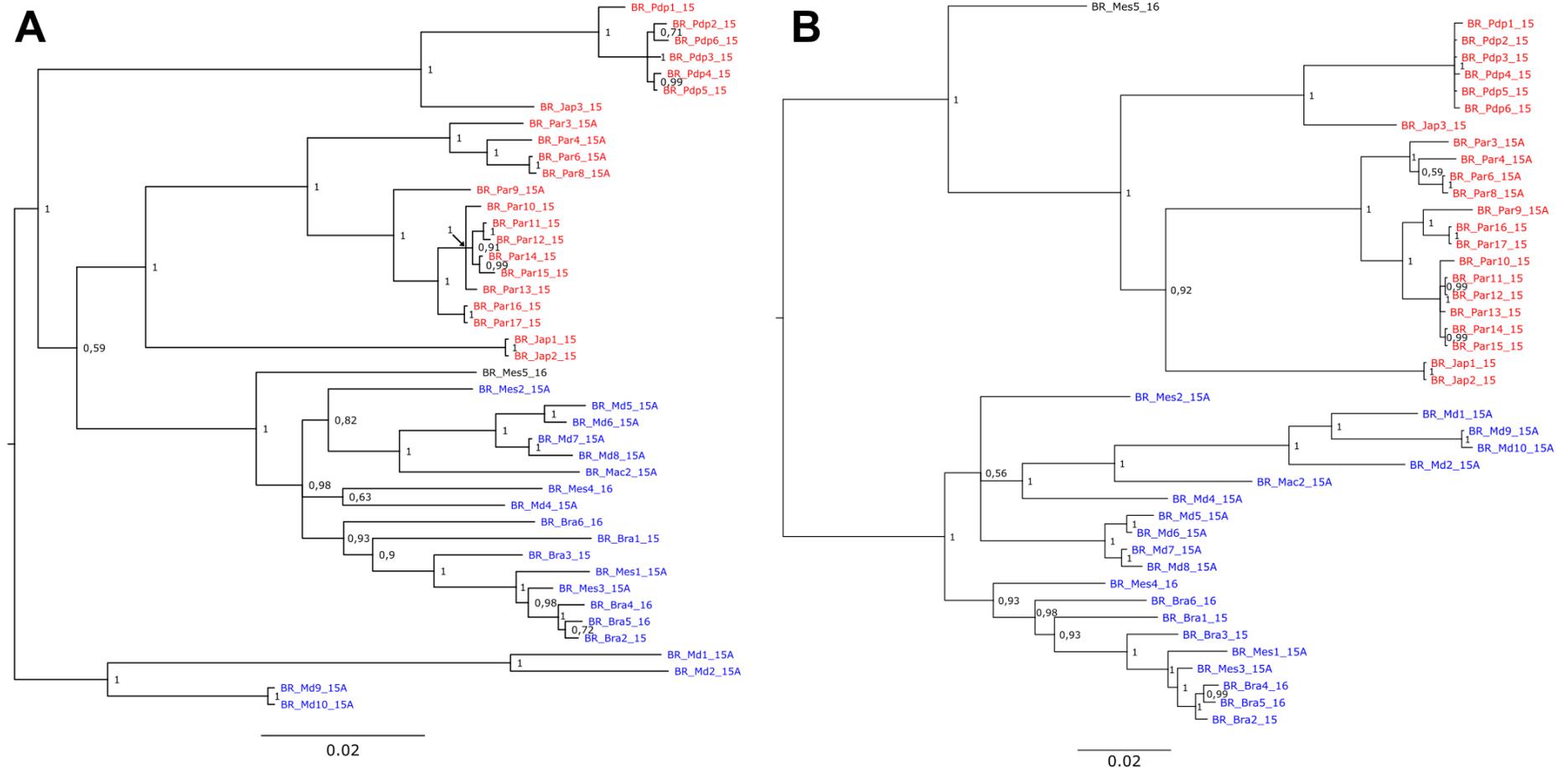
Eventos	Pontos de recombinação		Recombinante	Sequências parentais		Métodos <sup>a</sup>	Valor <i>P</i>
	Início	Fim		Secundária	Principal		
6	52	852	BR_Bra1_15 BR_Bra2_15 BR_Bra3_15 BR_Md4_15A BR_Md5_15A BR_Md6_15A BR_Md7_15A BR_Md8_15A	Unknown	BR_Par16_15	RGBMCS3	2,64E-13
7	460	887 (?)	BR_Md2_15A BR_Md1_15A	Unknown	BR_Par16_15	RGMCS3	5,02E-13
8	2233	2651	BR_Jap3_15	BR_Jap2_15	BR_Pdp1_15	RGBMCS3	7,98E-12
9	2042	2380	ToMoLCV_JF803246	BR_Par16_15	PhYSV_BR_Rla1_12A	RGMCS3	1,61E-11
10	435	886	BR_Mac2_15A	SimBV_FN436001	BR_Par6_15A	MCS3	5,21E-15
11	1289	2102	BR_Par6_15A BR_Par3_15A BR_Par4_15A BR_Par8_15A	Unknown	BR_Par16_15	MCS3	1,08E-04
12	2040	2357	HyRMV1	BR_Par16_15	PhYSV_BR_Rla1_12A	GMCS	6,90E-12

<sup>a</sup>= R, RDP; G, GENECONV; B, Bootscan; M, Maxchi; C, Chimaera; S, SiScan; 3s, 3Seq.

Fonte: Elaborada pelo autor da pesquisa, 2017.

Para adicionalmente confirmar a ocorrência desses eventos de recombinação, árvores filogenéticas de inferência bayesiana foram inferidas para o DNA-A, excluindo-se os blocos recombinantes identificados em CP e Rep pelo RDP4. A árvore filogenética para o DNA-A sem o bloco recombinante envolvendo a CP do isolado BR-Mes5-16 (evento 4; Tabela 5), mostra que esse isolado se agrupa segundo região de origem geográfica (Fig. 7A), diferentemente do que foi observado para os conjuntos de dados DNA-A e CP (incluindo blocos recombinantes). Por sua vez, a topologia da árvore filogenética para o DNA-A sem o bloco recombinante na Rep dos isolados BR-Md1-15A, BR-Md2-15A, BR-Md9-15A e BR-Md10-15A (eventos 3 e 4; Tabela 6) é bem semelhante às topologias das árvores para o DNA-A e CP contendo os blocos recombinantes. Juntos, estes resultados mostram que incongruências topológicas entre CP e Rep são resultantes de eventos de recombinação ocorrendo nessas regiões genômicas.

