

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
UNIDADE ACADÊMICA CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – PRODUÇÃO VEGETAL E
PROTEÇÃO DE PLANTAS

SHEILA DOS SANTOS TAVARES

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BEGOMOVÍRUS ASSOCIADOS A *Sida* spp. E
Blainvillea rhomboidea

RIO LARGO – AL

2011

SHEILA DOS SANTOS TAVARES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BEGOMOVÍRUS ASSOCIADOS A *Sida* spp. E
*Blainvillea rhomboidea***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal e Proteção de Plantas.

Orientadora: Iraíldes Pereira Assunção

RIO LARGO - AL

2011

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Maria Auxiliadora G. da Cunha

T231c Tavares, Sheila dos Santos.
Caracterização molecular de begomovírus associados a *Sida* spp. e *Blainvillea rhomboidea* / Sheila dos Santos Tavares. – 2011.
78 f. : il.

Orientadora: Iraíldes Pereira Assunção.
Dissertação (mestrado em Agronomia: Produção Vegetal e Proteção de Plantas) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2011.

Bibliografia: f. 62-77.

Anexos: f. 77-78

1. Begomovírus. 2. Plantas daninha. 3. Recombinação. I. Título.

CDU: 632.38*Begomovírus

TERMO DE APROVAÇÃO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BEGOMOVÍRUS ASSOCIADOS A *Sida spp. e Blainvillea rhomboidea*

Sheila dos Santos Tavares

(Matrícula: 09230017)

Dissertação apresentada e avaliada pela banca examinadora em 29 de agosto de 2011, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal e Proteção de Plantas do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Unidade Acadêmica Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas.



PROF^a. DR^a. IRAÍLDES PEREIRA ASSUNÇÃO
CECA/UFAL (ORIENTADORA)



PROF. DR. FRANCISCO MURILO ZERBINI JÚNIOR
FITOPATOLOGIA/UFV



PROF^a. DR^a. MARIA DE FÁTIMA SILVA MUNIZ
CECA/UFAL



DR^a. SARAH JACQUELINE CAVALCANTI DA SILVA

À minha mãe, Maria Selma dos Santos Tavares, ao meu pai Rivanildo Tavares da Silva pelo esforço e dedicação na minha criação;

Ao meu noivo e companheiro, Roberto Ramos Sobrinho, pela compreensão, carinho e por se fazer presente em todos os momentos de dificuldade e alegria.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por me dar força e sustentação durante as adversidades encontradas na realização deste trabalho;

A Universidade Federal de Alagoas e a Universidade Federal de Viçosa, pelo apoio institucional;

A todos que fazem o Centro de Ciências Agrárias;

À Fapeal pelo apoio com a bolsa de mestrado e pela orientação na confecção de todos os relatórios;

Aos Professores Iraíldes Pereira Assunção e Gaus Silvestre Andrade de Lima pela orientação, confiança, amizade e ensinamentos passados durante todo esse período. Sem eles nada disso seria possível;

Aos Professores Francisco Murilo Zerbini Júnior e Polyane Alfenas Zerbini, por terem apostado em minha capacidade mesmo sem me conhecer (serei sempre grata);

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Agronomia (área de concentração produção de planta e proteção de planta) da Universidade Federal de Alagoas, pelos ensinamentos transmitidos e em especial, à professora Dr^a. Maria de Fátima Silva Muniz pelos ensinamentos, simplicidade e dedicação em tudo que faz, e pela pessoa maravilhosa que é;

Ao meu avô materno, José Vicente, e minha avó paterna, Edite Tavares, por acreditarem e ensinarem sempre que eu podia ser mais;

Aos meus irmãos Rondinelle dos Santos Tavares e Rivanildo Tavares da Silva Filho e as minhas sobrinhas que tanto amo Nathalia Maria Omena Tavares e Gabrielle Omena Tavares por estarem presentes em minha vida;

Aos meus amigos do Laboratório de Fitopatologia Molecular, Arthur, Edilene, Érica, Isadora, Joyce, Liliâne e Mayra em especial ao meu amigo Mariote Neto pelos ensinamentos;

Aos meus amigos do Laboratório de Virologia Vegetal Molecular da Universidade Federal de Viçosa André, Adriana, Alison, Álvaro, Amanda, Ana Angélica, Ana Carolina, César, Fábio, Fernanda, Glória, Joaquim, Jorge, Larissa, Lenin, Márcio, Marcos, Mercedes, Pedro, Renan, Sarah Cavalcanti Silvia e Tathiana pelo apoio e amizade;

Aos colegas de mestrado Danilo, Franklin, Leonardo, Marília e Sérgio que cursaram disciplinas comigo, pelo apoio e amizade;

Aos meus amigos e familiares, por terem suportado e entendido minha ausência e por acreditarem que não existe distância para uma verdadeira amizade;

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

Begomovírus são vírus de DNA circular fita simples transmitidos por mosca branca, os quais são frequentemente associados com plantas daninhas, as quais podem servir como reservatórios naturais de vírus que causam epidemias em plantas cultivadas. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a diversidade de begomovírus infectando plantas daninhas no Brasil, como um passo para acessar sua importância como reservatórios naturais desses vírus. DNA total foi extraído a partir de plantas daninhas coletadas em Viçosa (Minas Gerais) e alguns municípios do estado de Alagoas em 2009 e 2010. Os genomas virais foram amplificados por RCA, clonados e sequenciados. As sequências foram usadas para comparações com outros begomovírus e análises filogenética e de recombinação. Um total de 26 clones de DNA-A foram obtidos. Análise de sequência indicou a presença de dez diferentes begomovírus. Todos os isolados originários de *Blainvillea rhomboidea* pertencem a uma única espécie viral, *Blainvillea yellow spot virus* (BIYSV), sugerindo que BIYSV pode ser o único begomovírus presente nesta espécie de planta invasora. Quatro vírus representam espécies novas, para as quais os seguintes nomes são propostos: Sida yellow net virus (SiYNV) obtido de *Sida micrantha*, Sida mottle Alagoas virus (SiMoAV) obtido de *Sida urens* e *Sida* sp., Sida yellow blotch virus (SiYBV) e Sida yellow mosaic Alagoas virus (SiYMAV) obtidos de *S. urens*. Eventos de recombinação foram detectados no SiYBV, isolados BR:Rla1:10 e BR:Rla2:10, com BR:CPH1:10 (também SiYBV) e um vírus desconhecido como possíveis parentais, e no SiYNV, isolado BR:Vic2:10, com BR:Vsa2:10 (SiMoAV) e *Sida mottle virus* (SiMoV) como possíveis parentais. Estes resultados constituem uma evidência adicional de que recombinação é um importante processo evolutivo na geração de variabilidade genética e evolução de begomovírus.

Palavras-chave: Begomovírus. Plantas daninhas. Recombinação.

ABSTRACT

Begomoviruses are whitefly-transmitted, single-stranded DNA viruses which are often associated with weed plants, which may act as natural reservoirs of viruses that cause epidemics in crop plants. The aim of this study was to characterize the diversity of begomoviruses infecting weeds in Brazil, as a step to assess their importance as natural reservoirs of these viruses. Total DNA was extracted from weeds collected in Viçosa (Minas Gerais state) and some municipalities of Alagoas state in 2009 and 2010. The viral genomes were amplified by RCA, cloned and sequenced. The sequences were used for comparisons with other begomoviruses, phylogenetic and recombination analyses. A total of 26 DNA-A clones were obtained. Sequence analysis indicated the presence of ten different begomoviruses. All isolates originating from samples of *Blainvillea rhomboidea* belonged to a single viral species, *Blainvillea yellow spot virus* (BIYSV), suggesting that BIYSV may be the only begomovirus present in this ubiquitous weed species. Four viruses represent new species, for which the following names are proposed: Sida yellow net virus (SiYNV) obtained from *Sida micrantha*, Sida mottle Alagoas virus (SiMoAV) obtained from *Sida urens* and *Sida* sp., Sida yellow blotch virus (SiYBV) and Sida yellow mosaic Alagoas virus (SiYMAV) obtained from *S. urens*. Recombination events were detected in the SiYBV isolates BR:Rla1:10 and BR:Rla2:10, with BR:CPH1:10 (also SiYBV) and an unknown virus as putative parents, and in the SiYNV isolate BR:Vic2:10, with BR:Vsa2:10 (SiMoAV) and *Sida mottle virus* (SiMoV) as putative parents. These results constitute further evidence that recombination is an important evolutionary process on the generation of genetic variability and on the evolution of begomoviruses.

Keywords: Begomoviruses. Weeds. Recombination.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação esquemática do genoma do *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV), espécie-tipo do gênero *Begomovirus*. Os círculos representam o genoma viral, com dois componentes (DNA-A e DNA-B) de aproximadamente 2.600 nucleotídeos cada. Uma sequência de aproximadamente 200 nucleotídeos, denominada região comum (CR), contém a origem de replicação viral, com uma estrutura em forma de grampo e uma sequência invariável de nove nucleotídeos (TAATATT↓AC), conservada em todos os membros da família *Geminiviridae*. A seta (↓) indica o sítio de início da replicação do DNA viral por círculo rolante. As setas azuis e vermelhas indicam os genes virais e a direção em que ocorre a transcrição (viral e complementar, respectivamente). Reproduzido de Gutierrez *et al.*, (2004).
- Figura 2 - Plantas daninhas mostrando sintomas típicos de infecção por begomovírus como: mosaico amarelo e deformação do limbo foliar. A - *Sida* sp.; B - *Sida santaremnensis* e C - *Sidastrum micranthum*.
- Figura 3 - Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) de amplicons obtidos a partir de amostras de DNA total amplificado via RCA. **M**, marcador de comprimento (“1 Kb plus DNA ladder”, em nucleotídeos); **1-9**, amplicons obtidos a partir da amostras coletadas em Viçosa-MG; **10-18**, amplicons obtidos a partir das amostras coletadas em Alagoas (**10,15, 18**, Rio Largo; **11,12**, Viçosa; **13**, Maragogi; **14**, Chã Preta; **16**, Junqueiro; **17**, Limoeiro).
- Figura 4 - Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) de amplicons obtidos a partir de amostras de DNA total e, submetidos à clivagem com enzima de restrição. **M**, marcador de comprimento (“1 Kb plus DNA ladder”, em nucleotídeos); **1-9**, amplicons obtidos a partir da amostra coletada em Viçosa-MG (**1, 2, 4**, enzima *Bam* HI. **3**, enzima *Eco* RV. **5-9**, enzima *Apa* I) e **10-18** coletadas em Alagoas: **10**, Rio Largo; **11,12**, Viçosa; **13**, Maragogi; **14** Chã Preta, enzima *Bam* HI; **15**, Rio Largo, enzima *Hind* III; **16**, Junqueiro; **17**, Limoeiro; **18**, Rio Lagro, enzima *Apa* I.
- Figura 5 - Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) da clivagem de DNA plasmidial proveniente da clonagem de componentes genômicos, com as enzimas *Bam* HI, *Eco* RV e *Apa* I. **M**, marcador de comprimento (“1 Kb plus DNA ladder”, em nucleotídeos); **1-45**, clones obtidos a partir de amostras coletas em Viçosa-MG: **1-10** e **16-20**, enzima *Bam* HI. **11-15**, enzima *Eco* RV, **21-45**, enzima *Apa* I
- Figura 6 - Porcentagem de identidade de nucleotídeos entre isolados de begomovírus obtidos a partir de plantas daninhas e outros begomovirus descritos anteriormente.

- Figura 7 - Amostras apresentando sintomas típicos de infecção por begomovírus, de onde foram obtidas as novas espécies de begomovírus. **A** Sida yellow net virus – SiYNV (*Sidastrum micranthum*), **B** Sida mottle Alagoas virus – SiMoAV (*Sida* sp.), **C** Sida yellow blotch virus – SiYBV (*Sida urens*) e **D** Sida yellow mosaic Alagoas virus - SiYMAV (*Sida urens*).
- Figura 8 - Árvore filogenética baseada nas sequências do DNA-A dos vírus detectados nas amostras de plantas daninhas coletadas em Minas Gerais e Alagoas. A árvore inclui espécies de begomovírus descritas anteriormente no Brasil e a espécie *Tomato leaf curl New Delhi virus* - ToLCNDV (U15015), usada como outgroup. A árvore foi obtida pelo método de “Neighbour-Joining”. Os números em cada ramo indicam o valor de “bootstrap” (2.000 repetições). As dez espécies virais detectadas nas amostras estão destacadas.
- Figura 9 - Evidência filogenética de recombinação entre begomovírus já descritos no Brasil e os isolados das espécies determinadas em plantas daninhas descritas nesse trabalho. A formação de uma rede de uma árvore bifurcada segue a ocorrência de recombinação.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Localização, hospedeiros e ano de coleta das amostras coletadas em Alagoas e Minas Gerais nos anos de 2009 e 2010
- Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento dos componentes genômicos de begomovírus.
- Tabela 3 - Código da amostra, procedência das plantas daninhas e lista de clones completamente sequenciados.
- Tabela 4 - Classificação taxonômica dos isolados obtidos das amostras de plantas daninhas coletadas em Minas Gerais e Alagoas
- Tabela 5 - Aminoácidos (aa) das ORFs de cada espécie viral.
- Tabela 6 - Eventos de recombinação detectados entre os begomovirus já descritos no Brasil e os isolados das espécies tentativas de plantas daninhas descritas nesse trabalho.
- Tabela S1 - Isolados de begomovirus utilizados para comparação filogenética com os isolados de plantas daninhas.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	Família <i>Geminiviridae</i>	14
2.2	Replcação viral	16
2.3	Movimento do vírus na planta	18
2.4	Evolução dos geminivírus	20
2.5	Variabilidade e estrutura genética de populações de begomovírus	22
2.5.1	Mutação	23
2.5.2	Recombinação	24
2.5.3	Pseudo-recombinação	26
2.5.4	Estrutura genética de populações de geminivírus	28
2.6	Diversidade de begomovírus infectando plantas cultivadas e invasoras no Brasil	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1	Coleta de material vegetal e obtenção de isolados virais	37
3.2	Clonagem e sequenciamento dos genomas virais	39
3.3	Comparações de sequências e análise filogenética	41
3.4	Análise da recombinação	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1	Clonagem e sequenciamento dos genomas virais	43
4.1.1	Amplificação dos genomas virais completos	43
4.1.2	Clonagem dos fragmentos correspondentes a uma cópia do genoma viral	45
4.2	Caracterização molecular	46
4.3	Análise filogenética	53
4.4	Análise da recombinação	56
5	CONCLUSÕES	59
	REFERÊNCIAS	60
	ANEXOS	75
	MATERIAL SUPLEMENTAR	76

INTRODUÇÃO

A família *Geminiviridae* engloba vírus cujo genoma é constituído por DNA circular de fita simples, encapsidado por uma única proteína estrutural que confere à partícula uma estrutura icosaédrica geminada. A família é composta pelos gêneros *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus*, definidos com base no inseto vetor, gama de hospedeiros e organização genômica (Stanley *et al.*, 2005). Os begomovírus possuem um ou dois componentes genômicos, são transmitidos pela mosca-branca *Bemisia tabaci* e infectam plantas dicotiledôneas.

Espécies de begomovírus que ocorrem no “Velho Mundo” possuem apenas um componente genômico e frequentemente estão associados a um DNA satélite denominado DNA β (Mansoor *et al.*, 2001). Por outro lado, begomovírus encontrados no “Novo Mundo” possuem dois componentes denominados DNA-A e DNA-B. No DNA-A encontram-se os genes envolvidos na replicação e encapsidação da progênie viral, enquanto no DNA-B encontram-se os genes responsáveis pelos movimentos intra- e intercelular (Lazarowitz, 1992). Ambos os componentes são requeridos para a infecção sistêmica do hospedeiro. Dentre os begomovírus de maior importância econômica estão *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV – espécie tipo do gênero), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) e *African cassava mosaic virus* (ACMV).

O método mais seguro para identificação de uma espécie de begomovírus tem sido a determinação da sequência completa de nucleotídeos do DNA-A. Devido à dificuldade inerente na identificação de espécies, o Grupo de Estudos de *Geminiviridae* do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) propôs um novo critério para demarcação de espécie, sendo o valor mínimo de 89% de identidade de nucleotídeos entre sequências completas do DNA-A para espécies de *Begomovirus* (Fauquet *et al.*, 2008). Contudo a clonagem e sequenciamento do genoma completo são complexos devido às dificuldades no isolamento da forma replicativa dos begomovírus bipartidos. Recentemente, Inoue-Nagata *et al.* (2004) desenvolveram um método simples de clonagem utilizando amplificação por círculo rolante (RCA – *rolling-circle amplification*) seguido por digestão com enzima de restrição e ligação ao vetor. Este método tem facilitado os procedimentos de clonagem e rápida realização de sequenciamento de um grande número de isolados. A utilização dessas técnicas tem permitido a realização de estudos de variabilidade genética, epidemiologia, além de fornecer suporte a programas de melhoramento genético de espécies cultivadas.

Apesar dos inúmeros relatos de begomovírus infectando plantas invasoras no Brasil a caracterização molecular desses isolados tem recebido pequena atenção. No entanto, resultados preliminares indicam que a exemplo do que ocorre com plantas cultivadas a variabilidade é muito grande (Lima *et al.*, 2001; Viana *et al.*, 2002; Assunção *et al.*, 2006; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008). A caracterização desses isolados poderá trazer importantes informações sobre aspectos ecológicos e evolutivos a respeito dos *Begomovirus*. Poderá também contribuir para elucidar se esses isolados podem infectar plantas cultivadas de importância para a região Nordeste, como tomate, feijão, pimentão e caupi.

O objetivo desse estudo foi caracterizar a diversidade dos begomovírus que infectam plantas invasoras no Brasil (famílias Malvaceae e Asteraceae), como um passo para acessar sua importância como reservatórios naturais e fontes de inóculo desses vírus.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Família Geminiviridae

Os vírus pertencentes à família *Geminiviridae* apresentam genoma composto de DNA de fita simples (ssDNA) circular encapsidado em um capsídeo icosaédrico geminado. A família é dividida em quatro gêneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus*, com base no tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros, organização genômica e relacionamento filogenético (Stanley *et al.*, 2005). O gênero *Mastrevirus* inclui os geminivírus com um componente genômico, transmitidos por diversas cigarrinhas (Homoptera: Cicadellidae) a plantas monocotiledôneas. A espécie-tipo é o *Maize streak virus* (MSV), um vírus economicamente importante para a cultura do milho (*Zea mays*). No gênero *Curtovirus* estão os geminivírus com um componente genômico, transmitidos por diversas cigarrinhas (Homoptera: Cicadellidae) a plantas dicotiledôneas. O *Beet severe curly top virus* (BSCTV) é a espécie-tipo e mais importante economicamente. O gênero *Topocuvirus* possui uma única espécie, o *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV), com um componente genômico e transmitida pela cigarrinha *Micrutalis malleifera* (Homoptera: Auchenorrhyncha) a plantas dicotiledôneas. O gênero *Begomovirus* engloba espécies com um ou dois componentes genômicos, transmitidas pela mosca-branca *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) a plantas dicotiledôneas (Stanley *et al.*, 2005). A espécie-tipo é o *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) (Fauquet *et al.*, 2008).

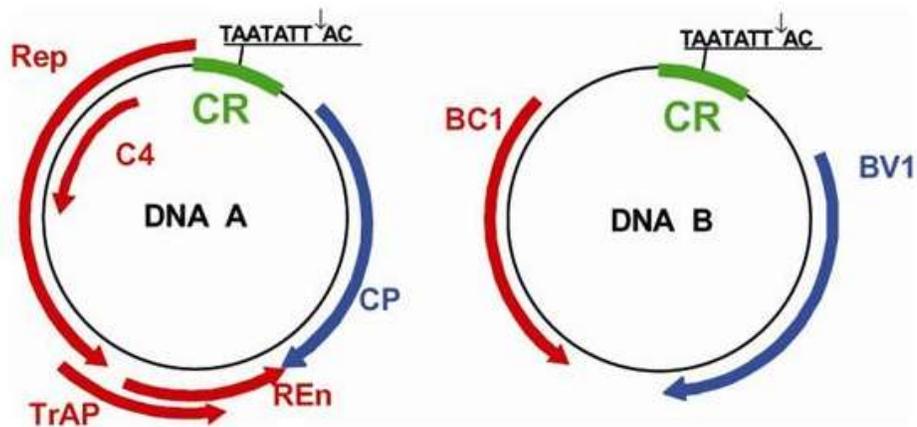
Os begomovírus do “Velho Mundo” (Europa, Ásia e África) possuem em sua maioria um componente genômico (monossegmentados), e estão frequentemente associados a moléculas de ssDNA circular conhecidas como DNA β (betassatélites) e DNA-1 (alfassatélites) (Briddon, 2003; Briddon; Stanley, 2006). Os betassatélites contêm uma ORF, β C1, que codifica uma proteína responsável pela indução de sintomas e que atua como supressora do silenciamento gênico pós-transcricional (Cui *et al.*, 2004; Cui *et al.*, 2005; Briddon; Stanley, 2006). Os alfassatélites são semelhantes ao componente genômico denominado DNA-R dos nanovírus, os quais contêm uma ORF que codifica uma proteína associada à replicação (Rep), seguida de uma região rica em adenina e uma estrutura em forma de grampo que inclui a origem de replicação (Briddon; Stanley, 2006). Os alfassatélites podem replicar autonomamente, mas requerem um vírus auxiliar para infecção sistêmica da planta e transmissão por inseto (Saunders; Stanley,

1999; Saunders *et al.*, 2000; Saunders *et al.*, 2002). Recentemente, alfassatélites foram identificados no Brasil e na Venezuela, associados aos begomovírus bissegmentados *Cleome leaf crumple virus* (CILCrV), *Euphorbia mosaic virus 1* (EuMV) e Melon chlorotic mosaic virus (MeCMV), sendo esses os primeiros relato de DNAs satélites associados a begomovírus ocorrendo naturalmente no “Novo Mundo” (Américas) (Paprotka *et al.*, 2010c; Romay *et al.*, 2010).

