



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



MARIA HELLOÁ COSTA DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UM NOVO BEGOMOVIRUS QUE
INFECTA *Cnidoscolus urens* (L.) Arthur**

Rio Largo - AL
2019

MARIA HELLOÁ COSTA DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UM NOVO BEGOMOVÍRUS QUE
INFECTA *Cnidoscolus urens* (L.) Arthur**

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

Orientadora: Prof. Dra. Iraildes Pereira Assunção
Coorientador: Prof. Dra. Sarah Cavalcanti da Silva

Rio Largo - AL
2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Bibliotecário: Erisson Rodrigues de Santana

O48c Oliveira, Maria Helloá Costa de

Caracterização molecular de um novo begomovirus que infecta
cnidoscolus urens (L.) Arthur. Rio Largo-AL – 2019.
53 f.; il; 33 cm

Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) - Universidade
Federal de Alagoas, Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2019.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Iraídes Pereira Assunção.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Sarah Cavalcanti da Silva

1. Geminiviridae. 2. Plantas não cultivadas. 3. Euphorbiceae. 4.
Cansanção. I. Título.

CDU: 632

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar todos os meus passos e dar-me coragem para enfrentar os desafios e adversidades;

Aos meus queridos pais, José Cleber (*em memória*) e Marleide Costa, pelo amor, incentivo e exemplo de força e esperança.

As minhas irmãs, que me agraciaram com a benção de ser tia;

Ao meu esposo por todo amor, companheirismo, amizade e paciência;

A todos familiares e amigos que contribuíram para meu crescimento;

Aos professores Drs. Iraildes Pereira Assunção e Gaus Silvestre de Andrade Lima pela oportunidade, confiança, orientação, ensinamentos que foram fundamentais para minha formação;

A Dr^a. Sarah Jacqueline Cavalcanti da Silva pela amizade, orientação, partilha de seu conhecimento, e apoio durante minha trajetória no mestrado.

A todos do Laboratório de Fitopatologia Molecular e Virologia Vegetal pela amizade, ajuda mútua e ensinamentos durante todo esse período, em especial a Mayra Ferro por sempre estar disposta a ajudar, me guiando na execução deste trabalho;

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Proteção de Plantas CECA-UFAL pelos conhecimentos passados, que contribuíram para a minha formação;

A CAPES pela bolsa de mestrado concedida, o que me permitiu adquirir inúmeros conhecimentos incluindo os fundamentais para a realização desse trabalho;

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

RESUMO

A família *Geminiviridae* engloba fitovírus com genoma de DNA circular de fita simples encapsulado em partículas geminadas quasi-icosaédricas, sendo dividida em nove gêneros (*Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus*, *Turncurtovirus*, *Grabovirus* e *Capulavirus*) com base na gama de hospedeiros, tipo de inseto vetor, organização genômica e relacionamento filogenético. Os begomovírus são transmitidos pelo complexo de espécies crípticas de *Bemisia tabaci*, com hospedeiros selvagens/não-cultivados desempenhando um papel epidemiológico relevante, atuando como reservatórios desses vírus. O presente estudo teve como objetivo a detecção e caracterização de Begomovírus que infectam *C. urens* nos estados de Alagoas e Piauí. Amostras foliares de *C. urens* (cansação), apresentando sintomas indicativos de infecção por begomovírus, foram coletadas nos estados de Alagoas e Piauí. O DNA total foi extraído e usado como molde para amplificação dos genomas virais por círculo rolante. Estes genomas foram clonados e sequenciados comercialmente por *primer walking*. Para atribuir corretamente taxonomia aos novos isolados, foram utilizadas comparações pareadas do genoma completo com outros begomovírus previamente relatados. Alinhamentos múltiplos de sequências nucleotídicas foram preparados para o conjunto de dados DNA-A, CP e Rep que foram utilizados para realização de análises filogenéticas e de recombinação. Um total de seis clones correspondentes ao DNA-A foi obtido a partir de três amostras de *C. urens* e as comparações pareadas indicaram a presença de duas espécies de begomovírus: *Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus* (CnMLDV) a partir de amostras coletadas em Alagoas; e uma nova espécie para a qual foi proposto o nome *Cnidoscolus blistering yellow mosaic virus* (CnBYMV), a partir da amostra coletada no Piauí. Árvores filogenéticas bayesianas mostraram que os isolados obtidos foram distribuídos em dois grandes grupos bem suportados. O grupo I englobou as espécies de CnMLDV obtidas no presente estudo, outros isolados provenientes do estado de Alagoas e o isolado de PSLDV. Enquanto o grupo II englobou a espécie CnBYMV e begomovírus descritos em plantas cultivadas e não cultivadas. Um evento de recombinação foi detectado na RC e no gene *Rep*, tendo CnMLDV e SiMoV como prováveis parentais.