**Figura 7 – Árvores filogenéticas de inferência bayesiana com remoção de blocos recombinantes. A. Bloco da posição 330 a 888 (CP) deletado do alinhamento. B. Bloco da posição 903 a 2052 (maior porção da Rep; TrAP e REn; pequena porção da CP) deletado do alinhamento.**



Fonte: Elaborada pelo autor da pesquisa, 2017.

## 5 DISCUSSÃO

Estudos sobre diversidade e distribuição da variabilidade genética em populações de begomovírus têm auxiliando no entendimento dos mecanismos evolutivos atuando sobre este importante grupo de fitovírus em condições naturais (PRASANNA et al., 2010; GONZÁLEZ-AGUILERA et al., 2012; SILVA et al., 2012; LIMA et al., 2013; ROCHA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014; FERRO, M. et al., 2017). Trabalhos recentes têm demonstrado que populações de begomovírus estão, geralmente, estruturadas biogeograficamente, com populações infectando originalmente plantas não-cultivadas apresentando maiores índices de variabilidade genética (SILVA et al., 2012; LIMA et al., 2013; ROCHA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Entretanto, também já foi demonstrado que alguns begomovírus infectando hospedeiras cultivadas podem apresentar altos índices de variabilidade intra e interpopulacional (RAMOS-SOBRINHO et al., 2014; VENKATARAVANAPPA et al., 2014; FERRO, M. et al., 2017). Similarmente, no presente trabalho foi observado que isolados de CnMLDV, infectando a espécie silvestre *Cnidoscolus urens* no Estado de AL, estão estruturados em pelo menos duas subpopulações locais e apresentam altos índices de variabilidade genética.

Plantas cultivadas e não-cultivadas pertencentes à família Euphorbiaceae são conhecidas por hospedarem uma alta diversidade de espécies de begomovírus (MORALES; ANDERSON, 2001; HERNÁNDEZ-ZEPEDA et al., 2007; HUSSAIN et al., 2011; FERNANDES et al., 2011; FIALLO-OLIVÉ et al., 2013; SIMMONDS-GORDON et al., 2014; MELO et al., 2016). Em Alagoas, CnMLDV foi o único begomovírus encontrado em plantas de *C. urens* coletadas nos anos de 2015 e 2016. As duas subpopulações de CnMLDV apresentaram índices de variabilidade genética similares aos de populações de diferentes begomovírus que infectam hospedeiros silvestres (LIMA et al., 2013; ROCHA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014; FERRO, M. et al., 2017). Curiosamente, a CP foi a região genômica mais diversificada dentro do DNA-A de CnMLDV, em contraste com outras populações brasileiras de begomovírus, onde é observado que a Rep apresenta maiores índices de variabilidade (LIMA et al., 2013; SILVA et al., 2012; ROCHA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014; FERRO M. et al., 2017). Esta alta variação observada para CP em CnMLDV pode ser explicada, em parte, pelos eventos frequentes de recombinação ocorrendo nessa região, como

já constatado para a Rep de begomovírus infectando hospedeiras leguminosas (LIMA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Quando avaliada a população total, os maiores valores de variabilidade são provavelmente devidos à estruturação populacional dos isolados de CnMLDV, refletindo desta forma a variação existente entre as subpopulações.

Estruturação genética de populações em begomovírus é fortemente influenciada por forças evolutivas como mutação e recombinação, e a interrelação entre vírus/vetor/hospedeiro (NAVAS-CASTILLO et al., 2011; LIMA et al., 2013; ROCHA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Assim como observado para begomovírus infectando hospedeiras solanáceas e leguminosas (ROCHA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014), os isolados de CnMLDV estão estruturados biogeograficamente, apesar da pequena distância que separa as duas regiões de amostragem [a menor distância entre os pontos de coleta foi de 31 km (entre os municípios de Paripueira e Messias), e a maior foi de 82 km (entre os municípios de Japaratinga e Branquinha)]. A existência de uma possível ORF AC5 de 105 aminoácidos encontrada apenas em isolados pertencentes à população do litoral Norte é evidência adicional dessa estruturação populacional. Uma hipótese alternativa para a estruturação biogeográfica observada no presente trabalho é a possível existência de diferentes populações do hospedeiro *C. urens*. Em Pernambuco (PE), foram observadas duas populações de *C. urens* segundo distribuição geográfica, sendo o conjunto um encontrado da Zona da Mata ao Agreste, e o conjunto dois restrito à região litorânea (MELO; SALES, 2008). Dada a proximidade entre os Estados de AL e PE, é possível que os dois conjuntos de populações de *C. urens* também ocorram em AL. Além disso, a presença da ORF AC5 nos isolados da população Norte podem também suportar esta hipótese. Caso a ORF AC5 de CnMLDV codifique uma proteína relacionada com TGS, PTGS e/ou resposta semelhante à de hipersensibilidade (LI et al., 2015), seria uma evidência da estreita relação entre esses isolados e seu hospedeiro. Como apenas amostras no Estado de AL foram avaliadas, a obtenção de um número maior de isolados de CnMLDV provenientes de diferentes localidades é necessária para uma conclusão definitiva sobre a estruturação genética desse begomovírus.

Recombinação é um dos principais fatores atuando para a variabilidade genética e evolução dos begomovírus (LEFEUVRE et al., 2007; 2009; PRASANNA; RAI, 2007; MARTIN et al., 2011; SILVA et al., 2011; 2012; LIMA et al., 2013; ROCHA

et al., 2013; HOSSEINZADEH et al., 2014; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014; VENKATARAVANAPPA et al., 2014), sendo responsável pelo surgimento de novas espécies e/ou isolados causando grandes prejuízos em culturas de importância econômica em todo o mundo (ZHOU et al., 1997; MONCI et al., 2002; IDRIS; BROWN, 2002; BRIDDON et al., 2014). Diversos trabalhos têm demonstrado que, em begomovírus, a região do gene *CP* é um *coldspot* de recombinação, enquanto *Rep* e a Região Intergênica (IR) são consideradas *hotspots* de recombinação (STANLEY, 1995; FAUQUET et al., 2005; GARCÍA-ANDRÉS et al., 2007b; LEFEUVRE et al., 2007; SILVA et al., 2012; ROCHA et al., 2013; LIMA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Curiosamente, diversos *breakpoints* de recombinação foram detectados em CP (além da Rep e IR) para os isolados de CnMLDV, estando diretamente relacionados com os altos índices de variabilidade observados para este gene. Pelo menos sete eventos independentes de recombinação foram encontrados em CnMLDV, mostrando que esse begomovírus é altamente recombinante. Além de recombinação, evidências da influência de mutações atuando na diversificação dos isolados de CnMLDV foi observada nas análises de evolução em rede (ramos longos associados aos táxons).