Os begomovírus do “Novo Mundo” possuem dois componentes genômicos (bissegmentados), denominados DNA-A e DNA-B, cada um com aproximadamente 2600 nucleotídeos (Figura 1). Os dois componentes genômicos de uma mesma espécie viral não possuem identidade entre as suas sequências, exceto por uma região com aproximadamente 200 nucleotídeos denominada região comum (RC), que inclui a origem de replicação (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999).

O DNA-A dos begomovírus bissegmentados pode codificar de quatro a seis proteínas: uma proteína associada à replicação, Rep (“replication-associated protein”), iniciadora do mecanismo de replicação por círculo rolante, com propriedade de ligação a ácidos nucleicos, endonuclease e ATPase (Fontes *et al.*, 1992; Orozco *et al.*, 1997); uma proteína transativadora, TrAP (“trans-activating protein”), fator transcricional dos genes *CP* e *NS* e que também atua como supressora do silenciamento gênico (Sunter; Bisaro, 1992; Voinnet *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2005); a proteína Ren (“replication-enhancer protein”), fator acessório da replicação viral (Pedersen; Hanley-Bowdoin, 1994; Sunter *et al.*, 1990); e a proteína capsidial (“coat protein”, CP), que além de formar o capsídeo viral é essencial para a transmissão do vírus pelo inseto vetor (Bridson *et al.*, 1990; Hofer *et al.*, 1997a).

Figura 1 - Representação esquemática do genoma do *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV), espécie-tipo do gênero *Begomovirus*. Os círculos representam o genoma viral, com dois componentes (DNA-A e DNA-B) de aproximadamente 2.600 nucleotídeos cada. Uma sequência de aproximadamente 200 nucleotídeos, denominada região comum (CR), contém a origem de replicação viral, com uma estrutura em forma de grampo e uma sequência invariável de nove nucleotídeos (TAATATT↓AC), conservada em todos os membros da família *Geminiviridae*. A seta (↓) indica o sítio de início da replicação do DNA viral por círculo rolante. As setas azuis e vermelhas indicam os genes virais e a direção em que ocorre a transcrição (viral e complementar, respectivamente). Reproduzido de Gutierrez *et al.*, (2004).



O gene *AV2* (“pre-coat”) está presente apenas nos begomovírus do “Velho Mundo”, e atua no movimento do vírus na planta (Padidam *et al.*, 1996). O gene *AC4* codifica uma proteína supressora de silenciamento gênico (Vanitharani *et al.*, 2004). O DNA B codifica a proteína MP (“movement protein”), envolvida no movimento célula-a-célula do vírus por meio do aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas (Noueiry *et al.*, 1994), e a proteína NSP (“nuclear shuttle protein”), responsável pelo transporte do DNA através do envelope nuclear (Noueiry *et al.*, 1994; Sanderfoot *et al.*, 1996).

2.2 Replicação viral

No processo de infecção dos geminivírus, as partículas virais são inoculadas na planta pelo inseto vetor e o genoma viral (ssDNA) se desassocia de forma espontânea do capsídeo (Lazarowitz, 1992; Palmer & Rybicki, 1998). No interior da célula o ssDNA viral é transportado para o núcleo, onde é convertido em um intermediário de fita dupla (dsDNA) denominado forma

replicativa (RF). A maneira como esta conversão ocorre não é conhecida, no entanto evidências indiretas, como a necessidade de desestabilização local do dsDNA para o iniciação da replicação por círculo rolante em procariotos por “strand-nicking enzimas”, indicam que é realizada por fatores do hospedeiro. A RF serve como molde para síntese dos novos componentes genômicos e também para a transcrição dos genes virais. O genoma viral é replicado via mecanismo de círculo rolante semelhante ao utilizado pelos bacteriófagos ϕ X174 e M13, utilizando a RF como molde (Stanley, 1995; Stenger *et al.*, 1991).

A origem de replicação (*ori*) está localizada na região intergênica comum entre os dois componentes genômicos. A sequência da *ori* é conservada entre componentes de um mesmo vírus, porém variável entre espécies, com exceção de uma região de aproximadamente 30 nucleotídeos conservada entre todas as espécies (Davies *et al.*, 1987; Lazarowitz, 1992). Nesta região se localiza uma sequência repetida e invertida composta predominantemente por guanina e citosina, formando uma estrutura conservada em forma de grampo (“structurally-conserved element”, SCE), com uma sequência invariável (5'-TAATATTAC-3') encontrada em todos geminivírus, que constitui o domínio funcional da origem de replicação (Heyraud-Nitschke *et al.*, 1995; Orozco & Hanley-Bowdoin, 1998). É nesse nonanucleotídeo que ocorre a clivagem (TAATATT↓AC) que inicia o processo de replicação por círculo rolante (Fontes *et al.*, 1994; Laufs *et al.*, 1995). A clivagem é realizada pela proteína Rep, que atua como endonuclease sítio-específica com requerimento de estrutura e sequência (Laufs *et al.*, 1995; Orozco; Hanley-Bowdoin, 1998). Na região comum encontram-se as sequências específicas para ligação da proteína Rep (Fontes *et al.*, 1994; Fontes *et al.*, 1992) e regiões promotoras da RNA polimerase tipo II de plantas, responsável pela transcrição dos genes virais (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999).

O sítio de ligação de REP ao DNA viral está localizado entre a caixa TATA do gene *Rep* e a SCE (Orozco; Hanley-Bowdoin, 1998), sendo constituído por duas sequências em repetição direta e pelo menos uma repetição invertida denominadas “iterons” (Arguello-Astorga *et al.*, 1994). A ligação de Rep aos iterons é essencial para o início da replicação. Após a ligação de Rep ao DNA viral e estabilização do complexo formado por Rep, Ren e fatores do hospedeiro, a proteína Rep cliva o nonanucleotídeo localizado na SCE, dando início à replicação por círculo rolante (Gutierrez, 1999). O reconhecimento pela proteína Rep é considerado vírus-específico (Arguello-Astorga *et al.*, 1994; Harrison; Robinson, 1999; Ramos *et al.*, 2003), de modo que Rep só inicia a replicação de DNAs cognatos. O domínio funcional de Rep foi mapeado na sua região

N-terminal, e este inclui o domínio de ligação a DNA, conservado em todas as proteínas Rep (Chatterji *et al.*, 1999; Gladfelter *et al.*, 1997; Jupin, 1995). Uma vez que o reconhecimento e ligação aos iterons por Rep é específico, foi proposto que esta depende da sequência de nucleotídeos dos iterons e dos aminoácidos de um motivo conservado na proteína Rep denominado domínio relacionado aos iterons (“iteron-related domain”, IRD) (Arguello-Astorga; Ruiz-Medrano, 2001). Porém, a replicação do DNA-B do *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) pela Rep do *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) indica que a interação entre os aminoácidos do IRD e os iterons não é a única forma de reconhecimento da origem de replicação, uma vez que tanto os iterons quanto os IRDs são diferentes entre esses dois vírus (Andrade *et al.*, 2006b). Além disso, a ausência de iterons nos DNAs satélites associados a begomovírus é uma evidência adicional de que outros fatores afetam o reconhecimento da origem de replicação pela proteína Rep (Lin *et al.*, 2003; Stanley, 2004).

2.3 Movimento do vírus na planta

O movimento do vírus no interior do hospedeiro pode ser dividido em dois processos: movimento célula-a-célula via plasmodesmas, e movimento a longa distância, no qual o vírus atinge o sistema vascular e é transportado sistemicamente para toda a planta.

Como os begomovírus replicam no núcleo da célula hospedeira, necessitam de uma etapa adicional de transporte do núcleo para o citoplasma, a qual é realizada pela proteína NSP (Palmer; Rybicki, 1998). Já a proteína MP associa-se à membrana celular e altera o limite de exclusão dos plasmodesmas, viabilizando o transporte do genoma viral (Noueiry *et al.*, 1994). Estas duas proteínas atuam de forma cooperativa para mediar o tráfego intra- e intercelular do DNA viral (Sanderfoot; Lazarowitz, 1995), permitindo ao vírus infectar sistemicamente o hospedeiro. A interação direta das proteínas MP e NSP *in vitro* foi demonstrada para o TGMV, utilizando-se o sistema duplo-híbrido de levedura (Mariano *et al.*, 2004). A interação *in vivo* entre NSP e MP do *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) foi recentemente demonstrada, também utilizando-se o sistema duplo-híbrido levedura. Nestes estudos foi identificada uma GTPase citoplasmática designada NIG (NSP-interacting GTPase), que interage com NSP de begomovírus *in vitro* e *in vivo* e promove o transporte da proteína viral do núcleo para o citoplasma, onde ela é redirecionada para a superfície da célula para interagir com MP (Carvalho *et al.*, 2008).

Dois modelos tem sido propostos para explicar o movimento intracelular de begomovírus (Levy; Tzfira, 2010). No primeiro modelo, denominado “couple-skating” (Kleinow *et al.*, 2008), NSP transporta ssDNA ou dsDNA do núcleo para a periferia da célula e, no citoplasma, MP atua nos plasmodesmas para facilitar o movimento célula-a-célula do complexo NSP-DNA (Frischmuth *et al.*, 2004; Frischmuth *et al.*, 2007; Kleinow *et al.*, 2008; Sanderfoot; Lazarowitz, 1995). No segundo modelo, denominado “relay-race”, NSP inicialmente transporta o dsDNA do núcleo para o citoplasma. No citoplasma, o dsDNA se associa a MP, e o complexo MP-dsDNA se movimenta célula-a-célula através dos plasmodesmas (Noueiry *et al.*, 1994; Rojas *et al.*, 1998).

Para mastrevírus, curtovírus e begomovírus monossegmentados, a proteína CP é necessária para os movimentos célula-a-célula e a longa distância (Rojas *et al.*, 2001; Gafni; Epel, 2002). Além da CP, as proteínas V1 e C4 também são necessárias para o movimento de begomovírus monossegmentados. No caso de *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), a CP é responsável pelo transporte do DNA do núcleo para o citoplasma, funcionando como uma proteína análoga a NSP dos begomovírus bissegmentados, e o movimento célula-a-célula através do plasmodesma é mediado pelas proteínas C4 e/ou V1 (Rojas *et al.*, 2001; Rojas *et al.*, 2005b). Recentemente, foi demonstrado que a proteína C4 do curtovírus *Beet severe curly top virus* (BSCVT) é capaz de se ligar de forma não específica a ssDNA e a dsDNA, é essencial para o desenvolvimento de sintomas, e quando expressa em plantas infectadas com mutantes deficientes para C4 pode complementar *in trans* o movimento sistêmico. Em conjunto, esses dados sugerem o envolvimento de C4 no movimento desse vírus (Teng *et al.*, 2010).

A proteína CP é dispensável para o estabelecimento da infecção sistêmica de begomovírus bissegmentados na maioria dos casos já estudados (Rojas *et al.*, 2005a). Tanto MP quanto NSP reconhecem o DNA viral de maneira específica com relação à forma e comprimento (Rojas *et al.*, 1998; Gilbertson *et al.*, 2003), o que elimina a necessidade da proteína capsidial para o movimento a longa distância.

Raras exceções, como o begomovírus bissegmentado *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), são capazes de infectar sistemicamente alguns hospedeiros na ausência do DNA-B cognato (Galvão *et al.*, 2003; Fontenelle *et al.*, 2007).

2.4 Evolução dos geminivírus

Os geminivírus podem ter evoluído a partir de um replicon primitivo de DNA extracromossomal, presente em procariotos ou em ancestrais primitivos das plantas (Rojas *et al.*, 2005b). Evidências indiretas, como características conservadas com as proteínas iniciadoras da replicação de replicons de procariotos e eucariotos contemporâneos (Campos-Olivas *et al.*, 2002; Ilyina & Koonin, 1992), presença de mRNAs policistrônicos, e a capacidade dos geminivírus de replicarem em *Agrobacterium tumefaciens* (Ridgen *et al.*, 1996; Selth *et al.*, 2002), apóiam esta hipótese. Durante a co-evolução com seus hospedeiros, estes replicons de DNA teriam adquirido novos genes por meio de recombinação com o DNA do hospedeiro ou com outros replicons (revisado por Rojas *et al.*, (2005b).

Estudos filogenéticos propõem que os geminivírus são derivados de um ancestral comum que possuía apenas um componente, infectava monocotiledôneas e era transmitido por cigarrinhas (Rybicki, 1994; Rojas *et al.*, 2005b). Comparações de sequências entre espécies dos gêneros *Mastrevirus*, *Curtovirus* e *Begomovirus* demonstraram que as primeiras são mais divergentes entre si, o que sugere que os mastrevirus evoluíram por um período de tempo mais longo. O processo evolutivo levou à capacidade de infecção de plantas dicotiledôneas e em seguida à transmissão pela mosca-branca, uma vez que existem mastrevírus (transmitidos por cigarrinhas) que infectam dicotiledôneas, mas até o presente não foram encontrados geminivírus transmitidos por mosca-branca que infectem monocotiledôneas. Esse ancestral dos begomovírus modernos possuía apenas um componente. A aquisição do segundo componente teria ocorrido antes da separação dos continentes, uma vez que os begomovírus bissegmentados são encontrados tanto no “Velho Mundo” como no “Novo Mundo”. Análises filogenéticas dos betassatélices e seus begomovírus associados sugerem que o satélite e o vírus auxiliar co-evoluíram como consequência do isolamento geográfico e adaptação ao hospedeiro (Zhou *et al.*, 2003; Rojas *et al.*, 2005b). Membros do gênero *Curtovirus* seriam derivados de antigas recombinações entre mastrevírus e begomovírus, resultando na aquisição da CP de um mastrevírus ancestral transmitido por uma cigarrinha primitiva, ao passo que um begomovírus teria contribuído com os genes associados à replicação (Rybicki, 1994; Padidam *et al.*, 1995). Outro evento de recombinação foi identificado para o TPCTV, o único membro do gênero *Topocuvirus*, que teria surgido após recombinação entre um curtovírus ancestral e um vírus que

não possui semelhança com nenhum outro geminivírus, o que sugere que outros geminivírus, não relacionados com vírus pertencentes aos quatro gêneros atualmente reconhecidos, podem estar presentes no campo (Bridson *et al.*, 1996). De fato, tais vírus têm sido recentemente identificados e caracterizados (Yazdi *et al.*, 2008; Varsani *et al.*, 2009; Bridson *et al.*, 2010a).

Atualmente, com base em análises filogenéticas do componente DNA-A de 212 espécies, os begomovírus estão classificados em sete diferentes grupos de acordo com sua origem geográfica ou planta hospedeira (Padidam *et al.*, 1995; Fauquet *et al.*, 2008). Os begomovírus do “Velho Mundo” segregam em grupos originados na África, Índia, Ásia e Japão. Entretanto, um número crescente de vírus, os quais são referidos como “outsiders”, não se encaixa nesses grupos baseados em região geográfica ou hospedeira. Esses vírus são originários da Indochina, Indonésia e Austrália. Begomovírus do “Novo Mundo” formam grupos de acordo com a origem (América Central ou do Sul). Duas espécies originárias do Vietnã isoladas de *Corchorus* sp. são relacionadas aos begomovírus do “Novo Mundo”, e formam um grupo referido como “corchovirus” (Ha *et al.*, 2006; Ha *et al.*, 2008). Dois grupos de vírus, um infectando leguminosas originárias da Índia e Sudeste da Ásia (“legumovirus”) e outro composto de vírus isolados de *Ipomoea* spp., particularmente batata-doce (*I. batatas*) originários da América, Ásia e Europa (“sweepovirus”), são distintos e basais a todos os demais begomovírus. Esta posição anômala desses begomovírus reflete uma história evolutiva distinta. Para os “legumovirus” foi sugerido que isto seja devido ao isolamento genético de suas espécies hospedeiras (Qazi *et al.*, 2007).

Um cenário atual para a evolução da família *Geminiviridae* foi proposto por (Nawaz-Ul-Rehman; Fauquet, 2009). Nesse, plasmídeos que replicam em algas vermelhas e outras formas de vida mais primitivas conseguiram adquirir novos genes, tornando-se mais independentes de seu hospedeiro e assim capazes de infectar plantas, provavelmente em primeiro lugar monocotiledôneas, como um pré-mastrevírus. Esta evolução deve ter coincido com a aquisição da transmissão por insetos. Em algum momento eles passaram a infectar dicotiledôneas, mas ainda tinham o mesmo tipo de vetor, as cigarrinhas. Com a aquisição de novos genes tornou-se um pré-monossegmentado, transmitido pela mosca-branca. Esse begomovírus monossegmentado teve a capacidade de capturar outras moléculas, adquirindo então um alfassatélite a partir de um pré-nanovírus ou betassatélite de uma fonte desconhecida. Por recombinação entre um begomovírus monossegmentado que infecta dicotiledôneas e um mastrevírus foram formados híbridos que deram origem aos ancestrais dos curtovírus e topocuvírus. Em um período posterior,

um monossegmentado conseguiu capturar um ancestral do que hoje é o componente B, e esta combinação de dois componentes foi extremamente bem sucedida ao ponto de begomovírus bissegmentados serem os únicos presentes no continente americano, seguindo a deriva dos continentes que aconteceu há cerca de 125 milhões de anos atrás.

Briddon *et al.*, (2010b) demonstraram por meio de análises filogenéticas e exaustivas comparações duas a duas dos componente DNA-A e DNA-B de begomovírus, que estas moléculas de fato tem histórias evolutivas diferentes. O DNA-B apresenta maior variação genética quando comparado ao DNA-A. Esse fato pode ser atribuído à menor quantidade de funções codificadas pelo DNA-B, sendo assim mais permissivo à variação, evoluindo exclusivamente em resposta ao hospedeiro (o DNA-A deve manter a interação com o vetor). Uma explicação adicional é que o DNA-B teria uma origem distinta do DNA-A, surgido inicialmente como um satélite que foi capturado pelo seu progenitor monossegmentado e posteriormente evoluído para se tornar parte integral do genoma. A situação atual com satélites associados aos begomovírus gera algumas pistas (por exemplo, a capacidade de infectar com eficiência algumas hospedeiras e fornecimento de função adicional de movimento) para os processos e pressões de seleção que devem ter levado à “domesticação” de um progenitor selvagem do DNA-B (Nawaz-UI-Rehman; Fauquet, 2009; Briddon *et al.*, 2010b).

2.5 Variabilidade e estrutura genética de populações de begomovírus

Populações de geminivírus, incluindo os begomovírus, possuem um elevado grau de diversidade genética. A ocorrência de eventos frequentes de recombinação (Padidam *et al.*, 1999b), a ocorrência de pseudo-recombinação entre vírus com genoma bissegmentado (Andrade *et al.*, 2006a), e a alta taxa de mutação (Duffy; Holmes, 2008; Duffy; Holmes, 2009) contribuem para esse elevado grau de diversidade. Mutação, recombinação e pseudo-recombinação são as principais fontes de variabilidade genética de vírus em plantas (Garcia-Arenal *et al.*, 2003; Seal *et al.*, 2006b).

2.5.1 Mutação

Assim como para todos os vírus, a evolução dos geminivírus depende primariamente de mutações. Há evidências de que a rápida evolução dos geminivírus é, ao menos em parte, dirigida por processos mutacionais que agem especificamente sobre ssDNA (Harkins *et al.*, 2009). O impacto das mutações pontuais tem sido estudado nesse grupo de vírus. Sob diferentes condições de seleção, como presença de um efeito gargalo (população inicial pequena do vírus, período curto de aquisição pelo vetor), transferências sucessivas entre hospedeiros sem emprego do vetor, e inoculação em plantas resistentes, isolados de MSV apresentaram alta frequência de mutação, da ordem de 10^{-4} e 10^{-5} (Isnard *et al.*, 1998). Resultados similares foram obtidos num experimento controlado de análise da taxa de variabilidade genética do begomovírus *Tomato yellow leaf curl China virus* (TYLCCNV), onde foi encontrada uma frequência média de mutação de $3,5 \times 10^{-4}$ e $5,3 \times 10^{-4}$ após 60 dias de infecção em *N. benthamiana* e tomateiro (*Solanum lycopersicon*), respectivamente (Ge *et al.*, 2007). Uma série de experimentos de evolução a longo prazo (de 6 a 32 anos) também revelaram alta frequência de mutação, entre 2 e 3×10^{-4} , para MSV e *Sugarcane streak Réunion virus* (SSRV), sugerindo que mastrevírus provavelmente não co-divergem com seus hospedeiros (Harkins *et al.*, 2009). Estes resultados discordam com a hipótese de aparente co-divergência entre alguns mastrevírus e seus hospedeiros, o que implicaria em taxas de substituições de apenas 10^{-8} subs/sítio/ano na natureza (Wu *et al.*, 2008).

Duffy & Holmes, (2008) e Duffy; Holmes, (2009) realizaram análises estruturadas no tempo de isolados de TYLCV e *East African cassava mosaic virus* (EACMV), para estimar a taxa de evolução dessas espécies de begomovírus na natureza. Taxas de mutação para o TYLCV foram estimadas em $2,88 \times 10^{-4}$ subs/sítio/ano para o genoma completo (Duffy; Holmes, 2008). A região que codifica a proteína CP apresentou uma taxa maior ($4,63 \times 10^{-4}$ subs/sítio/ano) e a região intergênica (não codificadora) apresentou uma taxa ainda maior ($1,56 \times 10^{-4}$ subs/sítio/ano). Entretanto, as mutações observadas foram na maioria sinônimas, sugerindo que as altas taxas de mutação observadas refletem mais uma rápida dinâmica mutacional do que uma frequência de evolução adaptativa (Duffy; Holmes, 2008). Para o EACMV as taxas foram estimadas em $1,6 \times 10^{-3}$ e $1,33 \times 10^{-4}$ subs/sítio/ano para o DNA-A e DNA-B, respectivamente (Duffy; Holmes, 2008). A região que codifica a proteína CP apresentou $1,37 \times 10^{-3}$ subs/sítio/ano e a região que

codifica a proteína associada à replicação mostrou $1,24 \times 10^{-3}$ subs/sítio/ano. As regiões codificadoras presentes no DNA-B, ORFs BV1 e BC1, apresentaram $2,77 \times 10^{-4}$ e $3,45 \times 10^{-4}$, respectivamente. Contudo, os autores validaram esses altos níveis de heterogeneidade apenas para o DNA-A e a ORF AV1. Foi observado então que as taxas de evolução indicadas para essas duas espécies de begomovírus, entre 10^{-3} e 10^{-5} , corroboram em geral aquelas determinadas experimentalmente para o MSV (Isnard *et al.*, 1998; Harkins *et al.*, 2009) e TYLCCNV (Ge *et al.*, 2007).

Erros de incorporação de nucleotídeos durante a replicação viral também contribuem para a diversidade genética. Estudos de bactérias e sistemas animais indicaram que a taxa de mutação dos vírus de dsDNA e ssDNA diferem significativamente (Duffy *et al.*, 2008). Taxas de mutação para fagos bacterianos, poliomavírus e papilomavírus, com genoma composto de dsDNA, são da ordem de 10^{-7} a 10^{-8} subs/sítio/ano (Drake, 1991; Holmes, 2004; Raney *et al.*, 2004). Em contraste, altas taxas de mutação (10^{-4}) foram relatadas para parvovírus e circovírus (vírus de ssDNA) (Gallian *et al.*, 2002; Biagini, 2004). Semelhante aos geminivírus, os parvovírus e circovírus replicam seu genoma via mecanismo de círculo rolante, sugerindo que os altos níveis de heterogeneidade relatados para begomovírus e mastrevírus podem refletir erros de replicação (Arguello-Astorga *et al.*, 2004). Foi sugerido que os mecanismos de correção de erro associados à replicação de DNA em eucariotos não sejam eficientes na replicação por círculo rolante e, ou na replicação de ssDNA (Van Der Walt *et al.*, 2008).

Mutantes para a proteína Rep do TGMV e do CaLCuV que não permitem a interação com a proteína pRB, inoculados em protoplastos de fumo (*Nicotiana tabacum*) e em plantas *N. benthamiana*, apresentaram até 100% de frequência de reversão de mutações, evidenciando a capacidade de populações de geminivírus de evoluir rapidamente para alterar mudanças deletérias em seu genoma (Arguello-Astorga *et al.*, 2007).

2.5.2 Recombinação

Recombinação é o processo pelo qual segmentos de uma fita de DNA ou RNA tornam-se incorporados na fita de um indivíduo diferente durante o processo de replicação (Padidam *et al.*, 1999b). A recombinação é um evento bastante comum em geminivírus (Padidam *et al.*, 1999b; Lefeuvre *et al.*, 2009), e parece contribuir grandemente para a diversificação genética dos

begomovírus, aumentando seu potencial evolucionário e adaptação local (Harrison; Robinson, 1999; Padidam *et al.*, 1999b; Berrie *et al.*, 2001; Monci *et al.*, 2002). A elevada frequência de recombinação nesse grupo de vírus pode ser em parte explicada pela existência de uma possível estratégia de replicação dependente de recombinação (RDR) (Jeske *et al.*, 2001; Preiss; Jeske, 2003) em adição à replicação por círculo rolante (RCR) (Saunders *et al.*, 2001), e pela ocorrência frequente de infecções mistas (Torres-Pacheco *et al.*, 1996; Harrison *et al.*, 1997; Sanz *et al.*, 2000; Pita *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.*, 2003; Garcia-Andres *et al.*, 2006; Davino *et al.*, 2009) com a evidência de infecção do mesmo núcleo da célula por mais de um begomovírus (Morilla *et al.*, 2004).

Eventos de recombinação têm sido diretamente implicados na emergência de novas doenças e epidemias em plantas cultivadas. Essas incluem a epidemia devastadora do mosaico da mandioca (*Manihot esculenta*), causada pelo recombinante EACMV na Uganda e países vizinhos (Pita *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 1997); as epidemias do complexo TYLCV na Bacia Ocidental do Mediterrâneo, com o surgimento dos recombinantes *Tomato yellow leaf curl Málaga virus* (TYLCMalV) e *Tomato yellow leaf curl Axarquía virus* (TYLCAxV) nos campos de tomate na Espanha (Monci *et al.*, 2002; Garcia-Andres *et al.*, 2006; Garcia-Andres *et al.*, 2007a; Garcia-Andres *et al.*, 2007b); e as epidemias de *Cotton leaf curl virus* (CLCuV) no Paquistão causadas por um complexo de espécies incluindo diversos begomovírus recombinantes (Idris ; Brown, 2002; Zhou *et al.*, 1998).

A emergência frequente de novas espécies de geminivírus devido a eventos de recombinação foi demonstrada por meio de análise de conversão gênica (Padidam *et al.*, 1999a). Embora na época o número de genomas completos sequenciados fosse pequeno, os autores analisaram todas as combinações dois-a-dois possíveis, e identificaram 420 fragmentos recombinantes tanto entre espécies como entre gêneros da família *Geminiviridae*.

Os mecanismos precisos que controlam a recombinação em begomovírus permanecem desconhecidos (Padidam *et al.*, 1999a). No entanto, é conhecido que sítios recombinantes não são uniformemente distribuídos ao longo do genoma, com a existência de sítios frequentes (“hot spots”) e não-frequentes (“cold spots”) (Stanley, 1995; Fauquet *et al.*, 2005; Garcia-Andres *et al.*, 2007b; Lefeuvre *et al.*, 2009). Análises bioinformáticas para detectar vírus recombinantes ocorrendo naturalmente revelaram que a origem de replicação viral é um sítio frequente de recombinação (Gutierrez, 1999; Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). A comparação de sequências de

begomovírus mono- e bissegmentados depositadas no GenBank até maio de 2006 (123 e 116 sequências, respectivamente) indicou que a região do gene *Rep* que codifica a porção N-terminal da proteína Rep, assim como a região intergênica adjacente (RC), são frequentemente intercambiadas durante a replicação. Também foram identificados sítios frequentes de recombinação localizados na região intergênica entre os genes *CP* e *Ren* (Lefeuvre *et al.*, 2007).

A análise comparativa da distribuição de sítios de recombinação dentro do genoma de diversas famílias de vírus de ssDNA novamente sugeriu a distribuição não aleatória dos sítios e também uma tendência significativa para estes se localizarem tanto fora como na periferia dos genes. Além disso, foi particularmente observado que poucos sítios de recombinação foram encontrados dentro de genes que codificam proteínas estruturais, a exemplo da proteína capsial (Lefeuvre *et al.*, 2009). Esses resultados sugerem que a seleção natural agindo contra vírus que expressam proteínas recombinantes é o principal determinante na distribuição não aleatória dos sítios de recombinação na maioria das famílias de vírus de ssDNA (Lefeuvre *et al.*, 2009).

Eventos de recombinação também têm sido relatados entre begomovírus e DNA satélites, e entre diferentes moléculas de betassatélites (Briddon *et al.*, 2001; Saunders *et al.*, 2001; Briddon *et al.*, 2003; Nawaz-UI-Rehman *et al.*, 2009).

2.5.3 - Pseudo-recombinação

A existência de dois componentes genômicos na maioria dos begomovírus promove um mecanismo alternativo, conhecido como pseudo-recombinação, pelo qual a troca de material genético pode ocorrer sem necessidade de recombinação intermolecular, ocorrendo apenas a troca de componentes genômicos entre dois vírus distintos (Gilbertson *et al.*, 1993b; Sung; Coutts, 1995; Andrade *et al.*, 2006a); revisado por Rojas *et al.*, (2005b). A ocorrência natural de pseudo-recombinantes no campo foi verificada no México, em tomateiros infectados pelo *Chino del tomate virus* (CdTV) (Paplomatas *et al.*, 1994).

Experimentos com pseudo-recombinação são ferramentas úteis no estudo de funções de genes e podem revelar relações filogenéticas, como é o caso da mistura de componentes genômicos do BGYMV e do *Bean golden mosaic virus* (BGMV), que possuem identidade inferior a 75% em suas sequências de nucleotídeos e não formam pseudo-recombinantes infecciosos (Gilbertson *et al.*, 1993a). Por outro lado, pseudo-recombinantes formados a partir da

mistura de componentes genômicos de dois isolados de BGYMV mostraram-se infecciosos. Quando inoculada, a mistura formada a partir de DNA-A do isolado da Guatemala (BGYMV-GA) e DNA-B do isolado da República Dominicana (BGYMV-DR) foi capaz de induzir os mesmos sintomas apresentados pelos parentais, enquanto o pseudo-recombinante recíproco induziu sintomas atenuados e tardios. Esses resultados demonstram que geminivírus com regiões comuns suficientemente similares podem formar pseudo-recombinantes infecciosos, mas ressaltam que frequentemente os pseudo-recombinantes recíprocos apresentam diferenças na eficiência de replicação e infecção sistêmica (Faria *et al.*, 1994). Esse fato foi também observado para o *African cassava mosaic virus* (ACMV) (Stanley *et al.*, 2005) e TGMV (Von Arnim & Stanley, 1992).

A especificidade da ligação da proteína Rep aos iterons é considerada a principal determinante da formação de pseudo-recombinantes viáveis entre diferentes espécies/estirpes de begomovírus (Eagle *et al.*, 1994; Fontes *et al.*, 1994; Arguello-Astorga *et al.*, 1994; Chatterji *et al.*, 1999; Andrade *et al.*, 2006a; Bull *et al.*, 2007). Outro fator importante é a conservação da sequência de aminoácidos da proteína Rep, especialmente os três aminoácidos do IRD que estariam envolvidos diretamente na ligação aos iterons (Arguello-Astorga; Ruiz-Medrano, 2001; Ruiz-Medrano *et al.*, 2001). A viabilidade de pseudo-recombinantes indica que fatores envolvidos na replicação e movimento são intercambiáveis entre espécies altamente relacionadas, ou entre estirpes de uma mesma espécie. A assimetria entre pseudo-recombinantes recíprocos indica que a pseudo-recombinação entre begomovírus é um fenômeno complexo que envolve interações entre fatores do vírus e do hospedeiro (Hill *et al.*, 1998).

Embora a pseudo-recombinação seja comum entre estirpes de uma mesma espécie de begomovírus, a formação de pseudo-recombinantes viáveis entre espécies distintas é mais difícil. Um pseudo-recombinante foi obtido entre o DNA-A do *Abutilon mosaic virus* (AbMV) e o DNA-B do *Sida golden mosaic Costa Rica virus* (SiGMCRV), porém o pseudo-recombinante recíproco não foi infeccioso (Hofer *et al.*, 1997b). Similarmente, um pseudo-recombinante viável foi formado pelo DNA-A de um isolado de *Sida golden mosaic virus* (SiGMV) de Honduras (SiGMV-[Ho_{yv}]) e o DNA-B do SiGMCRV (Unsel *et al.*, 2000). Entretanto, dentre os pseudo-recombinantes recíprocos formados pelo DNA-A do SiGMCRV combinado ao DNA-B de três isolados de SiGMV-[Ho_{yv}] que possuíam pequenas diferenças na composição de nucleotídeos, apenas um mostrou-se viável, porém pouco eficiente, e não foi capaz de infectar a planta a partir

da qual foi originalmente isolado (Unselid *et al.*, 2000). Pseudo-recombinantes infecciosos entre o DNA-A do CdTV e o DNA-B do BGYMV foram formados apesar da baixa identidade da região comum (68%), porém o pseudo-recombinante recíproco não foi infeccioso quando inoculado em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) (Garrido-Ramirez *et al.*, 2000).

Um pseudo-recombinante produzido entre o DNA-A do *Tomato mottle virus* (ToMoV) e o DNA-B do *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV), embora infeccioso, apresentou acúmulo reduzido do DNA-B e induziu sintomas atenuados em *N. benthamiana* (Gilbertson *et al.*, 1993b; Hou; Gilbertson, 1996). Entretanto, após três passagens mecânicas sucessivas nesse hospedeiro, os sintomas tornaram-se idênticos aos produzidos pelo ToMoV e o nível do DNA-B tornou-se igual ao do DNA-A. A análise das regiões comuns dos DNAs-A e -B do pseudo-recombinante comprovou a ocorrência de recombinação intermolecular na região comum do BDMV, que foi substituída quase que totalmente pela região comum do DNA-A do ToMoV (Hou; Gilbertson, 1996). Assim, o DNA-B passou a ser reconhecido com 100% de eficiência pela proteína Rep do ToMoV. Esse resultado evidencia a importância da pseudo-recombinação e da recombinação na evolução de geminivírus e em sua adaptação a novos hospedeiros.

A formação de pseudo-recombinantes viáveis não depende somente da relação filogenética e conservação dos iterons, já que pseudo-recombinantes infecciosos foram formados entre o DNA-A do TGMV e o DNA-B do ToYSV, que possuem iterons distintos. Além disso, a assimetria na formação do pseudo-recombinante recíproco sugere que a proteína Rep do TGMV tem maior versatilidade em termos de reconhecimento de componentes de DNA heterólogos comparada à do ToYSV (Andrade *et al.*, 2006a).

2.5.4 Estrutura genética de populações de geminivírus

A estrutura genética de populações de vírus de plantas refere-se à quantidade de variabilidade genética e a sua distribuição dentro e entre subpopulações (Garcia-Arenal *et al.*, 2001). Definir a estrutura genética é o primeiro passo para se estudar as populações virais, pois a estrutura genética reflete a história evolutiva e o potencial da população para evoluir (Pinel *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2004; Fonte *et al.*, 2007). O entendimento da dinâmica da variabilidade de populações é necessário para entender como as populações evoluem, bem como as implicações para a durabilidade de medidas de manejo da virose (Seal *et al.*, 2006a). Para a maior parte dos

objetivos, a genética de populações fornece a ferramenta mais conveniente para estimar a diversidade genética de populações de patógenos. Os principais mecanismos evolutivos que afetam a variabilidade das populações são seleção, deriva genética ao acaso, migração, mutação e recombinação (Hartl & Clark, 2007). Quantificar a contribuição de cada mecanismo é importante e constitui o objetivo de vários estudos de biologia de populações de vírus de plantas (Wang *et al.*, 2006; Bull *et al.*, 2006; Garcia-Andres *et al.*, 2007a).

Diversos estudos já foram realizados como objetivo de investigar a estrutura genética de populações de geminivírus em diversos hospedeiros e em diferentes regiões geográficas. Recentemente, com o advento da técnica de amplificação por círculo rolante do genoma viral completo (“rolling circle amplification”, RCA) (Inoue-Nagata *et al.*, 2004), novas possibilidades foram criadas para a análise de populações virais em escala genômica (Haible *et al.*, 2006), e alguns trabalhos nesse sentido já foram publicados (Owor *et al.*, 2007b; Varsani *et al.*, 2008; Castillo-Urquiza, 2008; Harkins *et al.*, 2009; Varsani *et al.*, 2009).

Diversos trabalhos realizados ao longo das décadas de 1990 e 2000 avaliaram a estrutura populacional de begomovírus infectando mandioca na África Sub-Sahariana e no Sub-Continente Indiano. Nos países dessas regiões, a mandioca pode ser infectada por sete espécies de begomovírus (Fauquet; Fargette, 1990; Legg; Raya, 1993; Fargette *et al.*, 1994). Curiosamente, não existem relatos de begomovírus que infectam mandioca no Brasil, o centro de origem e diversidade genética desta cultura. Os estudos realizados demonstraram um elevado grau de variabilidade genética da população viral em diversos países. A ocorrência frequente de infecções mistas facilita a ocorrência de pseudo-recombinação e recombinação, e em pelo menos dois casos foi demonstrada a emergência de novas espécies como consequência direta desses mecanismos (Zhou *et al.*, 1997; Fondong *et al.*, 2000).

Na Tanzânia, todas as sete espécies de begomovírus descritas que infectam mandioca já foram relatadas (Ndunguru *et al.*, 2005). Diversos eventos de recombinação foram detectados entre as estirpes TZ1 e TZ7 do *East African cassava mosaic Cameron virus* (EACMCV). A análise das sequências indicou que as duas estirpes têm a mesma origem ancestral e não foram introduzidas recentemente. A variabilidade genética da população viral foi analisada também com base no DNA-B, o que também indicou a existência de diversos eventos de recombinação. Os resultados indicam que a região central do continente africano é um centro de diversidade genética de begomovírus (Ndunguru *et al.*, 2005).

Além dos begomovírus que infectam a mandioca, a África também é o centro de origem dos mastrevírus que infectam gramíneas (Palmer; Rybicki, 1998). Um estudo recente utilizando RCA analisou a estrutura genética da população viral em Uganda, um dos países mais afetados pelo estriado do milho causado pelo MSV (Owor *et al.*, 2007a). Amostras foram coletadas em 155 locais cobrindo todo o país. Inicialmente, fragmentos do genoma viral foram amplificados via PCR e a variabilidade foi analisada por meio de PCR-RFLP. Um total de 49 variantes foram identificadas a partir de 391 isolados virais. A partir dessas 49 variantes, um total de 62 genomas completos foram sequenciados, e uma origem recombinante foi demonstrada para 52 desses genomas. Entretanto, um único recombinante, denominado MSV-A(1)UgIII, estava presente em infecção simples em mais de 60% das amostras infectadas em todo o país. Os autores concluíram que, embora a ocorrência de recombinação entre mastrevírus seja tão ou mais frequente em comparação com os begomovírus, o MSV deve estar sujeito a gargalos que limitam a variabilidade genética das populações naturais (Owor *et al.*, 2007a).

Font *et al.*, (2007) determinaram a estrutura e variabilidade genética de populações de *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) e TYLCV em plantas de tomateiro em seis regiões da Espanha (Andaluzia, Ilhas Canárias, Lanzarote, Levante, Majorca e Murcia) entre os anos de 1997 e 2001. A análise de PCR-RFLP do gene da proteína capsidial e da região comum de 358 isolados revelou a presença de 14 haplótipos, e eventos de recombinação foram identificados na região comum. Em todas as regiões geográficas, exceto Murcia, as populações eram compostas de um haplótipo predominante com uma baixa diversidade genética ($<0,0180$), ou estavam evoluindo para esta condição. Em Murcia, houve mudanças na predominância de haplótipos. O haplótipo I (TYLCSV) era predominante em 1997, mas sua frequência decresceu em 1998, com o aumento correspondente do haplótipo III (TYCLV) de modo que ambos haplótipos apresentaram frequências semelhantes. Em 1999, o haplótipo II surgiu e rapidamente tornou-se predominante na população. Esses resultados sugerem que a seleção negativa ocorreu de forma acentuada nessas populações. No entanto, o surgimento de haplótipos altamente adaptados se dispersando na população indica que seleção positiva também estava ocorrendo.

No Brasil, Castillo-Urquiza, (2008), estudando duas populações de begomovírus que infectam tomateiro, *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) e *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV) na região Sudeste do Brasil (municípios de Coimbra, MG e Paty do Alferes, RJ), observou maior variabilidade genética na população de ToCmMV. Demonstrou ainda que entre

subpopulações de ToCmMV em Coimbra e Paty de Alferes havia maior variabilidade na subpopulação localizada em Coimbra.

A análise de uma população de BGMV infectando fava (*Phaseolus lunatus*) no estado de Alagoas, região Nordeste do Brasil, indicou um alto grau de variabilidade genética, significativamente maior que a observada para as duas populações de begomovírus que infectam tomateiro no sudeste brasileiro (Ramos-Sobrinho *et al.*, 2010).

Silva (2011) trabalhando com duas populações de begomovírus a partir de plantas daninhas da região Nordeste do Brasil: população de Macroptilium yellow spot virus (MaYSV) a partir de *Macroptilium lathyroides*, *Canavalia* sp. e *Calopogonio mucunoides*; e população de Cleome leaf crumple virus (CILCrV) a partir de *Cleome affinis*, demonstrou um alto grau de variabilidade genética para estas populações virais.