Dada a natureza multifuncional de muitas proteínas virais, essas estão sujeitas a diferentes pressões seletivas (GARCIA-ARENAL; FRAILE; MALPICA, 2003). Seleção negativa ou purificadora tem sido detectada como uma das principais forças seletivas atuando sobre populações de begomovírus (SILVA et al., 2012; LIMA et al. 2013; ROCHA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014), provavelmente porque a maioria das mutações tendem a ser deletérias (GARCIA-ARENAL; FRAILE; MALPICA, 2003; SEAL; VAN DEN BOSCH; JEGER, 2006). Apesar da alta variabilidade nucleotídica observada entre isolados de CnMLDV, forte seleção purificadora ( $dN/dS < 0,2$ ) atua sobre os sítios codificados pelas ORFs CP e Rep. Isso significa que grande parte das mutações ocorrendo em CnMLDV são sinônimas, resultando em poucas alterações na sequência de aminoácidos, e conseqüentemente na conservação da estrutura e função da proteína. A CP dos begomovírus está diretamente envolvida na transmissão por mosca-branca, e interage com proteínas dos endossimbiontes e do inseto vetor (BRIDDON et al., 1990; OHNESORGE; BEJARANO, 2009; RANA et al., 2012). A Rep, por sua vez, contém múltiplos domínios relacionados com o processo de replicação viral (ILYINA; KOONIN, 1992; HEYRAUD-NITSCHKE et al., 1995; OROZCO et al., 1997; NASH et al., 2011).

Portanto, a conservação dessas proteínas é importante para a manutenção dos principais processos biológicos dos begomovírus, incluindo CnMLDV.

## 6 CONCLUSÕES

- Isolados do begomovírus CnMLDV apresentam alta variabilidade genética, e estão estruturados biogeograficamente em pelo menos duas subpopulações locais no Estado de Alagoas.
- Mutação, recombinação e seleção negativa são os principais mecanismos evolutivos atuando na evolução/diversificação de CnMLDV.

## REFERÊNCIAS

- AL RWAHNIH, M. et al. Association of a DNA virus with grapevines affected by red blotch disease in California. **Phytopathology**, v. 103, n. 10, p. 1069-1076, 2013.
- ALABI, O. J. et al. Alternate hosts of *African cassava mosaic virus* and *East African cassava mosaic Cameroon virus* in Nigeria. **Archives of Virology**, v. 153, n. 9, p. 1743-1747, 2008.
- ALABI, O. J.; KUMAR, P. L.; NAIDU, R. A. Cassava mosaic disease: a curse to food security in Sub-Saharan Africa. **APSnet Features**, 2011. Disponível em: <<https://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/cassava.aspx>>. Acesso em: 9 fev. 2017.
- ALBERTER, B.; REZAIAN, M. A.; JESKE, H. Replicative intermediates of *Tomato leaf curl virus* and its satellite DNAs. **Virology**, v. 331, n. 2, p. 441-448, 2005.
- ALBUQUERQUE, L. C. et al. Genetic diversity and recombination analysis of sweepviruses from Brazil. **Virology Journal**, v. 9, p. 241, 2012.
- AMARAKOON, I. I. et al. Molecular and biological characterization of *Macropodium yellow mosaic virus* from Jamaica. **Plant Pathology**, v. 57, n. 3, p. 417-426, 2008.
- AMBROZEVICIUS L. P. et al. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, 27, p. 372-377, 2002.
- AMIN, I. et al. Association of a monopartite begomovirus producing subgenomic DNA and a distinct DNA beta on *Croton bonplandianus* showing yellow vein symptoms in Pakistan. **Plant Disease**, v. 86, n. 4, p. 444, 2002.
- ANDRADE, E. C. et al. *Tomato yellow spot virus*, a tomato-infecting begomovirus from Brazil with a closer relationship to viruses from *Sida* sp., forms pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from *Sida*. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 12, p. 3687-3696, 2006.
- ASSUNÇÃO, I. P. et al. Diversidade genética de *Begomovirus* que infectam plantas invasoras na região nordeste. **Planta Daninha**, v. 24, n. 2, p. 239-244, 2006.
- BARBOSA, J.C. et al. First report of *Tomato yellow spot virus* infecting *Leonurus sibiricus* in Brazil. **Plant Disease**, v. 97, p. 289-289, 2012.
- \_\_\_\_\_. et al. Natural infection of *Nicandra physaloides* by *Tomato severe rugose virus* in Brazil. **Journal of General Plant Pathology**, v. 75, n. 6, p. 440, 2009.
- BARRETO, S. S. et al. A study of weeds as potential inoculum sources for a tomato-infecting begomovirus in central Brazil. **Phytopathology**, v. 103, n. 5, p. 436-44, 2013.

BASSO, M. F. et al. A novel, highly divergent ssDNA virus identified in Brazil infecting apple, pear and grapevine. **Virus Research**, v. 210, p. 27-33, 2015.

BERNARDO, P. et al. Identification and characterisation of a highly divergent geminivirus: evolutionary and taxonomic implications. **Virus Research**, v. 177, n. 1, p. 35-45, 2013.

BOULTON, M. I. et al. Mutational analysis of the virion-sense genes of maize streak virus. **Journal of General Virology**, v. 70, n. 9, p. 2309-2323, 1989.

BRACERO, V.; RIVERA, L.; BEAVER, J. DNA analysis confirms *Macroptilium lathyroides* as alternative host of *Bean golden yellow mosaic virus*. **Plant Disease**, v. 87, n. 9, p. 1022-1025, 2003.

BRIDDON, R. W. et al. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. **Virology**, v. 177, n. 1, p. 85-94, 1990.

\_\_\_\_\_. Diversity of DNA 1: a satellite-like molecule associated with monopartite begomovirus-DNA beta complexes. **Virology**, v. 324, n. 2, p. 462-74, 2004.

\_\_\_\_\_. Effects of genetic changes to the begomovirus/betasatellite complex causing cotton leaf curl disease in South Asia post-resistance breaking. **Virus Research**, v. 186, p. 114-119, 2014.

BRIDDON, R. W. **Geminiviridae**. [online], 2015. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000750.pub3.

BRIDDON, R. W.; STANLEY, J. Subviral agents associated with plant single-stranded DNA viruses. **Virology**, v. 344, n. 1, p. 198-210, 2006.

BRIDDON, R.W. et al. Satellites and other virus-dependent nucleic acids. In: KING, A. M. Q. et al. (Ed.). **Virus Taxonomy**: classification and nomenclature of viruses – ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, USA, 2012. p. 1211–1219.

BROWN J. K. et al. Family - *Geminiviridae*. In: KING, A. M. Q. et al. (Ed.). **Virus Taxonomy**: classification and nomenclature of viruses – ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, USA, 2012. p. 1211–1219.

\_\_\_\_\_. et al. Revision of *Begomovirus* taxonomy based on pairwise sequence comparisons. **Archives of Virology**, v. 160, n. 6, p. 1593-1619, 2015.

BURGER, W.; HUFT, M. Euphorbiaceae. In: \_\_\_\_\_. **Flora costaricensis**. Fieldiana, 1995. v. 36, p. 169.

CALEGARIO R. F. et al. Characterization of *Tomato yellow spot virus*, (ToYSV), a novel tomato-infecting begomovirus from Brazil. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 42, p. 1335-1343, 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.

CHOWDA-REDDY, R. V. et al. Role of a geminivirus AV2 protein putative protein kinase C motif on subcellular localization and pathogenicity. **Virus Research**, v. 135, n. 1, p. 115-124, 2008.

COSTA, A. S.; BENNETT, C. W. White-fly-transmitted mosaic of *Euphorbia prunifolia*. **Phytopathology**, v. 40, n. 3, p. 266-283, 1950.

DOMINGO, E. J. J. H.; HOLLAND, J. J. RNA virus mutations and fitness for survival. **Annual Review of Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 151-178, 1997.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

DRY, I. B. et al. A novel subviral agent associated with a geminivirus: the first report of a DNA satellite. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 13, p. 7088-7093, 1997.

DUFFY, S.; HOLMES, E. C. Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus tomato yellow leaf curl virus. **Journal of Virology**, v. 82, n. 2, p. 957-965, 2008.

DUFFY, S.; HOLMES, E. C. Validation of high rates of nucleotide substitution in geminiviruses: phylogenetic evidence from *East African cassava mosaic viruses*. **Journal of General Virology**, v. 90, n. 6, p. 1539-1547, 2009.

EAGLE, P. A.; OROZCO, B. M.; HANLEY-BOWDOIN, L. A DNA sequence required for geminivirus replication also mediates transcriptional regulation. **The Plant Cell**, v. 6, n. 8, p. 1157-1170, 1994.

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. Structure Harvester: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359-361, 2012.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.

FARIA, J. C. et al. *Bean golden mosaic geminivirus* type II isolates from the Dominican Republic and Guatemala: nucleotide sequences, infectious pseudorecombinants, and phylogenetic relationships. **Phytopathology**, v. 84, n. 3, p. 321-329, 1994.

FARIA, J. C. et al. RNAi-based *Bean golden mosaic virus*-resistant common bean (Embrapa 5.1) shows simple inheritance for both transgene and disease resistance. **Plant Breeding**, v. 133, n. 5, p. 649-653, 2014.

FAUQUET, C.; FARGETTE, D. *African cassava mosaic virus*: etiology, epidemiology and control. **Plant Disease**, v. 74, n. 6, p. 404-411, 1990.

\_\_\_\_\_. et al. Sequence analysis and classification of apparent recombinant begomoviruses infecting tomato in the Nile and Mediterranean basins. **Phytopathology**, v. 95, n. 5, p. 549-555, 2005.

FERNANDES, F. R. et al. Molecular and biological characterization of a new Brazilian begomovirus, euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV), infecting *Euphorbia heterophylla* plants. **Archives of Virology**, v. 156, n. 11, p. 2063-2069, 2011.

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

FERNANDES-ACIOLI, N. A. N. et al. Report of *Tomato yellow spot virus* Infecting *Leonurus sibiricus* in Paraguay and Within Tomato Fields in Brazil. **Plant Disease**, v. 98, n. 10, p. 1445-1445, 2014.

FERRO, C. G. et al. The ever increasing diversity of begomoviruses infecting non-cultivated hosts: new species from *Sida* spp. and *Leonurus sibiricus*, plus two New World alphasatellites. **Annals of Applied Biology**, v. 170, n. 2, p. 204-218, 2017.

FERRO, M. M. M. et al. Genetic structure of populations of the begomoviruses *Tomato mottle leaf curl virus* and *Sida mottle Alagoas virus* infecting tomato (*Solanum lycopersicum*) and *Sida* spp., respectively. **Tropical Plant Pathology**, Brasília , v. 42, n.1, p. 39-45, 2017.

FIALLO-OLIVÉ, E.; TOVAR, R.; NAVAS-CASTILLO, J. Deciphering the biology of deltasatellites from the New World: maintenance by New World begomoviruses and whitefly transmission. **New Phytologist**, v. 212, n. 3, p. 680-692, 2016.

\_\_\_\_\_. et al. Begomoviruses infecting weeds in Cuba: increased host range and a novel virus infecting *Sida rhombifolia*. **Archives of Virology**, v. 157, n. 1, p. 141-146, 2012.

\_\_\_\_\_. et al. Complete genome sequences of two begomoviruses infecting weeds in Venezuela. **Archives of Virology**, v. 158, n. 1, p. 277-280, 2013.

FONDONG, V. N. Geminivirus protein structure and function. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, n. 6, p. 635-649, 2013.

\_\_\_\_\_. et al. Evidence of synergism between *African cassava mosaic virus* and a new double-recombinant geminivirus infecting cassava in Cameroon. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 1(Pt), p. 287-297, 2000.

FONT, M. I. et al. Genetic structure and evolution of natural populations of viruses causing the tomato yellow leaf curl disease in Spain. **Virus Research**, v. 128, n. 1, p. 43-51, 2007.

FONTENELLE, M. R. et al. Functional analysis of the naturally recombinant DNA-A of the bipartite begomovirus *Tomato chlorotic mottle virus*. **Virus Research**, v. 126, n. 1, p. 262-267, 2007.

FONTES, E. P.; LUCKOW, V. A.; HANLEY-BOWDOIN, L. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. **The Plant Cell**, v. 4, n. 5, p. 597-608, 1992.

FU, Y. X.; LI, W. H. Statistical tests of neutrality of mutations. **Genetics**, v. 133, n. 3, p. 693-709, 1993.

GARCÍA-ANDRÉS, S. et al. Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: Evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature. **Virology**, v. 350, n. 2, p. 433-42, 2006.