2.6 Diversidade de begomovírus infectando plantas cultivadas e invasoras no Brasil

Durante as duas últimas décadas, begomovírus têm emergido como um dos principais patógenos de plantas, particularmente nas regiões tropicais e subtropicais no mundo, causando severas perdas econômicas (Morales, 2006). No Brasil, as culturas mais severamente afetadas são o feijoeiro e tomateiro (Faria; Maxwell, 1999; Zerbini *et al.*, 2005). Embora existam relatos de infecção por begomovírus em outras culturas importantes como a soja (*Glycine max*) (Mello *et al.*, 2000; Mello *et al.*, 2002) e o pimentão (*Capsicum annum*) (Nozaki *et al.*, 2005), esses ocorrem esporadicamente nas áreas de cultivo, não sendo considerados fatores limitantes à produção.

Begomovírus que infectam feijoeiro (*Phaseolus* spp.) são distribuídos através das Américas, sendo sua incidência um fator limitante para a produtividade dessa cultura. Quatro espécies já foram descritas: *Bean calico mosaic virus* (BcaMV), *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV), BGMV e BGYMV (Fauquet *et al.*, 2008). Foi demonstrado que isolados brasileiros de BGMV apresentam um baixo grau de variabilidade genética, o que não é comum para begomovírus (Faria; Maxwell, 1999). No entanto, baseados na análise de genomas completos, estudos mais recentes realizados em populações de BGMV infectando fava (*P. lunatus*) demonstraram que a variabilidade genética dentro dessa espécie é alta (Silva, 2006; Ramos-Sobrinho *et al.*, 2010).

Apesar da ocorrência frequente de BGMV em feijoeiro, infecções de begomovírus em soja não são comuns no Brasil. Ocorrências esporádicas têm sido relatadas desde 1980, com a detecção de BGMV, *Sida mottle virus* (SiMoV) e duas possíveis novas espécies em amostras coletadas na região Sudeste (Mello *et al.*, 2002); e BGMV, *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV) e *Okra mottle virus* (OMoV) na região Centro-Oeste do país (Fernandes *et al.*, 2009). Este cenário está em contraste com a Argentina, onde a infecção de soja por três begomovírus distintos, incluindo o SiMoV, é frequente na região Noroeste, causando perdas moderadas a severas na produção (Rodríguez-Pardina *et al.*, 2006).

Uma situação oposta é observada para begomovírus que infectam solanáceas, a exemplo do tomateiro e do pimentão, onde um grande número de espécies tem sido descritas, e a variabilidade genética entre os isolados de uma determinada espécie é normalmente muito alta (Ribeiro *et al.*, 2003; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2008).

O primeiro relato de begomovírus em tomateiro no Brasil foi feito na década de 1970 (Costa *et al.*, 1975). O vírus foi caracterizado e denominado TGMV. Além do TGMV, cinco outros vírus transmitidos por mosca-branca foram identificados, porém sem causar danos de importância econômica (Matyis *et al.*, 1975). Isso provavelmente ocorria porque o biótipo A de *B. tabaci*, o único presente no país naquela época, coloniza o tomateiro com baixa eficiência (Bedford *et al.*, 1994). No entanto, no início da década de 1990 um complexo de begomovírus surgiu em tomateiro no Brasil, coincidindo com a introdução e disseminação do biótipo B de *B. tabaci* (Ambrozevicius *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2003). Desde então, cinco espécies de begomovírus já foram descritas: ToCMoV, ToYSV, ToYVSV, *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) e *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) (Faria; Maxwell, 1999; Fernandes *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007; Calegario *et al.*, 2007). Além dessas, três novas espécies tentativas (*Tomato commom mosaic virus*, ToCmMV; *Tomato leaf distortion virus*, ToLDV; *Tomato mild mosaic virus*, ToMIMV) foram identificadas com base na sequência do genoma completo (Castillo-Urquiza *et al.*, 2008), e seis outras foram descritas a partir de sequências parciais (Ribeiro *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2008). Algumas dessas espécies encontram-se amplamente distribuídas pelo país, enquanto outras estão restritas a certas regiões. Por exemplo, o ToSRV já foi relatado nos estados de Goiás, Minas Gerais, Pernambuco, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo (Lima *et al.*, 2006; Rezende *et al.*, 1997; Castillo-Urquiza *et al.*, 2007; Cotrim *et al.*,

2007; Fernandes *et al.*, 2008). Por outro lado, o ToYSV foi relatado apenas em Minas Gerais (Calegario *et al.*, 2007).

Levantamentos realizados para acessar a diversidade de begomovírus em tomateiro indicam que determinadas espécies tornaram-se prevalentes em diferentes regiões do país (Castillo-Urquiza *et al.*, 2007; Cotrim *et al.*, 2007; Castillo-Urquiza, 2008; Fernandes *et al.*, 2008). O sequenciamento direto de fragmentos de PCR de amostras de tomateiro coletadas na região central do estado de São Paulo nos anos de 2003 e 2004 revelou como espécie predominante o ToSRV, presente em 50% das amostras analisadas. O ToYVSV e o SiMoV também estavam presentes (Cotrim *et al.*, 2007). A mesma estratégia foi utilizada para identificar begomovírus em amostras de tomateiro coletadas entre 2002 e 2004 no Distrito Federal e nos estados da Bahia, Goiás, Minas Gerais, Pernambuco e São Paulo. Verificou-se a presença do ToSRV em 61% das amostras, além do ToYVSV, Tomato mottle leaf curl virus (ToMoLCV) e duas possíveis novas espécies (Fernandes *et al.*, 2008).

Nos anos de 2005 e 2007 foi realizado um estudo sobre a diversidade de begomovírus em duas importantes regiões produtoras de tomate no Sudeste do Brasil, Paty do Alferes (RJ) e Coimbra (MG). A análise de sequências do genoma completo do DNA-A revelou que em Paty do Alferes o ToYVSV era o vírus predominante, encontrado em 56,4% das amostras analisadas, seguido pelo ToCmMV. Já em Coimbra o ToCmMV foi o único vírus encontrado infectando tomateiro (Castillo-Urquiza, 2008).

Acredita-se que a emergência dos begomovírus que infectam tomateiro no Brasil seja resultado da transferência horizontal de vírus nativos que infectam plantas silvestres ou invasoras pelo biótipo B da mosca-branca. Uma vez presentes no novo hospedeiro, esses vírus evoluíram rapidamente via recombinação e pseudo-recombinação, dando origem às espécies atualmente detectadas no campo. A predominância de algumas espécies poderia ser devido a diferenças na adaptação ao tomateiro ou diferenças na eficiência de transmissão pelo vetor (Castillo-Urquiza *et al.*, 2008).

Três observações corroboram essa hipótese. Em primeiro lugar, todas as espécies de begomovírus detectadas até o presente em tomateiro no Brasil são de ocorrência restrita ao país. Em segundo lugar, a caracterização biológica de algumas espécies (ToRMV, ToCMoV e ToYSV) confirmou que plantas daninhas como *Nicandra physaloides*, *Solanum nigrum* e *Datura stramonium* são hospedeiras (Fernandes *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007; Calegario *et al.*, 2007).

Por fim, begomovírus originalmente encontrados em plantas silvestres/daninhas, como o SiMoV e o SimMV, já foram encontrados infectando naturalmente o tomateiro (Castillo-Urquiza *et al.*, 2007; Cotrim *et al.*, 2007).

A presença de diversas espécies no campo, todas transmitidas pelo mesmo inseto vetor, torna comum a ocorrência de infecções mistas, com dois ou mais vírus presentes simultaneamente na mesma planta, aumentando a probabilidade da ocorrência de eventos de recombinação e pseudo-recombinação, o que pode levar ao surgimento de espécies melhor adaptadas ao hospedeiro (Pita *et al.*, 2001; Monci *et al.*, 2002; Andrade *et al.*, 2006a; Inoue-Nagata *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007). Evidências de recombinação e pseudo-recombinação já foram encontradas em associação ao complexo de begomovírus infectando o tomateiro no Brasil. Galvão *et al.*, (2003) e Ribeiro *et al.*, (2007) sugeriram que os isolados MG-Bt1 e BA-Se1 do ToCMoV possuem origem recombinante. A formação de pseudo-recombinantes viáveis entre clones infecciosos do TGMV (DNA-A) e ToYSV (DNA-B), e entre o ToYSV (DNA-A) e o Tomato crinkle leaf yellow virus (ToCrLYV), já foi demonstrada (Andrade *et al.*, 2006a). Além disso, foi sugerida a presença de um pseudo-recombinante ocorrendo naturalmente entre o ToRMV e um novo vírus (Fernandes *et al.*, 2006).

Paprotka *et al.*, (2010a) estudaram a diversidade genética de begomovírus presentes em acesso de batata-doce naturalmente infectados em um banco de germoplasma brasileiro. Nesse estudo foram identificadas duas novas espécies, Sweet potato golden vein-associated virus (SPGVaV) e Sweet potato mosaic-associated virus (SPMaV), além de três novos isolados e vários variantes do *Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV). A comparação de sequências dos begomovírus encontrados nesses acessos revelou a presença de sinais de recombinação em seus genomas, ressaltando o risco do surgimento de novos begomovírus no material propagado vegetativamente no banco de germoplasma. Albuquerque *et al.* (2011) identificaram dois isolados de begomovírus monopartido ocorrendo em batata-doce no estado de São Paulo, sendo um desses isolados uma nova espécie, tentativamente nomeada de Sweet potato leaf curl Sao Paulo virus (SPLCSPV).

Além das plantas cultivadas, muitas espécies silvestres e/ou invasoras têm sido relatadas como hospedeiras de begomovírus em vários países, incluindo o Brasil (Idris *et al.*, 2003; Jovel *et al.*, 2004; Varsani *et al.*, 2009; Mubin *et al.*, 2010; Fiallo-Olive *et al.*, 2010). As espécies comumente relatadas como hospedeiras pertencem às famílias Malvaceae, Euphorbiaceae e

Fabaceae (Morales; Anderson, 2001). Alguns estudos demonstraram que begomovírus provenientes de plantas invasoras podem ser transmitidos para espécies cultivadas pelo inseto vetor ou mediante inoculação via extrato vegetal tamponado (Frischmuth *et al.*, 1997; Faria *et al.*, 2000; Morales & Anderson, 2001; Castillo-Urquiza *et al.*, 2007; Cotrim *et al.*, 2007).

No Brasil, já se realizaram estudos com o objetivo de caracterizar molecularmente isolados de begomovírus que infectam plantas silvestres e daninhas, sobretudo em associação às culturas do feijoeiro e do tomateiro (Castillo-Urquiza *et al.*, 2008; Faria & Maxwell, 1999; Ribeiro *et al.*, 1998). Os resultados desses estudos revelaram que, a exemplo do que ocorre com plantas cultivadas, a diversidade genética é alta entre os isolados de begomovírus que infectam plantas invasoras (Ambrozevicius *et al.*, 2002; Calegario, 2004; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2011).

O SiMoV, obtido de plantas de *Sida rhombifolia* coletadas em Viçosa, MG (Fernandes *et al.*, 1999), foi encontrado em plantas de tomateiro na Zona Metalúrgica no estado de Minas Gerais (Calegario, 2004).

Na Serra do Ibiapaba, CE, amostras assintomáticas de plantas invasoras de sete famílias botânicas e 18 espécies vegetais foram avaliadas por ELISA e PCR para infecção por begomovírus. Espécies de plantas daninhas pertencentes às famílias Amaranthaceae (*Amaranthus deflexus*, *A. spinosus*, *A. viridis*), Asteraceae (*Acanthospermum hispidum*, *Ageratum conyzoides*, *Bidens pilosa*), Euphorbiaceae (*Euphorbia heterophylla*) e Rubiaceae (*Borreria capitata*) foram identificadas como hospedeiras naturais de begomovírus (Santos *et al.*, 2003; Arnaud *et al.*, 2007). Silva *et al.*, (2010a) realizaram ensaios de inoculação por mosca-branca e enxertia com o objetivo de observar a transmissão de begomovírus a partir de tomateiros infectados para quatro espécies de plantas invasoras (*Amaranthus spinosus*, *A. viridis*, *Ageratum conizoydes* e *B. pilosa*) e verificação de seu retorno para o tomateiro. Os resultados indicaram que o vetor transmitiu eficientemente o vírus para as quatro espécies. Por enxertia, apenas *B. pilosa* foi infectada. Esses resultados demonstram que as espécies invasoras são hospedeiras alternativas dos begomovírus de tomateiro presentes na região da Serra de Ibiapaba e, em condições de campo, na presença do vetor, podem constituir importantes fontes de inóculo para essa cultura. No entanto, as espécies de begomovírus infectando estas plantas não foram identificadas.

Plantas daninhas coletadas em municípios dos estados de Alagoas, Bahia e Pernambuco, com sintomas de mosaico amarelo, deformação do limbo foliar e redução do crescimento, foram

avaliadas para a presença de begomovírus via PCR (Assunção *et al.*, 2006). A infecção viral foi confirmada em *Cleome affinis* (Capparaceae), *Cnidoscolus urens* (Euphorbiaceae), *Desmodium* sp., *Macroptilium lathyroides* (Fabaceae), *Herissantia crispa*, *Sidastrum micranthum*, *S. rhombifolia*, *Sida spinosa* (Malvaceae), *Triumfetta semitriloba* e *Waltheria indica* (Sterculiaceae). Padrões distintos de clivagem obtidos em análise de PCR-RFLP sugeriram a existência de um alto grau de variabilidade genética (Assunção *et al.*, 2006). Entretanto, as espécies de begomovírus infectando estas plantas não foram identificadas.

Castillo-Urquiza *et al.*, (2008) analisaram a presença de begomovírus em tomateiro e plantas invasoras associadas à cultura. Foram encontradas seis novas espécies, três provenientes do tomateiro e três provenientes das invasoras *Blainvillea rhomboidea* (Blainvillea yellow spot virus), *Sida rhombifolia* (Sida yellow mosaic virus) e *Sida micrantha* (Sida common mosaic virus).

A partir de material foliar de plantas sintomáticas pertencentes às famílias Malvaceae, Euphorbiaceae e Capparaceae, coletadas no município de Miranda (Mato Grosso do Sul), foram identificadas duas novas espécies de begomovírus, Cleome leaf crumple virus (CILCrV), obtido de *Cleome affinis*, e Sida mosaic Brazil virus (SiMBV). Além disso, foram encontrados dois alfassatélites associados ao *Euphorbia mosaic virus* (Euphorbia mosaic virus Mato Grosso do Sul-associated DNA1) e ao CILCrV (Cleome leaf crumple virus-associated DNA1). Este foi o primeiro relato de alfassatélites ocorrendo naturalmente no Novo Mundo (Paprotka *et al.*, 2010c).

Um novo begomovírus, Abutilon mosaic Brazil virus (AbMBV), foi identificado infectando *Abutilon* sp. no estado da Bahia. Análises filogenéticas demonstraram que ambos os componentes genômicos são distintos da espécie clássica, *Abutilon mosaic virus* (ABMV), originária do oeste da Índia. Além disso, inoculação via biobalística comprovou sua transmissão para *Malva parviflora*, a qual desenvolveu sintomas característicos de clareamento de nervuras e mosaico (Paprotka *et al.*, 2010b).

Quatro novas espécies, *Macroptilium* yellow net virus (MaYNV), *Centrosema* yellow spot virus (CenYSV), *Macroptilium* yellow spot virus (MaYSV) e *Macroptilium* yellow vein virus (MaYVV), foram descritas infectando plantas daninhas da região Nordeste do Brasil pertencentes a família Fabaceae. Todas as quatro novas espécies apresentam organização genômica de begomovirus do “Novo Mundo” (Silva, 2011).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta de material vegetal e obtenção de isolados virais

As amostras de plantas daninhas utilizadas para realização deste trabalho (Tabela 1) foram coletadas nos estados de Alagoas e Minas Gerais. As plantas apresentavam sintomas de mosaico amarelo, deformação do limbo foliar e redução do crescimento (Figura 2). As amostras coletadas foram armazenadas em sacos plásticos e transportadas até o laboratório, onde foram mantidas a -80°C até a extração de DNA. A extração de DNA foi realizada de acordo com Doyle & Doyle (1987). O DNA foi armazenado a -20°C .

Figura 2 - Plantas daninhas mostrando sintomas típicos de infecção por begomovírus como: mosaico amarelo e deformação do limbo foliar. A - *Sida* sp.; B - *Sida santaremnensis* e C - *Sidastrum micranthum*.



Fonte: (Autora, 2011)

Tabela 1. Localização, hospedeiros e ano de coleta das amostras coletadas em Alagoas e Minas gerais nos anos de 2009 e 2010

Código da amostra	Local de coleta	Hospedeiro	Ano de coleta
Minas Gerais			
16DN	Viçosa	<i>Sida santaremnensis</i>	2010
22DN	Viçosa	<i>Sidastrum micranthum</i>	2010
33DN	Viçosa	<i>Sidastrum micranthum</i>	2010
35DN	Viçosa	<i>Sidastrum micranthum</i>	2010
37DN	Viçosa	<i>Sidastrum micranthum</i>	2010
13p	Viçosa	<i>Sida urens</i>	2010
15DN	Viçosa	<i>Sidastrum micranthum</i>	2010
26DN	Viçosa	<i>Sida santaremnensis</i>	2010
28DN	Viçosa	<i>Sida santaremnensis</i>	2010
Alagoas			
14M	Rio Largo	<i>Sida urens</i>	2010
49M	Viçosa	<i>Sida urens</i>	2009
61M	Viçosa	<i>Sida urens</i>	2010
64M	Maragogi	<i>Sida sp.</i>	2010
65M	Chã Preta	<i>Sida urens</i>	2010
262	Rio Largo	<i>Blainvillea rhomboidea</i>	2010
252	Junqueiro	<i>Blainvillea rhomboidea</i>	2009
253	Limoeiro	<i>Blainvillea rhomboidea</i>	2009
254	Rio Largo	<i>Blainvillea rhomboidea</i>	2009

Fonte: (Autora, 2011)

3.2 - Clonagem e sequenciamento dos genomas virais

Dentre as plantas daninhas, foram coletadas 10 amostras de *Blainvillea rhomboidea* e 10 amostras de *Sida* spp. em diferentes municípios do estado de Alagoas e 47 amostras de *Sida* spp. no município de Viçosa em Minas Gerais (dados não mostrados). Todas as amostras foram utilizadas para amplificação utilizando-se a enzima DNA polimerase do bacteriófago phi29 de acordo com o método descrito por Inoue-Nagata *et al.* (2004). Alíquotas das amplificações foram submetidas, individualmente, a clivagens com as enzimas de restrição *Apa* I, *Bam* HI, *Eco* RV, *Hind* III, *Pst* I, *Sac* I e *Kpn* I.

Os produtos das reações foram analisados em gel de agarose a 0,7% corado com brometo de etídeo (5 µg/mL) e visualizado sob luz UV. Alíquotas das reações de clivagem contendo fragmentos de ~2600 nucleotídeos, correspondente a uma cópia de cada componente genômico, foram utilizadas para ligação ao vetor pBluescript KS+ (Stratagene) previamente linearizado com a mesma enzima e defosforilado. O produto da reação de ligação foi utilizado para transformação de células ultracompetentes de *Escherichia coli* estirpe DH5α pelo método de choque térmico (Sambrook *et al.*, 2001). Colônias contendo os possíveis plasmídeos recombinantes foram repicadas para meio LB líquido contendo ampicilina e incubadas a 37°C sob agitação orbital de 250 rpm durante 12h. Após incubação, as culturas foram submetidas à extração de DNA plasmidial pelo método de lise alcalina (Sambrook *et al.*, 2001). O DNA obtido foi submetido à clivagem com a mesma enzima utilizada para a clonagem, e o padrão eletroforético em gel de agarose a 0,7% utilizado para confirmação da clonagem. Amostras onde a clonagem foi confirmada foram submetidas a uma digestão com a enzima *Hae* III (enzima de corte frequente), e o padrão eletroforético utilizado para seleção dos clones a serem completamente sequenciadas pela Macrogen, Inc. (Seul, Coréia do Sul). A primeira rodada de sequenciamento foi realizada com os oligonucleotídeos M13 *Forward* e *Reverse*. Os clones foram classificados como DNA-A e DNA-B por meio do sequenciamento parcial da Macrogen, Inc., Seul, Coréia do Sul, mas apenas os clones referentes ao DNA-A foram usados para o sequenciamento do genoma completo onde foram desenhados oligonucleotídeos internos (Tabela 2). As sequências foram montadas utilizando-se o programa DNAMAN versão 6 (Lynnon Biosoft Corporation).

Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento dos componentes genômicos de begomovírus.