\_\_\_\_\_. Frequent occurrence of recombinants in mixed infections of tomato yellow leaf curl disease-associated begomoviruses. **Virology**, v. 365, n. 1, p. 210-9, 2007a.

\_\_\_\_\_. Founder effect, plant host, and recombination shape the emergent population of begomoviruses that cause the tomato yellow leaf curl disease in the Mediterranean basin. **Virology**, v. 359, n. 2, p. 302-12, 2007b.

GARCÍA-ARENAL, F.; FRAILE, A.; MALPICA, J. M. Variability and genetic structure of plant virus populations. **Annual Review of Phytopathology**, v. 39, n. 1, p. 157-186, 2001.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Variation and evolution of plant virus populations. **International Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 225-232, 2003. GARRIDO-RAMIREZ, E. R.; SUDARSHANA, M. R.; GILBERTSON, R. L. *Bean golden yellow mosaic virus* from Chiapas, Mexico: characterization, pseudorecombination with other bean-infecting geminiviruses and germ plasm screening. **Phytopathology**, v. 90, n. 11, p. 1224-1232, 2000.

GILBERTSON, R. L. et al. Pseudorecombination between infectious cloned DNA components of tomato mottle and bean dwarf mosaic geminiviruses. **Journal of General Virology**, v. 74, n. 1, p. 23-31, 1993.

\_\_\_\_\_. et al. Role of the insect supervectors *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis* in the emergence and global spread of plant viruses. **Annual Review of Virology**, v. 2, n. 1, p. 67-93, 2015.

GONZALEZ-AGUILERA, J. et al. Genetic structure of a Brazilian population of the begomovirus *Tomato severe rugose virus* (ToSRV). **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 37, n. 5, p. 346-353, 2012.

GOTTLIEB, Y. et al. The transmission efficiency of tomato yellow leaf curl virus by the whitefly *Bemisia tabaci* is correlated with the presence of a specific symbiotic bacterium species. **Journal of Virology**, v. 84, n. 18, p. 9310-9317, 2010.

HANLEY-BOWDOIN, L. et al. Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 777-788, 2013.

\_\_\_\_\_. et al. Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 2, p. 105-140, 2000.

HASSAN, I. et al. Infectivity, effects on helper viruses and whitefly transmission of the deltasatellites associated with sweepoviruses (genus *Begomovirus*, family *Geminiviridae*). **Scientific Reports**, 6, 2016. doi: 10.1038/srep30204

HERNÁNDEZ-ZEPEDA, C. et al. Preliminary identification and coat protein gene phylogenetic relationships of begomoviruses associated with native flora and cultivated plants from the Yucatan Peninsula of Mexico. **Virus Genes**, v. 35, n. 3, p. 825-833, 2007.

HEYRAUD-NITSCHKE, F. et al. Determination of the origin cleavage and joining domain of geminivirus Rep proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 6, p. 910-916, 1995.

HILL, J. E. et al. Asymmetric infectivity of pseudorecombinants of cabbage leaf curl virus and squash leaf curl virus: implications for bipartite geminivirus evolution and movement. **Virology**, v. 250, n. 2, p. 283-292, 1998.

HOSSEINZADEH, M. R. et al. Phylogenetic relationships, recombination analysis, and genetic variability among diverse variants of tomato yellow leaf curl virus in Iran and the Arabian Peninsula: further support for a TYLCV center of diversity. **Archives of Virology**, v. 159, n. 3, p. 485-497, 2014.

HUANG, C. et al. A naturally occurring defective DNA satellite associated with a monopartite begomovirus: Evidence for recombination between alphasatellite and betasatellite. **Viruses**, v. 5, n. 9, p. 2116-2128, 2013.

HUSON, D. H.; BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 2, p. 254-267, 2006.

HUSSAIN, K. et al. Complete nucleotide sequence of a begomovirus and associated betasatellite infecting croton (*Croton bonplandianus*) in Pakistan. **Archives of Virology**, v. 156, n. 6, p. 1101-1105, 2011.

IDRIS, A. M.; BROWN, J. K. Molecular analysis of *Cotton leaf curl virus*-Sudan reveals an evolutionary history of recombination. **Virus Genes**, v. 24, n. 3, p. 249-256, 2002.

\_\_\_\_\_; BIRD, J.; BROWN, J. K. First report of a bean-infecting begomovirus from *Macroptilium lathyroides* in Puerto Rico that is distinct from bean golden mosaic virus. **Plant Disease**, v. 83, n. 11, p. 1071-1071, 1999.

IDRIS, A. M. et al. Two newly described begomoviruses of *Macroptilium lathyroides* and common bean. **Phytopathology**, v. 93, n. 7, p. 774-783, 2003.

ILYINA, T. V.; KOONIN, E. V. Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes and archaeobacteria. **Nucleic Acids Research**, v. 20, n. 13, p. 3279-3285, 1992.

INOUE-NAGATA, A. K.; LIMA, M. F.; GILBERTSON, R. L. A review of geminivirus diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. **Horticultura brasileira**, v. 34, n. 1, p. 8-18, 2016.

\_\_\_\_\_. et al. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi 29 DNA polymerase. **Journal of Virology Methods**, v. 116, n. 2, p. 209-211, 2004.

JESKE, H. Geminiviruses. In: \_\_\_\_\_. **TT Viruses**. Springer Berlin Heidelberg, 2009. p. 185-226.

\_\_\_\_\_; LÜTGEMEIER, M.; PREIß, W. DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of Abutilon mosaic virus. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 21, p. 6158-6167, 2001.

\_\_\_\_\_. et al. Circomics of Cuban geminiviruses reveals the first alpha-satellite DNA in the Caribbean. **Virus Genes**, v. 49, n. 2, p. 312-324, 2014. JOVEL, J. et al. Sida micrantha mosaic is associated with a complex infection of begomoviruses different from *Abutilon mosaic virus*. **Archives of Virology**, v. 149, n. 4, p. 829-841, 2004.

KHEYR-POUR, A. et al. *Watermelon chlorotic stunt virus* from the Sudan and Iran: sequence comparisons and identification of a whitefly-transmission determinant. **Phytopathology**, v. 90, n. 6, p. 629-635, 2000.

KIMURA, M. **The neutral theory of molecular evolution**. Cambridge: Cambridge University Press, 1983.

KOSAKOVSKY-POND, S. L. K.; FROST, S. D. W. Not so different after all: A comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. **Molecular Biology and Evolution**, v. 22, n. 5, p. 1208-1222, 2005.

KRENZ, B. et al. Complete genome sequence of a new circular DNA virus from grapevine. **Journal of Virology**, v. 86, n. 14, p. 7715, 2012.