Oligonucleotídeo	Clones
ST1a - 5' GCTGTCATTGATGTCG 3'	15SS, 17SS
ST1b - 5' CCTCATCTCCACGTCC 3'	2SS, 15SS, 17SS
ST2a - 5' CCACTCTTGCATCTCG 3'	12SS, 13SS, 16SS, 18SS, 19SS, 20SS
ST2b - 5' GCTTACCGACACGGTG 3'	12SS, 13SS, 16SS, 18SS, 19SS, 20SS
ST3a - 5' GGTCAAGAGGTTCTGG 3'	1SS, 3SS, 4SS, 14SS
ST3b - 5' CCATCCAGGTCAACAC 3'	1SS, 3SS, 4SS, 14SS
ST4a - 5' GGTCGAACAGTCTGTT 3'	14SS
ST4b - 5' GAGGCATGAGTACATG 3'	14SS
ST7a - 5'GGCTGCCCATCTTCGTGTAG 3'	5SS
ST7b - 5' GGACGACATCAGTGAAGGC 3'	5SS
ST8a - 5'CTTTGGATAGAGAGCACTTCGG 3'	6SS, 7SS
ST8b - 5' CATCAGTTCGAGCTTCTGGG 3'	6SS, 7SS
ST10a - 5' GGAAGCTGGGAAGTACGAG 3'	2SS
ST11a - 5' GCAGTTCGCTTTGCAAC 3'	21SS, 22SS, 23SS, 26SS
ST11b - 5' GCATGGAGATGAGGCTC 3'	21SS, 22SS, 23SS, 26SS
ST12a - 5' CGTGCACGTGAACTTCCCTTC 3'	24SS, 25SS
ST12b - 5' CTGACGGCTTCTGGAGTAG 3'	24SS, 25SS
ST13a - 5' GGGAAGATCTGGATGGATGAGA 3'	9SS
ST13b - 5' GCATTGGAAAGAGTTGATTGGGG 3'	9SS
ST14a - 5' GGGTCGCATACACAGGGTTAG 3'	8SS
ST14b - 5' GGAAGAGAGCACTGAGGATATGT 3'	8SS
ST15a - 5' GCAACCTCACCTCCACATC 3'	10SS, 11SS
ST15b 5' CTCCTGAGGTTGTGGTTGAAC 3'	10SS, 11SS

Fonte: (Autora, 2011)

3.3 - Comparações de sequências e análise filogenética

As sequências foram inicialmente analisadas com o algoritmo BLASTn para identificação das espécies virais com maior porcentagem de identidade, e em seguida foram analisadas a fim de identificar as ORFs presentes no genoma viral utilizando-se o programa ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>). Comparações par a par foram geradas utilizando-se o programa DNAMAN versão 6 (Lynnon Biosoft Corporation) e estimada a porcentagem de identidade das sequências de nucleotídeos do genoma inteiro entre os isolados encontrados e oito begomovírus do Brasil: *Sida yellow mosaic virus* (SiYMV, AY090558); *Sida common mosaic virus* (SiCmMV, EU710751); *Tomato mild mosaic virus* (ToMiMV, EU710752); *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV, FJ619507); *Sida mottle virus* (SiMoV, AY090555); *Blainvillea yellow spot virus* (BIYSV, EU710756); *Tomato leaf distortion virus* (ToLDV, EU710749) e *Tomato yellow spot virus* (ToYSV, DQ336350). Alinhamentos múltiplos, incluindo os isolados de plantas daninhas e outros begomovírus do Brasil, foram preparados utilizando-se o algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004). A árvore filogenética a partir do alinhamento do DNA-A foi construída com MEGA 4.0 (Kumar *et al.*, 2004) utilizando o método “Neighbour-Joining” incluindo análise “bootstrap” com 2000 repetições para verificar a significância de cada ramo. Os alinhamentos e a árvore filogenética incluíram os isolados obtidos a partir de plantas daninhas deste trabalho e espécies de begomovírus já relatadas no Brasil (Tabela S1).

3.4 - Análise de recombinação

Para investigar possíveis eventos de recombinação, sequências completas de begomovírus já relatados no Brasil juntamente com os isolados de plantas daninhas deste trabalho, foram inicialmente alinhadas utilizando-se o algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004). Evidências filogenéticas para recombinação foram inicialmente detectadas por meio da análise de recombinação como implementado no programa SplitsTree v. 4.1 (Huson; Bryant, 2006). Eventos de recombinação, supostos parentais e sítios de recombinação foram identificados utilizando-se o programa RDP ver. 3.0 (Martin *et al.*, 2005). Para reduzir a possibilidade de

obtenção de falsos sinais de recombinação, apenas eventos suportados por pelo menos três métodos diferentes e um valor $P < 1,0 \times 10^{-6}$ foram considerados.

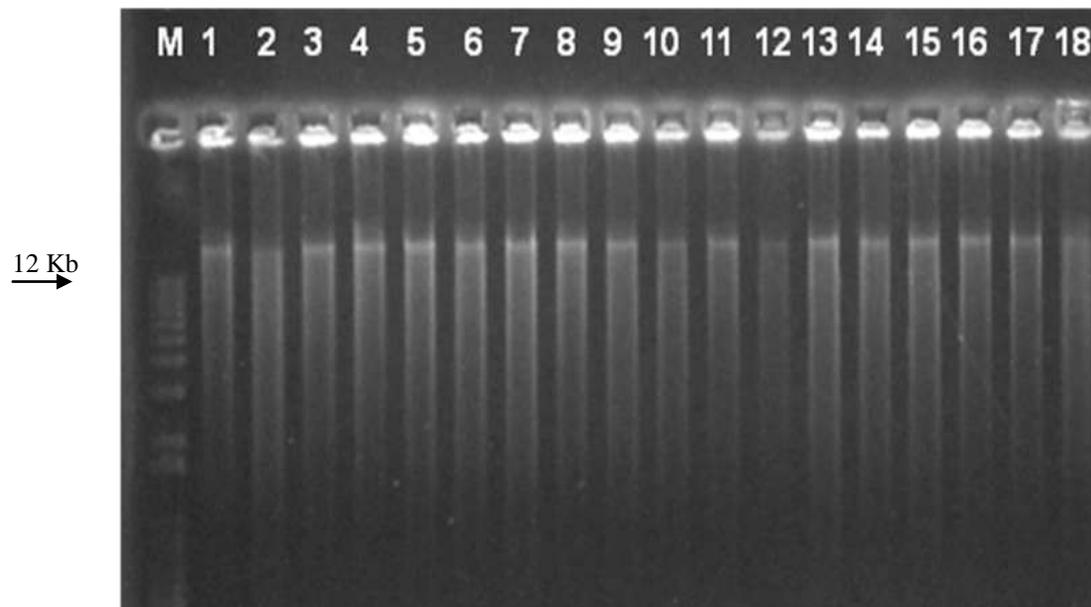
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Clonagem e sequenciamento dos genomas virais

4.1.1 - Amplificação dos genomas virais completos

O DNA viral a partir das amostras de plantas daninhas foi amplificado via RCA. Um fragmento de comprimento superior a 12.000 nucleotídeos (nt), correspondente ao multímero linear contendo várias cópias do genoma viral, foi observado para cada reação (Figura 3).

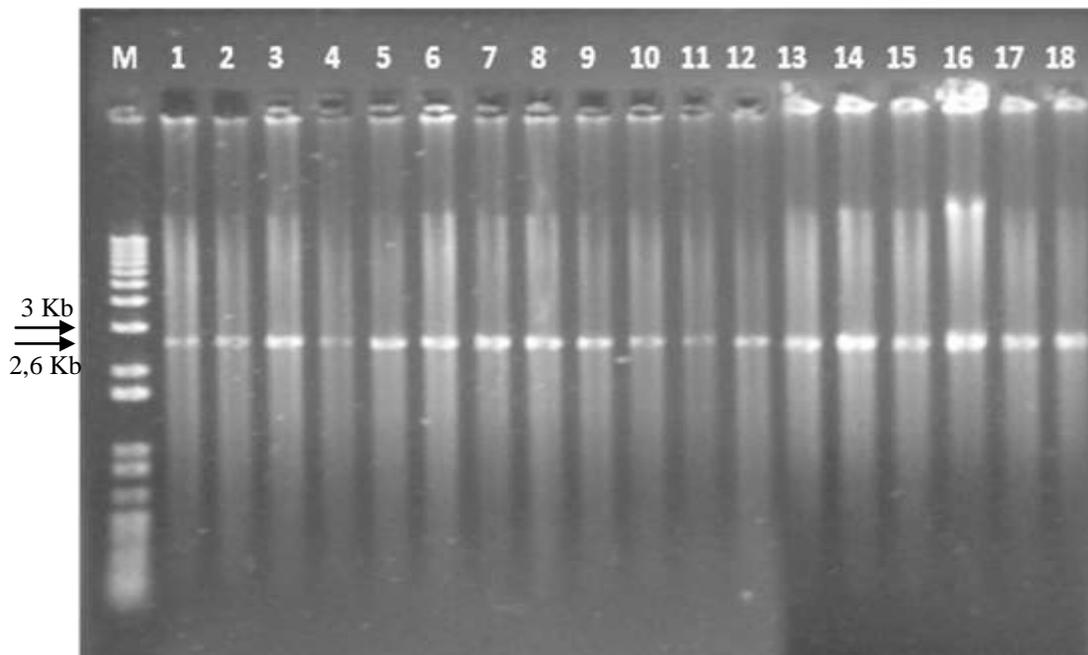
Figura 3 - Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) de amplicons obtidos a partir de amostras de DNA total amplificado via RCA. **M**, marcador de comprimento (“1 Kb plus DNA ladder”, em nucleotídeos); **1-9**, amplicons obtidos a partir da amostras coletadas em Viçosa-MG; **10-18**, amplicons obtidos a partir das amostras coletadas em Alagoas (**10,15, 18**, Rio Largo; **11,12**, Viçosa; **13**, Maragogi; **14**, Chã Preta; **16**, Junqueiro; **17**, Limoeiro).



Fonte: (Autora, 2011)

Fragmentos de aproximadamente 2.600 nt, correspondentes a uma cópia dos componentes genômicos virais, DNA-A ou DNA-B foram observados após as reações de clivagem dos produtos de RCA com diferentes enzimas de restrição *Apa I*, *Bam HI*, *Eco RV*, *Hind III*, *Pst I*, *Sac I* e *Kpn I*. Para encontrar a enzima que clivasse o DNA viral em apenas um ponto (Figura 4).

Figura 4. Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) de amplicons obtidos a partir de amostras de DNA total e, submetidos à clivagem com enzima de restrição. **M**, marcador de comprimento (“1 Kb plus DNA ladder”, em nucleotídeos); **1-9**, amplicons obtidos a partir da amostra coletada em Viçosa-MG (**1, 2, 4**, enzima *Bam HI*. **3**, enzima *Eco RV*. **5-9**, enzima *Apa I*) e **10-18** coletadas em Alagoas: **10**, Rio Largo; **11,12**, Viçosa; **13**, Maragogi; **14** Chã Preta, enzima *Bam HI*; **15**, Rio Largo, enzima *Hind III*; **16**, Junqueiro; **17**, Limoeiro; **18**, Rio Lagro, enzima *Apa I*.

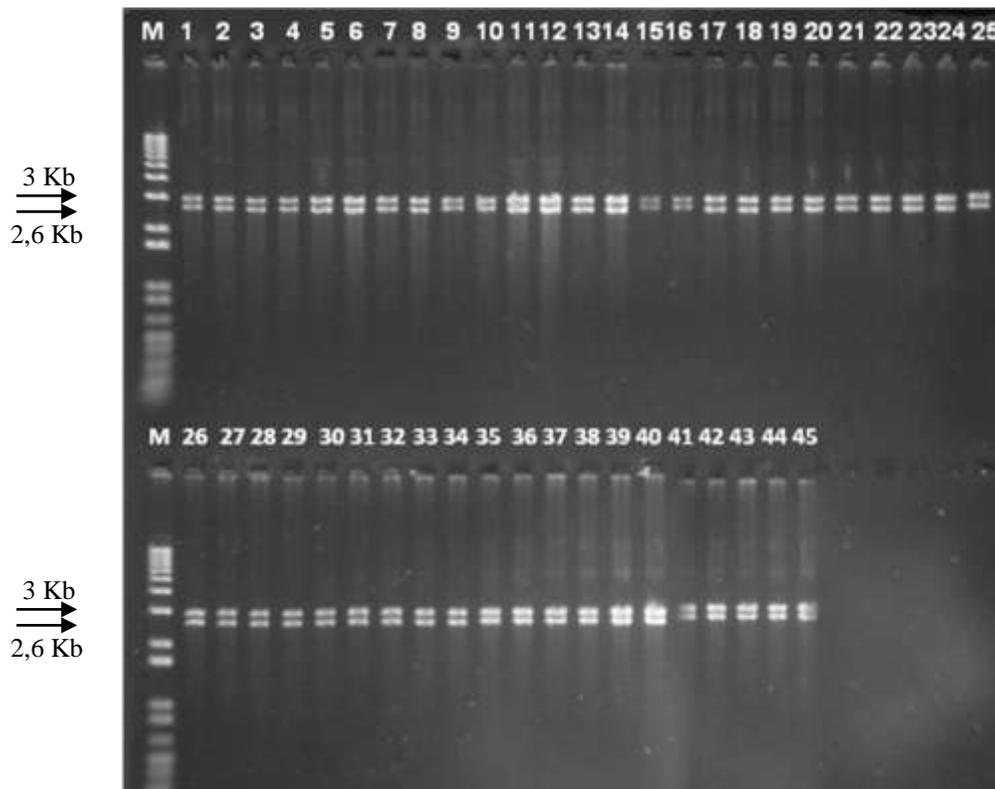


Fonte: (Autora, 2011)

4.1.2 - Clonagem dos fragmentos correspondentes a uma cópia do genoma viral

Os fragmentos de aproximadamente 2600 nt foram clonados no vetor pKS+. Após a transformação, foram escolhidas cinco colônias contendo os possíveis DNAs plasmidiais recombinantes, os quais foram extraídos a partir das colônias e submetidos à clivagem com a mesma enzima utilizada para a clonagem. Foram observados fragmentos de aproximadamente 3.000 nt, correspondente ao vetor plasmidial, e 2.600 nt, correspondente ao componente genômico viral, confirmando-se assim o processo de clonagem do componente viral completo (Figura 5).

Figura 5 - Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) da clivagem de DNA plasmidial proveniente da clonagem de componentes genômicos, com as enzimas *Bam* HI, *Eco* RV e *Apa* I. **M**, marcador de comprimento ("1 Kb plus DNA ladder", em nucleotídeos); **1-45**, clones obtidos a partir de amostras coletas em Viçosa-MG: **1-10** e **16-20**, enzima *Bam* HI. **11-15**, enzima *Eco* RV, **21-45**, enzima *Apa* I.



Fonte: (Autora, 2011)

4.2 Caracterização molecular

Entre as dezoito amostras selecionadas para clonagem e sequenciamento dos genomas virais, nove foram coletadas no município de Viçosa-MG e nove foram coletadas em diferentes municípios do estado de Alagoas. Os clones foram submetidos à digestão com a enzima *Hae* III. Dos 56 clones selecionados, apenas 26 correspondiam a DNA-A, 11 foram obtidos de amostras de Viçosa-MG e 15 foram obtidos de amostras do estado de Alagoas (Tabela 3).

A análise das sequências dos 26 clones, os quais correspondiam ao DNA-A, indicou a presença de dez espécies de begomovírus (Figura 6 e Tabela 4). Quatro dessas espécies *Sida yellow net virus* – SiYNV, *Sida yellow blotch virus* – SiYBV, *Sida yellow mosaic Alagoas virus* – SiYMAV e *Sida mottle Alagoas virus* – SiMoAV são consideradas espécies novas, pois os clones correspondentes apresentaram menos de 89% de identidade com os begomovírus já descritos e entre si, deste modo não ultrapassando o limite para designação de espécie para o gênero *Begomovirus* de 89% de identidade de nucleotídeos, conforme estabelecido por Fauquet *et al.* (2008).

O isolado BR:Vic1:10 obtido de *Sida santaremnensis* corresponde ao *Sida yellow mosaic virus* (SiYMV), com 97,5% de identidade com SiYMV (AY090558). Os isolados BR:Vic3:10, BR:Vic4:10, BR:Vic5:10 e BR:Vic8:10 obtidos de *Sidastrum micranthum* correspondem ao isolado de *Sida common mosaic virus* (SiCmMV), com 94,0% - 97,1% de identidade com o SiCmMV (EU710751). Os isolados BR:Vic6:10 e BR:Vic7 obtidos de *Sida urens* correspondem ao *Tomato mild mosaic virus* (ToMiMV), com 95,1% de identidade com o ToMiMV (EU710752). Esta espécie é também relatada infectando tomateiro (Castillo-Urquiza *et al.*, 2008). O isolado BR:Vic9:10 obtido de *S. santaremnensis* corresponde ao *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV), com 96,4% de identidade com o EuYMV (FJ619507). Os isolados BR:Vic10:10 e BR:Vic11:10 obtidos de *S. santaremnensis* correspondem ao *Sida mottle virus* (SiMoV), com 95,4% de identidade com o SiMoV (AY090555). As espécies SiYMV e SiMoV foram detectadas em plantas daninhas encontradas frequentemente dentro e perto de campos de tomate (Fernandes *et al.* 1999), e a presença do SiMoV já foi detectada em tomateiro e em *Sida rhombifolia* (Fernandes *et al.*, 1999; Cotrim *et al.*, 2007). Assim, a hipótese de que os

begomovírus atualmente presentes em tomateiro evoluíram a partir de vírus em plantas daninhas é reforçada com esses resultados.

Tabela 3 - Código da amostra, procedência das plantas daninhas e lista de clones completamente sequenciados.

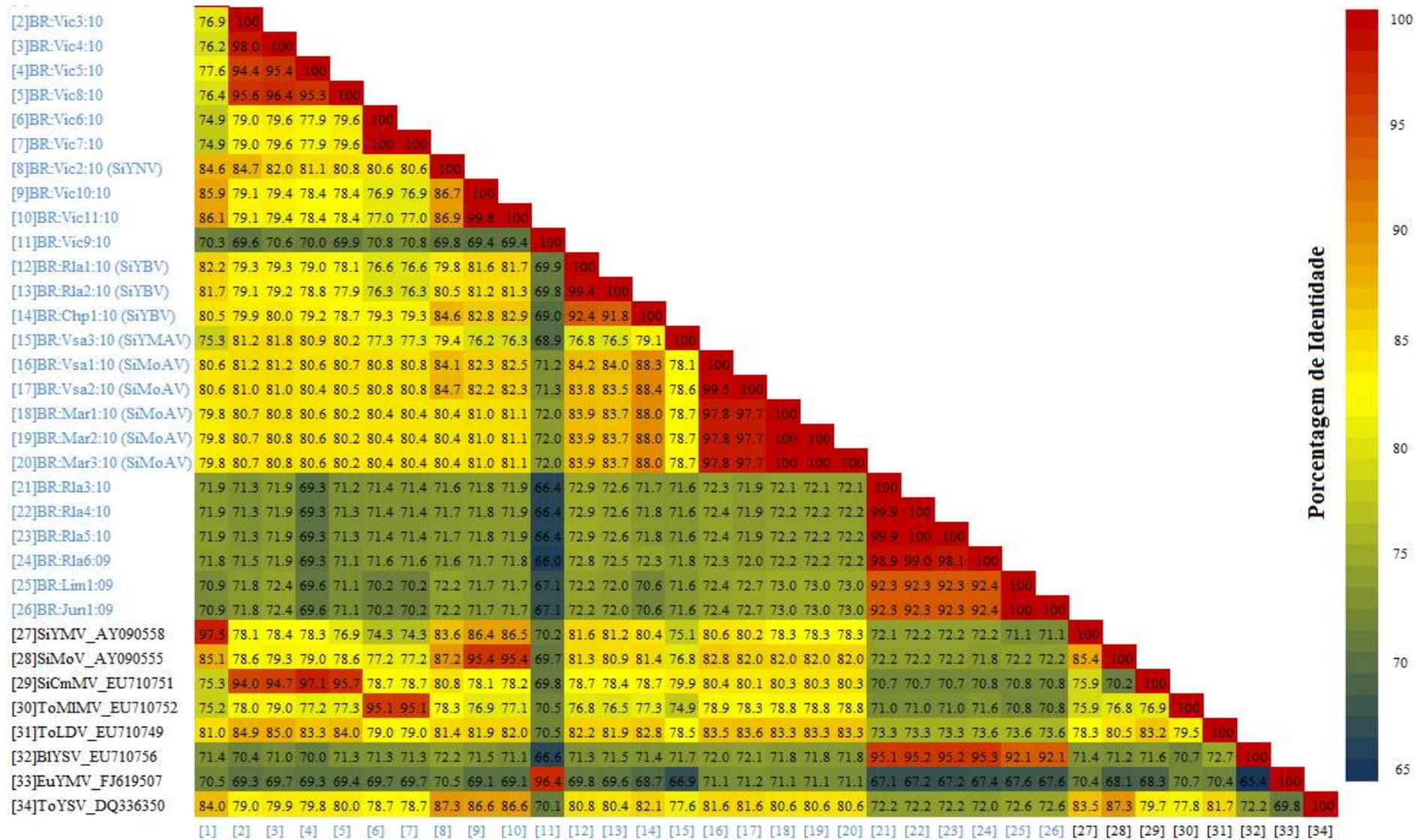
Código da amostra	Local de coleta	Clone	Isolado
Minas Gerais			
16DN	Viçosa	1SS	BR:Vic1:10
22DN	Viçosa	2SS	BR:Vic2:10
33DN	Viçosa	3SS	BR:Vic3:10
35DN	Viçosa	4SS	BR:Vic4:10
37DN	Viçosa	5SS	BR:Vic5:10
13p	Viçosa	6SS, 7SS	BR:Vic6:10, BR:Vic7:10
15DN	Viçosa	8SS	BR:Vic8:10
26DN	Viçosa	9SS	BR:Vic9:10
28DN	Viçosa	10SS, 11SS	BR:Vic10:10, BR:Vic11:10
Alagoas			
14M	Rio Largo	12SS, 13SS	BR:Rla1:10, BR:Rla2:10
49M	Viçosa	14SS	BR:Vsa3:09
61M	Viçosa	15SS, 16SS	BR:Vsa1:10, BR:Vsa2:10
64M	Maragogi	17SS, 18SS, 19SS	BR:Mar1:10, BR:Mar2:10, BR:Mar3:10
65M	Chã Preta	20SS	BR:Chp1:10
262	Rio Largo	21SS, 22SS, 23SS	BR:Rla3:10, BR:Rla4:10, BR:Rla5:10
252	Junqueiro	24SS	BR:Jun1:09
253	Limoeiro	25SS	BR:Lim1:09
254	Rio Largo	26SS	BR:Rla6:09

Fonte: (Autora, 2011)

Os isolados BR:Rla3:10, BR:Rla4:10, BR:Rla5:10, BR:Jun1:09, BR:Lim1:09 e BR:Rla6:09 obtidos de *Blainvillea rhomboidea* correspondem ao *Blainvillea yellow spot virus* (BIYSV) com 92,1% - 95,3% de identidade com BIYSV (EU710756). Esta espécie foi relatada e obtida do mesmo hospedeiro por Castillo-Urquiza *et al.* (2008). Os trabalho de Castillo-Urquiza *et al.* (2008) assim como este mostram que, *B. rhomboidea*, pertencente à família Asterareae, é infectada apenas por BIYSV e BIYSV só é encontrado em *B. rhomboidea*, fazendo-se assim necessário o desenvolvimento de novos estudos com o propósito de detectar a gama de hospedeiros deste vírus. Silva *et al* (2011) trabalhou com vinte e três amostras de *Cleome affinis* coletadas na região Nordeste do Brasil e encontrou apenas *Cleome leaf crumple virus* (CILCrV), sugerindo que *C. affinis* é infectada apenas por CILCrV. Esta situação é semelhante à que ocorre em *B. rhomboidea*, pois o vírus parece ser restrito a um único hospedeiro e o hospedeiro tem apenas um vírus infectando-o.