KUMAR, J.; ALOK, A.; TULI, R. *Senna leaf curl virus*: a novel begomovirus identified in *Senna occidentalis*. **Archives of Virology**, v. 161, n. 9, p. 2609-2612, 2016.

LEFEUVRE, P. et al. Avoidance of protein fold disruption in natural virus rebombinants. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 11, p. e181, 2007.

LEFEUVRE, P. et al. Widely conserved recombination patterns among single-stranded DNA viruses. **Journal of Virology**, v. 83, n. 6, p. 2697-2707, 2009.

LEGG, J. P.; FAUQUET, C. M. Cassava mosaic geminiviruses in Africa. **Plant**

**Molecular Biology**, v. 56, n. 4, p. 585-599, 2004.

LEMOS, P. P. F. **Genetic variability of *Euphorbia yellow mosaic virus* and *macroptilium yellow vein virus* in their respective natural hosts, *Euphorbia heterophylla* and *Macroptilium lathyroides***. 2013. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa. 2013.

LI, F. et al. The AC5 protein encoded by *Mungbean yellow mosaic India virus* is a pathogenicity determinant that suppresses RNA silencing-based antiviral defenses. **New Phytologist**, v. 208, n. 2, p. 555-569, 2015.

LIANG, P. et al. Identification and characterization of a novel geminivirus with a monopartite genome infecting apple trees. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 8, p. 2411-2420, 2015.

LIMA, A. T. M. et al. Synonymous site variation due to recombination explains higher genetic variability in begomovirus populations infecting non-cultivated hosts. **Journal of General Virology**, v. 94, p. 418-431, 2013.

LIMA, M. F.; HAJI, F. N. P. Mosca branca x geminivírus na cultura do tomate no Submédio do Vale do São Francisco. **Horticultura brasileira**, v. 15, contracapa, 1998.

LIU, H.; BOULTON, M. I.; DAVIES, J. W. *Maize streak virus* coat protein binds single- and double-stranded DNA in vitro. **Journal of General Virology**, v. 78, n. 6, p. 1265-1270, 1997.

LIU, L. et al. *Bean yellow dwarf virus* RepA, but not Rep, binds to maize retinoblastoma protein, and the virus tolerates mutations in the consensus binding motif. **Virology**, v. 256, n. 2, p. 270-279, 1999.

LOCONSOLE, G. et al. Identification of a single-stranded DNA virus associated with citrus chlorotic dwarf disease, a new member in the family Geminiviridae. **Virology**, v. 432, n. 1, p. 162-172, 2012.

LOZANO, G. et al. Characterization of non-coding DNA satellites associated with sweepoviruses (genus *Begomovirus*, *Geminiviridae*)—definition of a distinct class of begomovirus-associated satellites. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 162, 2016.

LUTZ, O. The poisonous nature of the stinging hairs of *Jatropha urens*. **Science**, v. 40, n. 1034, p. 609-610, 1914.

MA, Y. et al. Identification and molecular characterization of a novel monopartite geminivirus associated with mulberry mosaic dwarf disease. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 8, p. 2421-2434, 2015.

MA, X. Y. et al. Molecular characterization of a distinct begomovirus infecting *Euphorbia pulcherrima* in China. **Journal of Phytopathology**, v. 152, n. 4, p. 215-218, 2004.

MARTIN, D. P. et al. Recombination in eukaryotic single stranded DNA viruses. **Viruses**, v. 3, n. 9, p. 1699-1738, 2011.

MARTIN D. P. et al. RDP4: detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. **Virus Evolution**, p. 1-5, 2015.

MELGAREJO, T. A. et al. Characterization of a new world monopartite begomovirus causing leaf curl disease of tomato in Ecuador and Peru reveals a new direction in geminivirus evolution. **Journal of Virology**, v. 87, n. 10, p. 5397-5413, 2013.

MELO, A. L. D.; SALES, M. F. D. O gênero *Cnidoscolus* Pohl (Crotonoideae-Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, p. 806-827, 2008.

MELO, A. M. et al. *Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus*: a novel begomovirus infecting euphorbiaceous plants in Brazil. **Archives of Virology**, v. 161, n. 9, p. 2605-2608, 2016.

MELO, A. M. **Diversidade de espécies e variabilidade genética de begomovírus infectando cansanção (*Cnidoscolus urens* L.) no estado de Alagoas**. 2015. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) - Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas, Rio Largo, 2015.

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: GATEWAY COMPUTING ENVIRONMENTS WORKSHOP, 14., 2010, New Orleans. **Proceedings...** New Orleans, 2010. p. 1-8.

MONCI, F. et al. A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. **Virology**, v. 303, n. 2, p. 317-326, 2002.

MONDE, G. et al. Dual infection by cassava begomoviruses in two leguminous species (Fabaceae) in Yangambi, Northeastern Democratic Republic of Congo. **Archives of Virology**, v. 155, n. 11, p. 1865-1869, 2010.

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

MUHIRE, B. M.; VARSANI, A.; MARTIN, D. P. SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. **Plos One**, v. 9, n. 9, p. e108277, 2014.

- NASCIMENTO, N. N. **Variabilidade e estrutura genética do begomovírus *Euphorbia yellow mosaic virus* infectando hospedeiros não-cultivados no Brasil**. 2015. Dissertação (Mestrado em Proteção Vegetal) - Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas, Rio Largo, 2015.
- NASH, T. E. et al. Functional analysis of a novel motif conserved across geminivirus Rep proteins. **Journal of Virology**, v. 85, n. 3, p. 1182-1192, 2011.
- NAVAS-CASTILLO, J. et al. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, p. 219-248, 2011.
- NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia university Press, 1987.
- NG, T. F. F. et al. Exploring the diversity of plant DNA viruses and their satellites using vector-enabled metagenomics on whiteflies. **PloS One**, v. 6, n. 4, p. e19050, 2011.
- NYLANDER, J. A. A. **MrModeltest2**. v.2.3. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. 2004.
- OHNESORGE, S.; BEJARANO, E. R. Begomovirus coat protein interacts with a small heat-shock protein of its transmission vector (*Bemisia tabaci*). **Insect Molecular Biology**, v. 18, n. 6, p. 693-703, 2009.
- OROZCO, B. M. et al. Functional domains of a geminivirus replication protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 15, p. 9840-9846, 1997.
- PAPLOMATAS, E. J. et al. Molecular characterization of a new sap-transmissible bipartite genome geminivirus infecting tomatoes in Mexico. **Phytopathology**, v. 84, n. 10, p. 1215-1223, 1994.
- PAPROTKA, T.; METZLER, V.; JESKE, H. The first DNA 1-like  $\alpha$  satellites in association with New World begomoviruses in natural infections. **Virology**, v. 404, n. 2, p. 148-157, 2010.
- PATIL, B. L.; FAUQUET, C. M. Cassava mosaic geminiviruses: actual knowledge and perspectives. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, n. 5, p. 685-701, 2009.
- PICÓ, B.; DÍEZ, M. J.; NUEZ, F. Viral disease causing the greatest economic losses to the tomato crop: II. the *Tomato yellow leaf curl virus*: a review. **Scientia Horticulturae**, v. 67, p. 151-196, 1996.
- PITA, J. S. et al. Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. **Journal of General Virology**, v. 82, n. p. 655-665, 2001.

POOJARI, S. et al. A leafhopper-transmissible DNA virus with novel evolutionary lineage in the family geminiviridae implicated in grapevine redleaf disease by next-generation sequencing. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e64194, 2013.

POORNIMA PRIYADARSHINI, C. G. et al. Functional characterization of coat protein and V2 involved in cell to cell movement of *Cotton leaf curl Kokhran virus*-Dabawali. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e26929, 2011.

PRASANNA, H. C.; RAI, M. Detection and frequency of recombination in tomato-infecting begomoviruses of South and Southeast Asia. **Virology Journal**, v. 4, p. 111, 2007.

\_\_\_\_\_. C. et al. The population genomics of begomoviruses: global scale population structure and gene flow. **Virology Journal**, v. 7, p. 220, 2010.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

RAJA, P. et al. Viral genome methylation as an epigenetic defense against geminiviruses. **Journal of Virology**, v. 82, n. 18, p. 8997-9007, 2008.

RAMBAUT, A. **Figtree**: tree figure drawing tool. v1.4.2: Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. 2014. Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>>. Acesso em: 10. Out. 2017.

RAMOS, P. L. et al. *Tomato mottle Taino virus* pseudorecombines with PYMV but not with ToMoV: implications for the delimitation of cis- and trans-acting replication specificity determinants. **Archives of Virology**, v. 148, n. 9, p. 1697-1712, 2003.

RAMOS-SOBRINHO, R. et al. Contrasting genetic structure between two begomoviruses infecting the same leguminous hosts. **Journal of General Virology**, v. 95, n. Pt 11, p. 2540-2552, 2014.

RANA, V. P. et al. *Arsenophonus* GroEL interacts with CLCuV and is localized in midgut and salivary gland of whitefly *B. tabaci*. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e42168, 2012.

RANNALA, B.; YANG, Z. H. Probability distribution of molecular evolutionary trees: A new method of phylogenetic inference. **Journal of Molecular Evolution**, v. 43, n. 3, p. 304-311, 1996.

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, M. R. et al. Bean Dwarf mosaic geminivirus movement proteins recognize DNA in a form- and size-specific manner. **Cell**, v. 95, n. 1, p. 105-113, 1998.

ROJAS, M. R. et al. Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, *Tomato yellow leaf curl virus*. **Virology**, v. 291, n. 1, p. 110-25, 2001.

ROMAY, G.; LECOQ, H.; DESBIEZ, C. *Melon chlorotic mosaic virus* and associated alphasatellite from Venezuela: genetic variation and sap transmission of a begomovirus-satellite complex. **Plant Pathology**, v. 64, n. 5, p. 1224-1234, 2015.

\_\_\_\_\_. et al. Association of an atypical alphasatellite with a bipartite New World begomovirus. **Archives of Virology**, v. 155, n. 11, p. 1843-1847, 2010.

\_\_\_\_\_. et al. First report of potato yellow mosaic virus infecting *Solanum americanum* in Venezuela. **New Disease Reports**, v. 34, p. 20, 2016.

RONQUIST, F. et al. MrBayes 3.2: efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, n. 3, p. 539-542, 2012.

ROOSSINCK, M. J. Mechanisms of plant virus evolution. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, n. 1, p. 191-209, 1997.

ROSARIO, K. et al. Begomovirus-associated satellite dna diversity captured through vector-enabled metagenomic (VEM) surveys using whiteflies (Aleyrodidae). **Viruses**, v. 8, n. 2, p. 36, 2016.

ROUMAGNAC, P. et al. *Alfalfa Leaf Curl Virus*: an aphid-transmitted geminivirus. **Journal of Virology**, v. 89, n. 18, p. 9683-9688, 2015.

ROYE, M. E.; COLLINS, A. M.; MAXWELL, D. P. First report of a begomovirus associated with the common weed *Jatropha gossypifolia* in Jamaica. **Plant Pathology**, v. 55, n. 2, p. 286-286, 2006.

ROZAS, J. et al. DnaSP: DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, v. 19, 2496–2497, 2003.

SÁNCHEZ-CAMPOS, S. et al. Fulfilling Koch's postulates confirms the monopartite nature of tomato leaf deformation virus: a begomovirus native to the New World. **Virus Research**, v. 173, n. 2, p. 286-293, 2013.

SANDERFOOT, A. A.; LAZAROWITZ, S. G. Cooperation in viral movement: the geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery. **Plant Cell**, v. 7, n. 8, p. 1185-1194, 1995.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Getting it together in plant virus movement: cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. **Trends in Cell Biology**, v. 6, n. 9, p. 353-358, 1996.

SANDERFOOT, A. A.; INGHAM, D. J.; LAZAROWITZ, S. G. A viral movement protein as a nuclear shuttle: the geminivirus BR1 movement protein contains domains essential for interaction with BL1 and nuclear localization. **Plant Physiology**, v. 110, n. 1, p. 23-33, 1996.

SANZ, A. I. et al. Genetic variability of natural populations of cotton leaf curl geminivirus, a single-stranded DNA virus. **Journal of Molecular Evolution**, v. 49, n. 5, p. 672-681, 1999.

SATTAR, M. N. et al. Cotton leaf curl disease - an emerging threat to cotton production worldwide. **Journal of General Virology**, v. 94, n. Pt 4, p. 695-710, 2013.

SAUNDERS, K.; LUCY, A.; STANLEY, J. RNA-primed complementary-sense DNA synthesis of the geminivirus African cassava mosaic virus. **Nucleic Acids Research**, v. 20, n. 23, p. 6311-6315, 1992.

\_\_\_\_\_. et al. A unique virus complex causes *Ageratum* yellow vein disease. **PNAS - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 12, p. 6890-6895, 2000.