O isolado BR:Vic2:10 obtido de *S. micranthum* (Figura 8A) representa uma nova espécie relacionada a ToYSV e SiMoV (DQ336350 e AY090555, com 87,3 e 87,2% de identidade, respectivamente) para a qual é proposta o nome Sida yellow net virus (SiYNV). Uma segunda espécie é representada pelos isolados BR:Vsa1:10 e BR:Vsa2:10, obtidos de *Sida urens*, e BR:Mar1:10, BR:Mar2:10 e BR:Mar3:10 obtidos de *Sida* sp. (Figura 8B), a qual está mais relacionado ao Tomato leaf distortion virus – ToLDV (EU710749, 83,3% - 83,6% de identidade) e cujo nome proposto é Sida mottle Alagoas virus (SiMoAV). Uma terceira espécie é representada pelos isolados BR:Rla1:10, BR:Rla2:10 e BR:Chp1:10 obtidos de *S. urens* (Figura 8C), a qual está mais relacionada com o SiMoAV (83,5% - 88,4% de identidade) e cujo o nome proposto é Sida yellow blotch virus (SiYBV). O Isolado BR:Vsa3:09 obtido de *S. urens* (Figura 8D) também corresponde a uma nova espécie, mais relacionada com o SiCmMV (EU710751, 79,9% de identidade) e cujo nome proposto é Sida yellow mosaic Alagoas virus (SiYMAV).

Figura 6 - Porcentagem de identidade de nucleotídeos entre isolados de begomovírus obtidos a partir de plantas daninhas e outros begomovírus descritos anteriormente.



Fonte: (Autora, 2011)

Tabela 4. Classificação taxonômica dos isolados obtidos das amostras de plantas daninhas coletadas em Minas Gerais e Alagoas

Isolado	Local de coleta	Hospedeiro	Espécie
Minas Gerais			
BR:Vic1:10	Viçosa	<i>Sida santaremnensis</i>	<i>Sida yellow mosaic virus</i> - SiYMV
BR:Vic2:10	Viçosa	<i>Sidastrum micranthum</i>	<i>Sida yellow net virus</i> - SiYNV _(novo)
BR:Vic3:10	Viçosa	<i>Sidastrum micranthum</i>	<i>Sida common mosaic virus</i> - SiCmMV
BR:Vic4:10	Viçosa	<i>Sidastrum micranthum</i>	<i>Sida common mosaic virus</i> - SiCmMV
BR:Vic5:10	Viçosa	<i>Sidastrum micranthum</i>	<i>Sida common mosaic virus</i> - SiCmMV
BR:Vic6:10, BR:Vic7:10	Viçosa	<i>Sida urens</i>	<i>Tomato mild mosaic virus</i> - ToMiMV
BR:Vic8:10	Viçosa	<i>Sidastrum micranthum</i>	<i>Sida common mosaic virus</i> - SiCmMV
BR:Vic9:10	Viçosa	<i>Sida santaremnensis</i>	<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i> - EuYMV
BR:Vic10:10, BR:Vic11:10	Viçosa	<i>Sida santaremnensis</i>	<i>Sida mottle virus</i> - SiMoV
Alagoas			
BR:Rla1:10, BR:Rla2:10	Rio Largo	<i>Sida urens</i>	<i>Sida yellow blotch virus</i> - SiYBV _(novo)
BR:Vsa3:09	Viçosa	<i>Sida urens</i>	<i>Sida yellow mosaic Alagoas virus</i> - SiYMAV _(novo)
BR:Vsa1:10, BR:Vsa2:10	Viçosa	<i>Sida urens</i>	<i>Sida mottle Alagoas virus</i> - SiMoAV _(novo)
BR:Mar1:10, BR:Mar2:10, BR:Mar3:10	Maragogi	<i>Sida</i> sp.	<i>Sida mottle Alagoas virus</i> - SiMoAV
BR:Chp1:10	Chã Preta	<i>Sida urens</i>	<i>Sida yellow blotch virus</i> - SiYBV
BR:Rla3:10, BR:Rla4:10, BR:Rla5:10	Rio Largo	<i>Blainvillea rhomboidea</i>	<i>Blainvillea yellow spot virus</i> - BIYSV
BR:Jun1:09	Junqueiro	<i>Blainvillea rhomboidea</i>	<i>Blainvillea yellow spot virus</i> - BIYSV
BR:Lim1:09	Limoeiro	<i>Blainvillea rhomboidea</i>	<i>Blainvillea yellow spot virus</i> - BIYSV
BR:Rla6:09	Rio Largo	<i>Blainvillea rhomboidea</i>	<i>Blainvillea yellow spot virus</i> - BIYSV

Fonte: (Autora, 2011)

Figura 8 - Amostras apresentando sintomas típicos de infecção por begomovírus, de onde foram obtidas as novas espécies de begomovírus. **A** Sida yellow net virus – SiYNV (*Sidastrum micranthum*), **B** Sida mottle Alagoas virus – SiMoAV (*Sida* sp.), **C** Sida yellow blotch virus – SiYBV (*Sida urens*) e **D** Sida yellow mosaic Alagoas virus - SiYMAV (*Sida urens*).



Fonte: (Autora, 2011)

Os vírus descritos neste trabalho apresentam características típicas de begomovírus bisegmentados do Novo Mundo. A origem de replicação viral (TAATATTAC) (Heyraud-Nitckhe *et al.*, 1995; Orozco; Hanley-Bowdoin, 1998), característica em todos os geminivírus está presente em todos os clones. Foram identificadas as ORFs: *cp* (“coat protein”), *rep* (“replication-associated protein”), *ren* (“replication enhance protein”), *trap* (“trans-activating protein”), AC4 e AC5 (Tabela5).

Tabela 5 - Aminoácidos (aa) das ORFs de cada espécie viral.

Espécies virais e isolado	<i>cp</i>	<i>rep</i>	<i>ren</i>	<i>trap</i>	AC4	AC5
<i>Sida yellow mosaic virus</i> (SiYMV) - BR:Vic1:10	251 aa	358 aa	132 aa	129 aa	85 aa	-
<i>Sida yellow net virus</i> (SiYNV) - BR:Vic2:10	259 aa	359 aa	132 aa	129 aa	87 aa	-
<i>Sida common mosaic virus</i> (SiCmMV) - BR:Vic3:10	249 aa	359 aa	132 aa	129 aa	155 aa	-
<i>Tomato mild mosaic virus</i> (ToMiMV) - BR:Vic6:10	249 aa	361 aa	132 aa	129 aa	85 aa	-
<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i> (EuYMV) - BR:Vic9:10	249 aa	359 aa	132 aa	129 aa	120aa	179aa
<i>Sida mottle virus</i> (SiMoV) - BR:Vic10:10	250 aa	359 aa	132 aa	129 aa	87 aa	-
<i>Sida yellow blotch virus</i> (SiYBV) - BR:Rla1:10	251 aa	358 aa	132 aa	129 aa	85 aa	96aa
<i>Sida yellow mosaic Alagoas virus</i> (SiYMAV) - BR:Vsa3:10	251 aa	358 aa	132 aa	129 aa	85 aa	105aa
<i>Sida mottle Alagoas virus</i> (SiMoAV) - BR:Vsa1:10	251 aa	361 aa	132 aa	129 aa	85 aa	-
<i>Blainvillea yellow spot virus</i> (BIYSV) - BR:Rla3:10	251 aa	358 aa	132 aa	131 aa	85 aa	181aa

Fonte: (Autora, 2011)

As viroses transmitidas por mosca branca (*B. tabaci*) foram inicialmente estudadas no Brasil durante a década de 1930. Atualmente a incidência e severidade de doenças em culturas de importância econômica como feijão, tomate e algodão tem aumentado significativamente no Brasil e em outros países, devido ao aumento populacional da *B. tabaci* (Morales, 2006). A *B. tabaci* biótipo B é uma espécie cosmopolita, polífaga e com eficiente disseminação, resultando assim num sério problema para uma vasta gama de hospedeiros (Anderson, 1993; Caballero, 1993). Essas características permitiram a transmissão de begomovírus a novos hospedeiros, e o aparecimento de novas variantes recombinantes resultantes de infecção mista (Ribeiro *et al.*, 2007).

Neste estudo, oito diferentes espécies de begomovírus foram encontradas nas 14 amostras pertencentes à família Malvaceae, sendo quatro espécies novas. Com o avanço do método simples de clonagem utilizando amplificação por círculo rolante (RCA), é possível realizar a identificação de um grande número de novas espécies que vem sendo resultado graças ao uso dessa técnica. Entre as espécies novas apenas uma foi encontrada em Minas Gerais e três em Alagoas, assim o total de espécie encontrada em Minas Gerais foi menor do que em Alagoas. Levando-se em consideração os hospedeiros, as espécies de *Sida* são um reservatório natural de diferentes espécies de begomovírus, enquanto *Blainvillea*, ao que tudo indica, hospeda apenas o

Blainvillea yellow spot virus. No trabalho de Silva *et al* (2011) observa-se resultados semelhante onde *Macroptilium* é um reservatório natural de diferentes espécies de begomovírus, assim como *Sida*, enquanto que *Cleome* hospeda apenas *Cleome leaf crumple virus* (CILCrV), assim como *Blainvillea*. Estes resultados mostram que uma grande diversidade de begomovírus é encontrada infectando diferentes espécies de plantas daninhas, e que ainda podem ser encontradas novas espécies de begomovírus nestas plantas. Demonstra ainda a grande diversidade de begomovírus que infectam plantas daninhas no Brasil. Resultados semelhantes têm sido observados por outros autores trabalhando com espécies de plantas daninhas (Jovel *et al.*, 2004; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008; Paprotka *et al.*, 2010b; Silva *et al.*, 2011a; Silva *et al.*, 2011b).

4.3 Análise filogenética

Para determinar o relacionamento filogenético dos begomovírus encontrados em Viçosa-MG e em municípios de Alagoas com outros begomovírus relatados anteriormente no Brasil, foi construída uma árvore filogenética baseada no DNA-A pelo método de “Neighbour-Joining” (Figura 8).

As novas espécies *Sida mottle Alagoas virus* (SiMoAV) e *Sida Yellow blotch virus* (SiYBV), ambas clonadas a partir de amostra de *Sida urens*, formaram ramos distintos com 100% de confiabilidade. Essas duas espécies formaram um grupo que inclui também o isolado de EuYMV (BR:Vic9:10) obtidos a partir de *Sida santaremnensis*, e as espécies *Euphorbia mosaic virus* (EuMV), *Sida yellow leaf curl virus* (SiYLCV), *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV) e *Abutilon Brazil virus* (AbBV). Essas espécies são todas filogeneticamente mais próximas de begomovírus encontrados na América Central e do Sul do que dos begomovírus brasileiros (Castillo-Urquiza *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2011a; Silva *et al.*, 2011b). No segundo grupo o isolado BR:Vic1:10 (SiYMV) agrupou com a nova espécie *Sida yellow net virus* (SiYNV), além dos isolados de SiMoV (BR:Vic10:10 e BR:Vic11:10). O terceiro grupo inclui os isolados BR:Vic6:10 e BR:Vic7:10 (ToMiMV), a nova espécie *Sida yellow mosaic Alagoas virus* (SiYMAV) e os isolados BR:Vic3:10, BR:Vic4:10, BR:Vic5:10 e BR:Vic8:10 (SiCmMV) clonados a partir de amostra de *Sida micranthum*. No quarto grupo estão os isolados BR:Rla3:10, BR:Rla4:10, BR:Rla5:10, BR:Jun1:09, BR:Lim1:09 e BR:Rla6:09 (BIYSV) clonados de amostra

de *B. rhomboidea*. Os resultados da análise filogenética estão de acordo com os resultados obtidos na análise de comparação de sequências.

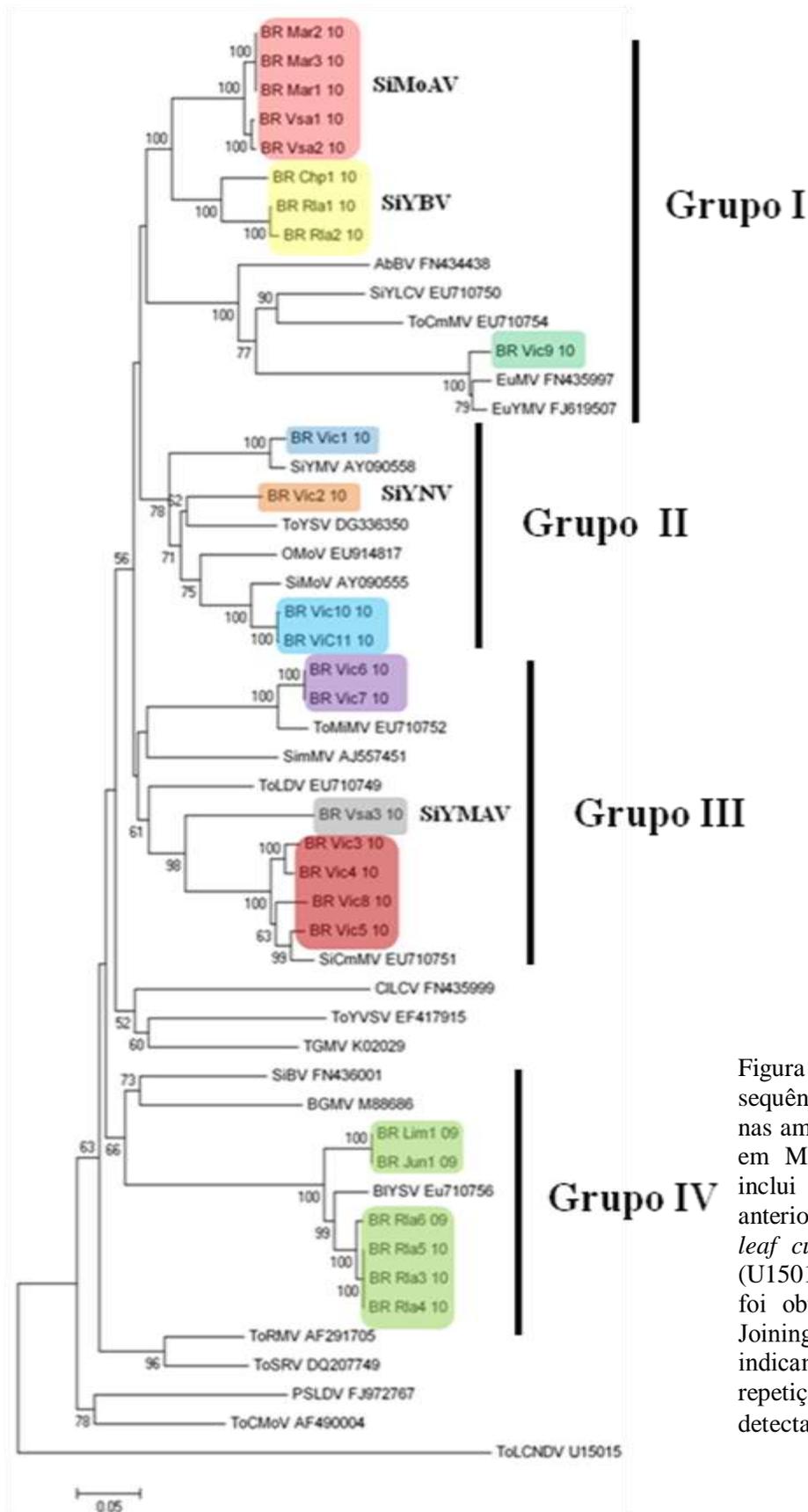


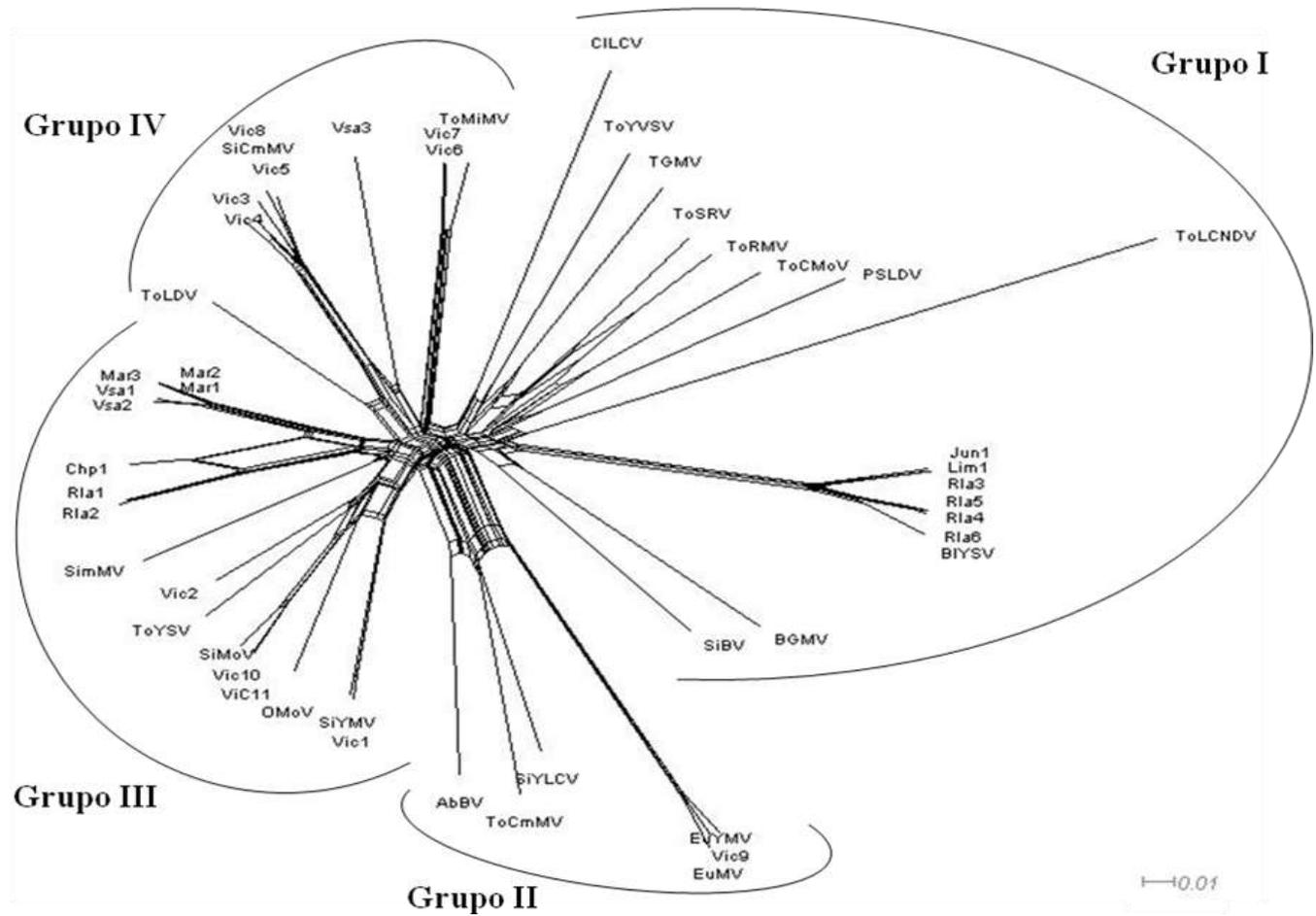
Figura 9 - Árvore filogenética baseada nas sequências do DNA-A dos vírus detectados nas amostras de plantas daninhas coletadas em Minas Gerais e Alagoas. A árvore inclui espécies de begomovírus descritas anteriormente no Brasil e a espécie *Tomato leaf curl New Delhi virus* - *ToLCNDV* (U15015), usada como outgroup. A árvore foi obtida pelo método de “Neighbour-Joining”. Os números em cada ramo indicam o valor de “bootstrap” (2.000 repetições). As dez espécies virais detectadas nas amostras estão destacadas.

4.4 - Análise da recombinação

Para investigar os possíveis eventos de recombinação dos isolados que representam as espécies novas, realizou-se análise para evidência filogenética de recombinação com o programa SplitsTree v. 4.1 (Huson; Bryant, 2006) o que resultou na formação de uma estrutura em rede, sugerindo a ocorrência de eventos de recombinação (Figura 10). Evidências sugerem que a recombinação é uma fonte comum e importante de diversidade genética em begomovírus brasileiros (Galvão *et al.*, 2003; Inoue-Nagata *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007). Begomovírus recombinantes foram diretamente implicados no aparecimento de novas doenças e epidemias em culturas de diversos países (Pita *et al.*, 2001; Monci, 2002; Garcia-Andres *et al.*, 2007a; Garcia-Andres *et al.*, 2007b; Garcia-Andres *et al.*, 2006; Lefeuvre *et al.*, 2010). Dois dos possíveis eventos de recombinação detectados por inferência filogenética foram confirmados pela análise no programa RDP3. Eventos de recombinação foram detectados por seis métodos (RDP; GeneConv; Bootscan; MaxChi; CHIMAERA; SisScan; 3S) com valor P $1,9 \times 10^{-25}$, $2,7 \times 10^{-25}$, $2,5 \times 10^{-25}$, $2,2 \times 10^{-22}$, $2,7 \times 10^{-21}$ e $2,0 \times 10^{-22}$ para os isolados BR:Rla1:10 e BR:Rla2:10, com BR:Chp1:10 e um vírus desconhecido como possíveis isolados parentais e os sítios de recombinação nas posições 2001-64 e 2001-2648, respectivamente. Outro evento de recombinação foi detectado por quatro métodos (Bootscan; MaxChi; CHIMAERA; SisScan; 3S) com valor P $8,1 \times 10^{-07}$, $6,9 \times 10^{-07}$, $3,4 \times 10^{-18}$, $2,1 \times 10^{-18}$ para o isolado BR:Vic2:10, com BR:Vsa2:10 e SiMoV (AY090555) como isolados parentais e os sítios de recombinação nas posições 37-2217 (Tabela 6).

No primeiro evento está ocorrendo recombinação intraespecífica em *rep*. Esse fato é corroborado com os resultados da árvore filogenética e a análise reticulada, onde o isolado BR:Chp1:10 de SiYBV ficou separado dos isolados de Rio Largo. Já no segundo evento está ocorrendo recombinação interespecífica, com a região comum, toda *cp* e parte da *rep* de BR:Vic2:10 (SiYNV) proveniente do SiMoV, resultado também confirmado pela análise filogenética, onde SiYNV e SiMoV encontram-se num mesmo grupo da árvore (Grupo II). Na análise reticulada este evento não foi evidenciado, contudo a análise de recombinação no RDP3 envolve diferentes métodos de detecção, e com isso, o segundo evento de recombinação detectado pode ser considerado real.

Figura 10 - Evidência filogenética de recombinação entre begomovírus já descritos no Brasil e os isolados das espécies determinadas em plantas daninhas descritas nesse trabalho. A formação de uma rede de uma árvore bifurcada segue a ocorrência de recombinação.



Fonte: (Autora, 2011)

Tabela 6 - Eventos de recombinação detectados entre os begomovirus já descritos no Brasil e os isolados das espécies tentativas de plantas daninhas descritas nesse trabalho.

Clone	Parentais		Breakpoints		valor <i>P</i>						
	Maior	Menor	Inicial	Final	R ^b	G	B	M	C	S	3S
BR:Rla1:10	SimMVxUnknown ^a		208	459	2,5 x 10 ⁻⁰²	- ^c	1,8 x 10 ⁻⁰²	3,4 x 10 ⁻⁰²	4,0 x 10 ⁻⁰²	1,4 x 10 ⁻⁰⁵	-
	BR:Chp1:10 xUnknown		2001	64	1,9 x 10 ⁻²⁵	2,7 x 10 ⁻²⁵	2,5 x 10 ⁻²⁵	2,2 x 10 ⁻¹⁹	2,7 x 10 ⁻²¹	2,0 x 10 ⁻²²	-
BR:Rla2:10	SimMVxUnknown		208	459	2,5 x 10 ⁻⁰²	-	1,8 x 10 ⁻⁰²	3,4 x 10 ⁻⁰²	4,0 x 10 ⁻⁰²	1,4 x 10 ⁻⁰⁵	-
	BR:Chp1:10 xUnknown		2001	2648	1,9 x 10 ⁻²⁵	2,7 x 10 ⁻²⁵	2,5 x 10 ⁻²⁵	2,2 x 10 ⁻¹⁹	2,7 x 10 ⁻²¹	2,0 x 10 ⁻²²	-
BR:Vic2:10	ToYSVxSiCmMV		2416	2649	6,9 x 10 ⁻⁰⁵	1,6 x 10 ⁻⁰⁴	1,3 x 10 ⁻⁰²	5,4 x 10 ⁻⁰⁵	6,3 x 10 ⁻⁰⁵	5,6 x 10 ⁻⁰⁴	1,2 x 10 ⁻⁰³
	BR:Vsa2:10 xSiMoV		37	2217	-	-	-	8,1 x 10 ⁻⁰⁷	6,9 x 10 ⁻⁰⁷	3,4 x 10 ⁻¹⁸	2,1 x 10 ⁻¹⁸

^a Somente quando o parental maior é identificado, o menor parental não é identificado. "Unknown", nenhum parental identificado.

Fonte: (Autora, 2011)

^b R, RDP; G, GeneConv; B, Bootscan; M, MaxChi; C, CHIMAERA; S, SisScan; 3S, 3SEQ.

^c evento de recombinação não detectado.

5. CONCLUSÕES

- Existe uma grande diversidade de espécies de begomovírus infectando plantas daninhas em Minas Gerais e Alagoas;
- A detecção de quatro espécies novas a partir de 18 amostras de plantas daninhas ressalta a diversidade genética de begomovírus no Brasil. A ocorrência dessas espécies novas reforça a hipótese de que essas plantas são um reservatório natural de begomovírus;
- As espécies de *Sida* é um reservatório natural de diferentes espécies de begomovírus, enquanto *Blainvillea*, ao que tudo indica, hospeda apenas o *Blainvillea yellow spot virus*.
- A ocorrência do vírus ToMiMV, vírus de tomateiro, sendo também encontrado em planta daninha reforça a hipótese de que os vírus atualmente presentes no tomateiro foram originados a partir de vírus presentes em plantas daninhas;
- Eventos de recombinação são processos evolutivos importantes na diversidade genética e evolução de begomovírus infectando plantas daninhas, adicionalmente novos estudos são necessários para demonstrar que estas plantas daninhas podem apresentar um papel significativo nas epidemias de begomovírus em plantas cultivadas, atuando como fonte de inóculo ou como fonte de surgimento de novas espécies.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, L.C. et al. A novel monopartite begomovirus infecting sweet potato in Brazil. **Archives of virology**, New York, v. 156, n. 07, p. 1291-1294, 2011.
- AMBROZEVICIUS, L.P. et al. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 372-377, 2002.
- ANDERSON, P. K. 1993. Un modelo para la investigación en mosca blanca, *Bemisia tabaci* (Gennadius). In: HILJE, L. & ARBOLEDA, O. Las moscas blancas (Homoptera : Aleyrodidae) en America Central e El Caribe. **Turrialba: Ser. Tec. Inf. Tec**, n.205, p.27-33
- 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**, London, v. 87, p. 3687-3696, 2006a.
- ANDRADE, E.C. et al. Análise parcial dos determinantes genéticos virais responsáveis pela indução de sintomas por begomovírus em tomateiro e *Nicotiana benthamiana*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. S225, 2006b.
- ARGUELLO-ASTORGA, G. et al. High-frequency reversion of geminivirus replication protein mutants during infection. **Journal of Virology**, Washington, v. 81, p. 11005-11015, 2007.
- ARGUELLO-ASTORGA, G. et al. A novel motif in geminivirus replication proteins interacts with the plant retinoblastoma-related protein. **Journal of Virology**, Washington, v. 78, p. 4817-4826, 2004.
- ARGÜELLO-ASTORGA, G.R. et al. Geminivirus replication origins have a group-specific organization of interactive elements: a model for replication. **Virology**, New York, v. 203, p. 90-100, 1994.
- ARGUELLO-ASTORGA, G.R.; RUIZ-MEDRANO, R. An iteron-related domain is associated to Motif 1 in the replication proteins of geminiviruses: identification of potential interacting amino acid-base pairs by a comparative approach. **Archives of Virology**, New York, v. 146, p. 1465-1485, 2001.
- ARNAUD, L.S.E.P. et al. Predominância de begomovírus em tomateiros na região produtora da Serra de Ibiapaba, Ceará, e sua detecção natural em plantas daninhas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 241-246, 2007.
- ASSUNÇÃO, I.P. et al. Diversidade genética de begomovírus que infectam plantas invasoras na Região Nordeste. **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v. 24, p. 239-244, 2006.

- BEDFORD, I.D. et al. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographical regions. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 125, p. 311-325, 1994.
- BERRIE, L.C.; RYBICKI, E.P.; REY, M.E. Complete nucleotide sequence and host range of South African cassava mosaic virus: further evidence for recombination amongst begomoviruses. **Journal of General Virology**, London, v. 82, p. 53-58., 2001.
- BIAGINI, P. **Human circoviruses**. In: (Ed.). *Veterinary Microbiology*. Netherlands, v.98, 2004. p.95-101.
- BRIDDON, R.W. Cotton leaf curl disease, a multicomponent begomovirus complex. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v. 4, p. 427-434, 2003.
- BRIDDON, R.W. et al. Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, tomato pseudo-curly top virus, suggests a recombinant origin. **Virology**, New York, v. 219, p. 387-394, 1996.
- BRIDDON, R.W. et al. Diversity of DNA beta, a satellite molecule associated with some monopartite begomoviruses. **Virology**, New York, v. 312, p. 106-121, 2003.
- BRIDDON, R.W. et al. Turnip curly top virus, a highly divergent geminivirus infecting turnip in Iran. **Virus Research**, Amsterdam, v. 152, p. 169-175, 2010a.
- BRIDDON, R.W. et al. Identification of DNA components required for induction of cotton leaf curl disease. **Virology**, New York, v. 285, p. 234-243, 2001.
- BRIDDON, R.W. et al. Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 10, p., 2010b.
- BRIDDON, R.W. et al. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. **Virology**, New York, v. 177, p. 85-94, 1990.
- BRIDDON, R.W.; STANLEY, J. Subviral agents associated with plant single-stranded DNA viruses. **Virology**, New York, v. 344, p. 198-210, 2006.
- BULL, S.E. et al. Genetic diversity and phylogeography of cassava mosaic viruses in Kenya. **Journal of General Virology**, London, v. 87, p. 3053-3065, 2006.
- BULL, S.E. et al. Infectivity, pseudorecombination and mutagenesis of Kenyan cassava mosaic begomoviruses. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 1624-1633, 2007.
- CABALLERO, R. 1993. Moscas blancas neotropicales (Homoptera : Aleyrodidae): hospedantes, distribución, enemigos naturales e importancia económica. In: HILJE, L. & ARBOLEDA, O. Las moscas blancas (Homoptera : Aleyrodidae) en America Central e El Caribe. **Turrialba: Ser. Téc. Inf. Téc.**, n.205, p.10-15.

CALEGARIO, R.F. Caracterização do isolado de begomovírus MG-Bi2, um possível membro da espécie *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV). (Tese M.S.). Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004. 48 p.

CALEGARIO, R.F. et al. Characterization of *Tomato yellow spot virus*, (ToYSV), a novel tomato-infecting begomovirus from Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 42, p. 1335-1343, 2007.

CAMPOS-OLIVAS, R. et al. 1H, 13C, and 15N assignment of the N-terminal, catalytic domain of the replication initiation protein from the geminivirus TYLCV. **Journal of Biomolecular NMR**, Zürich, v. 24, p. 73-74., 2002.

CARVALHO, C.M. et al. A novel nucleocytoplasmic traffic GTPase identified as a functional target of the bipartite geminivirus nuclear shuttle protein. **Plant Journal**, Oxford, v. 55, p. 869-880, 2008.

CASTILLO-URQUIZA, G.P. Diversidade e estrutura genética de begomovírus em duas regiões produtoras de tomate do Sudeste do Brasil. (Tese D.S.). Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008. 107 p.

CASTILLO-URQUIZA, G.P. et al. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Archives of Virology**, New York, v. 153, p. 1985-1989, 2008.

CASTILLO-URQUIZA, G.P. et al. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato in Paty do Alferes, Rio de Janeiro state, Brazil. **Virus Reviews and Research**, Belo Horizonte, v. 12, p. 233, 2007.

CHATTERJI, A. et al. Identification of replication specificity determinants in two strains of tomato leaf curl virus from New Delhi. **Journal of Virology**, Washington, v. 73, p. 5481-5489, 1999.

CHEN, H. et al. Up-regulation of LSB1/GDU3 affects geminivirus infection by activating the salicylic acid pathway. **Plant Journal**, Oxford, v. 62, p. 12-23, 2010.

COSTA, A.S.; OLIVEIRA, A.R.; SILVA, D.M. Transmissão mecânica do mosaico dourado do tomateiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, Brasília, v. 6, p. 147, 1975.

COTRIM, M.A. et al. Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 33, p. 300-303, 2007.

CUI, X.F.; LI, G.X. et al. A begomovirus DNA beta-encoded protein binds DNA, functions as a suppressor of RNA silencing, and targets the cell nucleus. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, p. 10764-10775, 2005.

CUI, X.F. et al. A DNA beta associated with Tomato Yellow Leaf Curl China Virus is required for symptom induction. **Journal of Virology**, Washington, v. 78, p. 13966-13974, 2004.

- DAVIES, J.W. et al. Structure and replication of geminivirus genomes. **Journal of Cell Science**, London, v. 7, p. 95-107, 1987.
- DAVINO, S. et al. Two new natural begomovirus recombinants associated with the tomato yellow leaf curl disease co-exist with parental viruses in tomato epidemics in Italy. **Virus Research**, Amsterdam, v. 143, p. 15-23, 2009.
- DRAKE, J.W. A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, p. 7160-7164, 1991.
- 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**, Washington, v. 82, 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**, London, v. 90, p. 1539-1547, 2009.
- DUFFY, S.; SHACKELTON, L.A.; HOLMES, E.C. Rates of evolutionary change in viruses: Patterns and determinants. **Nature Reviews Genetics**, London, v. advanced online publication, p., 2008.
- EAGLE, P.A.; OROZCO, B.M.; HANLEY-BOWDOIN. A DNA sequence required for geminivirus replication also mediates transcriptional regulation. **Plant Cell**, Rockville, v. 6, p. 1157-1170, 1994.
- FARGETTE, D.; THRESH, J.M.; OTIM-NAPE, G.W. The epidemiology of African cassava mosaic geminivirus: Reversion and the concept of equilibrium. **Tropical Science**, London, v. 34, p. 123-133, 1994.
- FARIA, J.C. et al. Situação atual das geminiviroses no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 125-137, 2000.
- 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**, Saint Paul, v. 84, p. 321-329, 1994.
- FARIA, J.C.; MAXWELL, D.P. Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 89, p. 262-268, 1999.
- FAUQUET, C.; FARGETTE, D. African cassava mosaic virus: etiology, epidemiology and control. **Plant Disease**, Palo Alto, v. 74, p. 404-411, 1990.
- FAUQUET, C.M. et al. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. **Archives of Virology**, New York, v. 153, p. 783-821, 2008.

- FAUQUET, C.M. et al. Sequence analysis and classification of apparent recombinant begomoviruses infecting tomato in the Nile and Mediterranean basins. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 95, p. 549-555, 2005.
- FERNANDES, A.V. et al. Cloning and molecular characterization of A components of two new *Sida rhombifolia*-infecting geminiviruses. **Virus Reviews and Research**, Belo Horizonte, v. 4, p. 148, 1999.
- FERNANDES, F.R. et al. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. **Virus Genes**, Norwell, v. 36, p. 251-258, 2008.
- FERNANDES, F.R. et al. Three distinct begomoviruses associated with soybean in central Brazil. **Archives of Virology**, New York, v. 154, p. 1567-1570, 2009.
- FERNANDES, J.J. et al. Biological and molecular properties of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. **Plant Pathology**, Oxford, v. 55, p. 513-522, 2006.
- FIALLO-OLIVE, E. et al. Two novel begomoviruses belonging to different lineages infecting *Rhynchosia minima*. **Archives of Virology**, New York, v. 155, p. 2053-2058, 2010.
- FONDONG, V.N. et al. Evidence of synergism between African cassava mosaic virus and a new double-recombinant geminivirus infecting cassava in Cameroon. **Journal of General Virology**, London, v. 81, 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**, Amsterdam, v. 128, 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**, Amsterdam, v. 126, p. 262-267, 2007.
- FONTES, E.P.B. et al. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 269, p. 8459-8465, 1994.
- FONTES, E.P.B.; LUCKOW, V.A.; HANLEY-BOWDOIN, L. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. **Plant Cell**, Rockville, v. 4, p. 597-608, 1992.
- FRISCHMUTH, S. et al. Yeast two-hybrid systems confirm the membrane association and oligomerization of BC1 but do not detect an interaction of the movement proteins BC1 and BV1 of Abutilon mosaic geminivirus. **Archives of Virology**, New York, v. 149, p. 2349-2364, 2004.
- FRISCHMUTH, S. et al. The movement protein BC1 promotes redirection of the nuclear shuttle protein BV1 of Abutilon mosaic geminivirus to the plasma membrane in fission yeast. **Protoplasma**, New York, v. 230, p. 117-123, 2007.

FRISCHMUTH, T. et al. Nucleotide sequence evidence for the occurrence of three distinct whitefly-transmitted, Sida-infecting bipartite geminiviruses in Central America. **Journal of General Virology**, London, v. 78, p. 2675-2682, 1997.

GAFNI, Y.; EPEL, B.L. The role of host and viral proteins in intra and inter-cellular trafficking of geminiviruses. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 60, p. 231-241, 2002.

GALLIAN, P. et al. High genetic diversity revealed by the study of TLMV infection in French hemodialysis patients. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 67, p. 630-635, 2002.

GALVÃO, R.M. et al. A naturally occurring recombinant DNA-A of a typical bipartite begomovirus does not require the cognate DNA-B to infect *Nicotiana benthamiana* systemically. **Journal of General Virology**, London, v. 84, p. 715-726, 2003.

GARCIA-ANDRES, S. et al. 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**, New York, v. 359, p. 302-312, 2007a.

GARCIA-ANDRES, 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**, New York, v. 350, p. 433-442, 2006.

GARCIA-ANDRES, S. et al. Frequent occurrence of recombinants in mixed infections of tomato yellow leaf curl disease-associated begomoviruses. **Virology**, New York, v. 365, p. 210-219, 2007b.

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

GARCIA-ARENAL, F.; FRAILE, A.; MALPICA, J.M. Variation and evolution of plant virus populations. **International Microbiology**, Madrid, v. 6, p. 225-232, 2003.

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

GE, L.M.; ZHANG, J.T. et al. Genetic structure and population variability of tomato yellow leaf curl China virus. **Journal of Virology**, Washington, v. 81, p. 5902-5907, 2007.

GILBERTSON, R.L. et al. Genetic diversity in geminiviruses causing bean golden mosaic disease: the nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of a Brazilian isolate of bean golden mosaic geminivirus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 709-715, 1993a.

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

- GILBERTSON, R.L. et al. Limitations on geminivirus genome size imposed by plasmodesmata and virus-encoded movement protein: Insights into DNA trafficking. **Plant Cell**, Rockville, v. 15, p. 2578-2591, 2003.
- GLADFELTER, H.J. et al. Two domains of the AL 1 protein mediate geminivirus origin recognition. **Virology**, New York, v. 239, p. 186-197, 1997.
- GUTIERREZ, C. Geminivirus DNA replication. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 56, p. 313-329, 1999.
- GUTIERREZ, C. et al. Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 98, p. 111-119, 2004.
- HA, C.; COOMBS, S. et al. Corchorus yellow vein virus, a New World geminivirus from the Old World. **Journal of General Virology**, London, v. 87, p. 997-1003, 2006.
- HA, C.; COOMBS, S. et al. Molecular characterization of begomoviruses and DNA satellites from Vietnam: Additional evidence that the New World geminiviruses were present in the Old World prior to continental separation. In: (Ed.). **Journal Of General Virology**. England, v.89, 2008. p.312-326.
- HAIBLE, D.; KOBER, S.; JESKE, H. Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 135, p. 9-16, 2006.
- HANLEY-BOWDOIN, L. et al. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 18, p. 71-106, 1999.
- HARKINS, G.W. et al. Experimental evidence indicating that mastreviruses probably did not co-diverge with their hosts. **Virology Journal**, London, v. 6, p.1-14, 2009.
- HARRISON, B.D.; ROBINSON, D.J. Natural genomic and antigenic variation in white-fly transmitted geminiviruses (begomoviruses). **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, p. 369-398, 1999.
- HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Principles of population genetics**. Sunderland: Sinauer Associates, 2007, 221p.
- HEYRAUD-NITSCHKE, F. et al. Determination of the origin cleavage and joining domain of geminivirus Rep proteins. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, 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**, New York, v. 250, p. 283-292, 1998.
- HÖFER, P. et al. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. **Virology**, New York, v. 236, p. 288-295, 1997a.