SCHEFFLER, K.; MARTIN, D. P.; SEOIGHE, C. Robust inference of positive selection from recombining coding sequences. **Bioinformatics**, v. 22, n. 20, p. 2493-2499, 2006. doi:10.1093/bioinformatics/btl427.

SEAL, S. E.; VANDENBOSCH, F.; JEGER, M. J. Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: implications for sustainable control. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 25, n. 1, p. 23-46, 2006.

SETTLAGE, S. B.; SEE, R. G.; HANLEY-BOWDOIN, L. Geminivirus C3 protein: replication enhancement and protein interactions. **Journal of Virology**, v. 79, n. 15, p. 9885-9895, 2005.

SHEPHERD, D. N. et al. *Maize streak virus*: an old and complex 'emerging' pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2010.

SHIVAPRASAD, P. V. et al. Promoters, transcripts, and regulatory proteins of *Mungbean yellow mosaic geminivirus*. **Journal of Virology**, v. 79, n. 13, p. 8149-8163, 2005.

SILVA, S. J. C. et al. High genetic variability and recombination in a begomovirus population infecting the ubiquitous weed *Cleome affinis* in northeastern Brazil. **Archives of Virology**, v. 156, n. 12, p. 2205-2213, 2011.

\_\_\_\_\_. et al. Species diversity, phylogeny and genetic variability of begomovirus populations infecting leguminous weeds in northeastern Brazil. **Plant Pathology**, v. 61, n. 3, p. 457-467, 2012.

SIMMONDS, P. et al. Consensus statement: Virus taxonomy in the age of metagenomics. **Nature Reviews Microbiology**, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/nrmicro/journal/vaop/ncurrent/full/nrmicro.2016.177.html>> Acesso em: 12 fev. 2017.

SIMMONDS-GORDON, R. N. et al. First report of a complete genome sequence for a begomovirus infecting *Jatropha gossypifolia* in the Americas. **Archives of Virology**, v. 159, n. 10, p. 2815-288, 2014.

SNEHI, S. K. et al. Complete nucleotide sequence of *Croton yellow vein mosaic virus* and DNA- $\beta$  associated with yellow vein mosaic disease of *Jatropha gossypifolia* in India. **Virus Genes**, v. 43, n. 1, p. 93-101, 2011b.

\_\_\_\_\_. et al. Molecular identification of a new begomovirus associated with yellow mosaic disease of *Jatropha gossypifolia* in India. **Archives of Virology**, v. 156, n. 12, p. 2303-2307, 2011a.

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.

\_\_\_\_\_; TOWNSEND, R.; CURSON, S. J. Pseudorecombinants between cloned DNAs of two isolates of cassava latent virus. **Journal of General Virology**, v. 66, n. 5, p. 1055-1061, 1985.

STEWART, C. et al. Mixed infection of *Sida jamaicensis* in Jamaica reveals the presence of three recombinant begomovirus DNA A components. **Archives of Virology**, v. 159, n. 9, p. 2509-2512, 2014.

SUNG, Y. K.; COUTTS, R. H. Mutational analysis of potato yellow mosaic geminivirus. **Journal of General Virology**, v. 76, n. 7, p. 1773-1780, 1995.

SUNTER, G.; BISARO, D. M. Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. **Plant Cell**, v. 4, n. 10, p. 1321-1331, 1992.

SUNTER, G. et al. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required for coat protein accumulation while ORF AL3 is necessary for efficient DNA replication. **Virology**, v. 179, n. 1, p. 69-77, 1990.

SWOFFORD, D. L. **PAUP\*- Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods)**: version 4.0b10. Massachusetts: Sinauer Associates, Sunderland, 2003.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, n. 3, p. 585-595, 1989.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

- THRESH, J. M.; FARGETTE, D. The epidemiology of African plant viruses: basic principles and concepts. In: HUGHES, J. D'A.; ODU, B. O. (ed.). **Proceedings of Plant virology in Sub-Saharan Africa**. Ibadan, Nigeria: Intl. Inst. Trop. Agric. 2003. p. 61-111.
- TRINKS, D. et al. Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. **Journal of Virology**, v. 79, n. 4, p. 2517-2527, 2005.
- VAGHI MEDINA, C. G.; MARTIN, D. P.; LÓPEZ LAMBERTINI, P. M. *Tomato mottle wrinkle virus*, a recombinant begomovirus infecting tomato in Argentina. **Archives of Virology**, v. 160, n. 2, p. 581-585, 2015.
- VAN DER WALT, E. et al. Experimental observations of rapid *Maize streak virus* evolution reveal a strand-specific nucleotide substitution bias. **Virology Journal**, v. 5, n. 1, p. 104, 2008.
- VANITHARANI, R. et al. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. **Journal of Virology**, v. 78, n. 17, p. 9487-9498, 2004.
- VARSANI, A. et al. *Capulavirus* and *Grablovirus*: two new genera in the family *Geminiviridae*. **Archives of Virology**, p. 1-13, 2017.
- \_\_\_\_\_. 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.
- VENKATARAVANAPPA, V. et al. Evidence for two predominant viral lineages, recombination and subpopulation structure in begomoviruses associated with yellow vein mosaic disease of okra in India. **Plant Pathology**, v. 64, n. 3, p. 508-518, 2015.
- WALSH, D.; MOHR, I. Assembly of an active translation initiation factor complex by a viral protein. **Genes & Development**, v. 20, n. 4, p. 461-472, 2006.
- WANG, H. et al. Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. **Journal of Virology**, v. 79, n. 12, p. 7410-7418, 2005.
- WARD, B. M. et al. The geminivirus BL1 movement protein is associated with endoplasmic reticulum-derived tubules in developing phloem cells. **Journal of Virology**, v. 71, n. 5, p. 3726-3733, 1997.
- WEBSTER, G. L. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, p. 33-144, 1994.
- WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v. 15, n. 4, p. 323-354, 1951.

ZERBINI, F. M. et al. ICTV Virus taxonomy profile: *Geminiviridae*. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 2, p. 131-133, 2017.

ZHANG, J. et al. V2 protein encoded by Tomato yellow leaf curl China virus is an RNA silencing suppressor. **Virus Research**, v. 163, n. 1, p. 51-58, 2012.

ZHOU, X. Advances in understanding begomovirus satellites. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, p. 357-81, 2013.

\_\_\_\_\_. Four DNA-A variants among Pakistani isolates of cotton leaf curl virus and their affinities to DNA-A of geminivirus isolates from okra. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 915-923, 1998.

\_\_\_\_\_. et al. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 2101-2111, 1997.