- HÖFER, P. et al. Nucleotide sequence of a new bipartite geminivirus isolated from the common weed *Sida rhombifolia* in Costa Rica. **Virology**, New York, v. 78, p. 1785-1790, 1997b.
- HOLMES, E.C. The phylogeography of human viruses. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, p. 745-756, 2004.
- HOU, Y.M.; GILBERTSON, R.L. Increased pathogenicity in a pseudorecombinant bipartite geminivirus correlates with intermolecular recombination. **Journal of Virology**, Washington, v. 70, p. 5430-5436, 1996.
- IDRIS, A.M. et al. Cotton leaf curl Gezira virus-satellite DNAs represent a divergent, geographically isolated Nile Basin lineage: predictive identification of a satDNA REP-binding motif. **Virus Research**, Amsterdam, v. 109, p. 19-32, 2005.
- IDRIS, A.M.; BROWN, J.K. Molecular analysis of Cotton leaf curl virus-Sudan reveals an evolutionary history of recombination. **Virus Genes**, Norwell, v. 24, p. 249-256., 2002.
- IDRIS, A.M. et al. Two newly described begomoviruses of *Macroptilium lathyroides* and common bean. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, 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**, Oxford, v. 20, p. 3279-3285, 1992.
- INOUE-NAGATA, A.K. et al. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi 29 DNA polymerase. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 116, p. 209-211, 2004.
- INOUE-NAGATA, A.K. et al. New species emergence via recombination among isolates of the Brazilian tomato infecting Begomovirus complex. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 41, p. 1329-1332, 2006.
- ISNARD, M. et al. Quasispecies nature of three maize streak virus isolates obtained through different modes of selection from a population used to assess response to infection of maize cultivars. **Journal of General Virology**, London, v. 79, p. 3091-3099., 1998.
- JEFFREY, J.L.; POOMA, W.; PETTY, I.T. Genetic requirements for local and systemic movement of tomato golden mosaic virus in infected plants. **Virology**, New York, v. 223, p. 208-218., 1996.
- JESKE, H.; LUTGEMEIER, M.; PREISS, W. DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of Abutilon mosaic virus. **EMBO Journal**, Oxford, v. 20, p. 6158-6167, 2001.
- JOVEL, J. et al. *Sida micrantha* mosaic is associated with a complex infection of begomoviruses different from *Abutilon mosaic virus*. **Archives of Virology**, New York, v. 149, p. 829-841, 2004.

- JUPIN, I. et al. DNA replication specificity of TYLCV geminivirus is mediated by the amino-terminal 116 amino acids of the Rep protein. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 262, p. 116-120, 1995.
- KLEINOW, T. et al. Post-translational modifications of Abutilon mosaic virus movement protein (BC1) in fission yeast. **Virus Research**, Amsterdam, v. 131, p. 86-94, 2008.
- LAUFS, J. et al. *In vitro* cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, p. 3879-3883, 1995.
- LAZAROWITZ, S.G. Geminiviruses: Genome structure and gene function. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 11, p. 327-349, 1992.
- LEFEUVRE, P. et al. Avoidance of protein fold disruption in natural virus recombinants. **PLoS Pathogen**, Cambridge, v. 3, p. e181, 2007a.
- LEFEUVRE, P. et al. Begomovirus 'melting pot' in the south-west Indian Ocean islands: Molecular diversity and evolution through recombination. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 3458-3468, 2007b.
- LEGG, J.P.; RAYA, M.D. Survey of cassava virus diseases in Tanzania. **International Journal of Pest Management**, London, v., p. 17-23, 1993.
- LEVY, A.; TZFIRA, T. Bean dwarf mosaic virus: a model system for the study of viral movement. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v. 11, p. 451-461, 2010.
- LIMA, A.T.M. et al. Primeiro relato de infecção pelo geminivírus *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) em tomateiro no estado de Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31(Suplemento), p. S224, 2006.
- LIN, B. et al. High-affinity Rep-binding is not required for the replication of a geminivirus DNA and its satellite. **Virology**, New York, v. 305, p. 353-363, 2003.
- MARIANO, A.C. et al. Identification of a novel receptor-like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein. **Virology**, New York, v. 318, p. 24-31, 2004.
- MATYIS, J.C. et al. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 1, p. 267-275, 1975.
- MELLO, R.N.; ALMEIDA, A.M.R.; ZERBINI, F.M. Detection and identification of geminiviruses infecting soybean and associated weeds in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 444, 2000.
- MELLO, R.N. et al. Survey of begomoviruses associated with soybean and identification of *Sida mottle virus* (SiMoV) infecting this crop in Brazil. **Virus Reviews and Research**, Belo Horizonte, v. 7(Supplement), p. 157, 2002.

- 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**, New York, v. 303, p. 317-326, 2002.
- MORALES, F.J. History and current distribution of begomoviruses in Latin America. **Advances in Virus Research**, San Diego, v. 67, p. 127-162, 2006.
- MORALES, F.J.; ANDERSON, P.K. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. **Archives of Virology**, New York, v. 146, p. 415-441, 2001.
- MORENO, I.M. et al. Variability and genetic structure of the population of watermelon mosaic virus infecting melon in Spain. **Virology**, New York, v. 318, p. 451-460, 2004.
- MORILLA, G. et al. Tête à tête of tomato yellow leaf curl virus and tomato yellow leaf curl sardinia virus in single nuclei. **Journal of Virology**, Washington, v. 78, p. 10715-10723, 2004.
- MUBIN, M. et al. Characterization of begomovirus components from a weed suggests that begomoviruses may associate with multiple distinct DNA satellites. **Virus Genes**, Norwell, v. 40, p. 452-457, 2010.
- NAWAZ-UL-REHMAN, M.S.; FAUQUET, C.M. Evolution of geminiviruses and their satellites. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 583, p. 1825-1832, 2009.
- NAWAZ-UL-REHMAN, M.S. et al. Maintenance of an Old World Betasatellite by a New World Helper Begomovirus and Possible Rapid Adaptation of the Betasatellite. **Journal of Virology**, Washington, v. 83, p. 9347-9355, 2009.
- NDUNGURU, J. et al. Molecular biodiversity of cassava begomoviruses in Tanzania: Evolution of cassava geminiviruses in Africa and evidence for East Africa being a center of diversity of cassava geminiviruses. **Virology Journal**, London, v. 2, p. 21, 2005.
- NOUEIRY, A.O.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. **Cell**, Cambridge, v. 76, p. 925-932, 1994.
- NOZAKI, D.N. et al. Ocorrência de *Tomato severe rugose virus* em pimentão (*Capsicum annuum* L.) no estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30 (Suplemento), p. S189, 2005.
- OROZCO, B.M.; HANLEY-BOWDOIN, L. Conserved sequence and structural motifs contribute to the DNA binding and cleavage activities of a geminivirus replication protein. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 273, p. 24448-24456, 1998.
- OROZCO, B.M. et al. Functional domains of a geminivirus replication protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 9840-9846, 1997.
- OWOR, B.E. et al. Genetic analysis of *Maize streak virus* isolates from Uganda reveals widespread distribution of a recombinant variant. **Journal of General Virology**, London, v. 88, p. 3154-3165, 2007a.

- OWOR, B.E. et al. Successful application of FTA Classic Card technology and use of bacteriophage phi29 DNA polymerase for large-scale field sampling and cloning of complete maize streak virus genomes. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 140, p. 100-105, 2007b.
- PADIDAM, M.; BEACHY, R.N.; FAUQUET, C.M. Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. **Journal of General Virology**, London, v. 76, p. 249-263, 1995.
- PADIDAM, M.; BEACHY, R.N.; FAUQUET, C.M. The role of AV2 ("precoat") and coat protein in viral replication and movement in tomato leaf curl geminivirus. **Virology**, New York, v. 224, p. 390-404, 1996.
- PADIDAM, M.; BEACHY, R.N.; FAUQUET, C.M. A phage single-stranded DNA (ssDNA) binding protein complements ssDNA accumulation of a geminivirus and interferes with viral movement. **Journal of Virology**, Washington, v. 73, p. 1609-1616, 1999a.
- PADIDAM, M.; SAWYER, S.; FAUQUET, C.M. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. **Virology**, New York, v. 265, p. 218-224, 1999b.
- PALMER, K.E.; RYBICKI, E.P. The molecular biology of mastreviruses. **Advances in Virus Research**, San Diego, v. 50, p. 183-234, 1998.
- PAPLOMATAS, E.J. et al. Molecular characterization of a new sap-transmissible bipartite genome geminivirus infecting tomatoes in Mexico. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, p. 1215-1224, 1994.
- PAPROTKA, T. et al. Genomic diversity of sweet potato geminiviruses in a Brazilian germplasm bank. **Virus Research**, Amsterdam, v. 149, p. 224-233, 2010a.
- PAPROTKA, T.; METZLER, V.; JESKE, H. The complete nucleotide sequence of a new bipartite begomovirus from Brazil infecting Abutilon. **Archives of Virology**, New York, v. 155, p. 813-816, 2010b.
- PAPROTKA, T.; METZLER, V.; JESKE, H. The first DNA 1-like alpha satellites in association with New World begomoviruses in natural infections. **Virology**, New York, v. 404, p. 148-157, 2010c.
- PEDERSEN, T.J.; HANLEY-BOWDOIN. Molecular characterization of the AL3 protein encoded by a bipartite geminivirus. **Virology**, New York, v. 202, p. 1070-1075, 1994.
- PINEL, A. et al. Molecular epidemiology of the RNA satellite of Rice yellow mottle virus in Africa. **Archives of Virology**, New York, v. 148, p. 1721-1733, 2003.
- 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**, London, v. 82, p. 655-665, 2001.

- PREISS, W.; JESKE, H. Multitasking in replication is common among geminiviruses. **Journal of Virology**, v. 77, p. 2972-2980, 2003.
- QAZI, J. et al. Legume yellow mosaic viruses: Genetically isolated begomoviruses. In: (Ed.). *Molecular Plant Pathology*. England, v.8, 2007. p.343-348.
- RAMOS-SOBRINHO, R. et al. Genetic structure of a population of the begomovirus *Bean golden mosaic virus* (BGMV) that infects lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in the state of Alagoas, Brazil. Program and Abstracts, 6th International Geminivirus Symposium and 4th International ssDNA Comparative Virology Workshop. Guadalajara, México. November 7-12, 2010, 2010. p.
- 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**, New York, v. 148, p. 1697-1712, 2003.
- RANEY, J.L.; DELONGCHAMP, R.R.; VALENTINE, C.R. Spontaneous mutant frequency and mutation spectrum for gene A of phiX174 grown in *E. coli*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 44, p. 119-127, 2004.
- REZENDE, W.L. et al. Infecção mista em plantas de tomate infectadas por geminivírus, detectada por meio de LIS-SSCP-PCR. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 338, 1997.
- RIBEIRO, S.G. et al. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. **Archives of Virology**, New York, v. 148, p. 281-295, 2003.
- RIBEIRO, S.G. et al. Widespread occurrence of tomato geminiviruses in Brazil, associated with the new biotype of the whitefly vector. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, p. 830, 1998.
- RIBEIRO, S.G. et al. Molecular and biological characterization of *Tomato chlorotic mottle virus* suggests that recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, p. 702-711, 2007.
- RIDGEN, J.E. et al. Plant virus DNA replication processes in *Agrobacterium*: insight into the origins of the geminiviruses? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, p. 10280-10284, 1996.
- RODRÍGUEZ-PARDINA, P.E.; ZERBINI, F.M.; DUCASSE, D.A. Genetic diversity of begomoviruses infecting soybean, bean and associated weeds in Northwestern Argentina. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 342-348, 2006.
- ROJAS, A. et al. Sequence characterization of Tomato leaf curl Sinaloa virus and Tomato severe leaf curl virus: Phylogeny of New World begomoviruses and detection of recombination. **Archives of Virology**, New York, v. 150, p. 1281-1299, 2005a.
- ROJAS, M.R. et al. Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 361-394, 2005b.

ROJAS, M.R. et al. Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, tomato yellow leaf curl virus. **Virology**, New York, v. 291, p. 110-125, 2001.

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

ROMAY, G. et al. Association of an atypical alphasatellite with a bipartite New World begomovirus. **Archives of Virology**, New York, v. 155, p. 1843-1847, 2010.

RUIZ-MEDRANO, R.; XOCONOSTLE-CAZARES, B.; LUCAS, W.J. The phloem as a conduit for inter-organ communication. **Current Opinion in Plant Biology**, Cambridge, v. 4, p. 202-209., 2001.

RYBICKI, E.P. A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of Geminiviridae. **Archives of Virology**, New York, v. 139, p. 49-77, 1994.

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**, Washington, v. 110, p. 23-33, 1996.

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**, Rockville, v. 7, p. 1185-1194, 1995.

SANTOS, C.D.G.; GONÇALVES, M.F.B.; OLIVEIRA, O.R. Detecção por ELISA de begomovírus em plantas daninhas presentes em áreas produtoras de tomateiro no estado do Ceará. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28 (Supl.), p. 252, 2003.

SANZ, A.I. et al. Multiple infection, recombination and genome relationships among begomovirus isolates found in cotton and other plants in Pakistan. **Journal of General Virology**, London, v. 81, p. 1839-1849, 2000.

SAUNDERS, K. et al. A unique virus complex causes *Ageratum yellow vein disease*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, p. 6890-6895, 2000.

SAUNDERS, K.; BEDFORD, I.D.; STANLEY, J. Pathogenicity of a natural recombinant associated with *ageratum yellow vein disease*: implications for geminivirus evolution and disease aetiology. **Virology**, New York, v. 282, p. 38-47, 2001.

SAUNDERS, K.; BEDFORD, I.D.; STANLEY, J. Adaptation from whitefly to leafhopper transmission of an autonomously replicating nanovirus-like DNA component associated with *ageratum yellow vein disease*. **Journal of General Virology**, London, v. 83, p. 907-913, 2002.

SAUNDERS, K.; STANLEY, J. A nanovirus-like DNA component associated with yellow vein disease of *Ageratum conyzoides*: Evidence for interfamilial recombination between plant DNA viruses. **Virology**, New York, v. 264, p. 142-152, 1999.

SEAL, S.E.; JEGER, M.J.; VAN DEN BOSCH, F. Begomovirus evolution and disease management. **Advances in Virus Research**, San Diego, v. 67, p. 297-316, 2006a.

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

SELTH, L.A.; RANGLES, J.W.; REZAIAN, M.A. Agrobacterium tumefaciens supports DNA replication of diverse geminivirus types. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 516, p. 179-182., 2002.

SILVA, S.J.C. Detecção, caracterização molecular e diversidade genética de begomovirus que infectam fava (*Phaseolus lunatus* L.). Dep. de Agronomia, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, AL, 2006. 87 p.

SILVA, S.J.C. Diversidade e estrutura genética de bebomovírus que infectam plantas daninhas no nordeste brasileiro: 2011. Tese (Doutorado em fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SILVA, A.K.F; SANTOS, C.D.G.; NASCIMENTO, A.K.Q. Transmissão de begomovírus de plantas daninhas para tomateiros pela mosca-branca. **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v.28, n.3, p. 507-514, 2010.

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

STANLEY, J. Subviral DNAs associated with geminivirus disease complexes. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 98, p. 121-129, 2004.

STANLEY, J. et al. Family *Geminiviridae*. In: Fauquet, C.M.; Mayo, M.A.; Maniloff, J.; Desselberger, U. Ball, L.A. (Ed.). *Virus Taxonomy*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p.301-326.

STENGER, D.C. et al. Replicational release of geminivirus genomes from tandemly repeated copies: Evidence for rolling-circle replication of a plant viral DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, p. 8029-8033, 1991.

SUNG, Y.K.; COUTTS, R.H. Pseudorecombination and complementation between potato yellow mosaic geminivirus and tomato golden mosaic geminivirus. **Journal of General Virology**, London, v. 76, p. 2809-2815., 1995.

SUNTER, G.; BISARO, D.M. Transactivation of geminivirus AR1 and BR2 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. **Plant Cell**, Rockville, v. 4, 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**, New York, v. 179, p. 69-77, 1990.

- TORRES-PACHECO, I. et al. Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the Southern United States. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, p. 1186-1192, 1996.
- UNSELD, S. et al. Virus-specific adaptations for the production of a pseudorecombinant virus formed by two distinct bipartite geminiviruses from Central America. **Virology**, New York, v. 274, p. 179-188, 2000.
- VAN DER WALT, E. et al. Experimental observations of rapid Maize streak virus evolution reveal a strand-specific nucleotide substitution bias. **Virology Journal**, London, v. 5, p. -, 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**, Washington, v. 78, p. 9487-9498, 2004.
- VARSANI, A. et al. A highly divergent South African geminivirus species illuminates the ancient evolutionary history of this family. **Virology Journal**, London, v. 6, p. -, 2009.
- VARSANI, A. et al. Recombination, decreased host specificity and increased mobility may have driven the emergence of maize streak virus as an agricultural pathogen. **Journal of General Virology**, London, v. 89, p. 2063-2074, 2008.
- VOINNET, O. et al. Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, p. 14147-14152, 1999.
- VON ARNIM, A.; STANLEY, J. Inhibition of *African cassava mosaic virus* systemic infection by a movement protein from the related geminivirus *Tomato golden mosaic virus*. **Virology**, New York, v. 187, p. 555-564, 1992.
- WANG, H. et al. Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, p. 7410-7418, 2005.
- WANG, H.; HUANG, L.F.; COOPER, J.I. Analyses on mutation patterns, detection of population bottlenecks, and suggestion of deleterious-compensatory evolution among members of the genus Potyvirus. **Archives of Virology**, New York, v. 151, p. 1625-1633, 2006.
- WU, B. et al. Assessment of codivergence of mastreviruses with their plant hosts. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 8, p. 335, 2008.
- YAZDI, H.R.B.; HEYDARNEJAD, J.; MASSUMI, H. Genome characterization and genetic diversity of beet curly top Iran virus: a geminivirus with a novel nonanucleotide. **Virus Genes**, Norwell, v. 36, p. 539-545, 2008.
- ZERBINI, F.M. et al. Traditional and novel strategies for geminivirus management in Brazil. **Australasian Plant Pathology**, Perth, v. 34, p. 475-480, 2005.

ZHOU, X. 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**, London, v. 78, p. 2101-2111, 1997.

ZHOU, X. et al. 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**, London, v. 79, p. 915-923, 1998.

ZHOU, X. et al. Characterization of DNABeta associated with begomoviruses in China and evidence for co-evolution with their cognate viral DNA-A. **Journal of General Virology**, London, v. 84, p. 237-247, 2003.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1 - Isolados de begomovirus utilizados para comparação filogenética com os isolados de plantas invasoras.

ISOLADOS	ACESSO
<i>Abutilon Brazil virus</i> - AbBV	FN434438
<i>Blainvillea yellow spot virus</i> - BIYSV	EU710756
<i>Bean golden mosaic virus</i> - BGMV	M88686
<i>Cleome leaf crumple virus</i> - CILCV	FN435999
<i>Euphorbia mosaic virus</i> - EuMV	FN435997
<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i> - EuYMV	FJ619507
<i>Okra mottle virus</i> - OMoV	EU914817
<i>Passionfruit severe leaf distortion virus</i> - PSLDV	FJ972767
<i>Sida Brazil virus</i> - SiBV	FN436001
<i>Sida common mosaic virus</i> - SiCmMV	EU710751
<i>Sida micrantha virus</i> - SimMV	AJ557451
<i>Sida mottle virus</i> - SiMoV	AY090555
<i>Sida yellow leaf curl virus</i> - SiYLCV	EU710750
<i>Sida yellow mosaic virus</i> - SiYMV	AY090558
<i>Tomato leaf curl New Delhi virus</i> - ToLCNDV	U15015
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i> - ToCMoV	AF490004
<i>Tomato common mosaic virus</i> - ToCmMV	EU710754
<i>Tomato golden mosaic virus</i> - TGMV	K02029
<i>Tomato leaf distortion virus</i> - ToLDV	EU710749
<i>Tomato mild mosaic virus</i> - ToMiMV	EU710752
<i>Tomato rugose mosaic virus</i> - ToRMV	AF291705
<i>Tomato severe rugose virus</i> - ToSRV	DQ207749
<i>Tomato yellow spot virus</i> - ToYSV	DQ336350
<i>Tomato yellow vein streak virus</i> - ToYVSV	EF417915

Fonte: (Autora, 2011)