Palavras-chave: Geminiviridae. Plantas não cultivadas. Euphorbiaceae. Cansação.

ABSTRACT

The Geminiviridae family encompasses phytoviruses with a single-stranded circular DNA genome encapsidated in quasi-icosahedral geminated particles and divided into nine genera (Becurtovirus, Begomovirus, Curtovirus, Eragrovirus, Mastrevirus, Topocuvirus, Turncurtovirus, Grablovirus and Capulavirus) based on the range of hosts, insect vector type, genomic organization and phylogenetic relationship. Begomoviruses are transmitted by the *Bemisia tabaci* cryptic species complex, with wild / uncultivated hosts playing a relevant epidemiological role, acting as reservoirs of these viruses. The present study aimed to detect and characterize Begomoviruses that infect *C. urens* in the states of Alagoas and Piauí. Leaf samples of *C. urens* (fatigue), presenting symptoms indicative of begomovirus infection, were collected in the states of Alagoas and Piauí. Total DNA was extracted and used as template for amplification of the viral genomes by rolling circle. These genomes were cloned and sequenced commercially by first walking. To correctly assign taxonomy to the new isolates, we compared paired comparisons of the complete genome with other previously reported begomoviruses. Multiple nucleotide sequence alignments were prepared for the DNA-A, CP and Rep data set that were used for phylogenetic and recombination analyzes. A total of six clones corresponding to DNA-A were obtained from three *C. urens* samples and the paired comparisons indicated the presence of two begomovirus species: *Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus* (CnMLDV) from samples collected in Alagoas; and a new species for which the name *Cnidoscolus blistering yellow mosaic virus* (CnBYMV) was proposed, from the sample collected in Piauí. Bayesian phylogenetic trees showed that the isolates obtained were distributed in two large well-supported groups. Group I comprised the species of CnMLDV obtained in the present study, other isolates from the State of Alagoas and the isolate of PSLDV. While group II encompassed the CnBYMV and begomovirus species described in cultivated and uncultivated plants. A recombination event was detected in RC and in the Rep gene, having CnMLDV and SiMoV as likely parental.

Key words: Geminiviridae. Uncultivated plants. Euphorbiaceae. Tense.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do genoma do <i>Bean golden yellow mosaic virus</i> (BGYMV), espécie-tipo do gênero <i>Begomovirus</i>	18
Figura 2 - Replicação via ciclo rolante em geminivírus.....	20
Figura 3- Sintomas em <i>Cnidoscolus urens</i> infectadas por begomovírus.....	30
Figura 4 - Matriz bidimensional representando porcentagem de identidade de comparações pareadas de sequências nucleotídicas do DNA-A coletadas nos estados de Alagoas e Piauí com amostras de begomovírus disponíveis no GenBank.....	31
Figura 5 - Análise filogenética de inferência Bayesiana baseada no DNA-A, mostrando a formação de dois grupos.....	33
Figura 6 - Análise filogenética de inferência Bayesiana baseada no gene <i>CP</i>	34
Figura 7 - Análise filogenética de inferência Bayesiana baseada no gene <i>Rep</i>	35

LISTA DE ANEXO

Tabela 1 - Sequências de begomovírus mais proximamente relacionados com isolados deste trabalho obtidas a partir do banco de dados não-redundante Genbank.....	50
Tabela 2 – Isolados de <i>C. urens</i> obtidos neste trabalho.....	51

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO GERAL	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1. <i>Cnidoscolus urens</i> (L.) Arthur.....	13
2.2A família <i>Geminiviridae</i>	13
2.3 O gênero <i>Begomovirus</i>	14
2.4 Organização genômica e função das proteínas.....	17
2.5 Replicação viral	19
2.6 Variabilidade e estrutura genética de populações de begomovírus.....	21
2.6.1 Mutação.....	21
2.6.2 Recombinação.....	22
2.6.3 Pseudorecombinação.....	23
2.7 Diversidade de <i>begomovirus</i> infectando plantas da família <i>Euphobiaceae</i> no Brasil.....	25
3.MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Coleta do material vegetal	26
3.2 Clonagem e sequenciamento do genoma completo de begomovírus.....	26
3.3 Análise de sequências e demarcação de espécie.....	27
3.4 Análise filogenética.....	27
3.5 Análises de recombinação.....	28
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 Análises de sequências e demarcação de espécie	29
4.2 Análises filogenéticas.....	31
4.3 Análise de recombinação	34
CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS	37
ANEXOS	50

1. INTRODUÇÃO GERAL

A família *Geminiviridae* engloba os vírus cujo genoma é constituído por DNA circular de fita simples (ssDNA) encapsidado em partícula geminada quasi-icosaédrica (BROWN et al., 2015; GILBERTSON et al., 2015). Esta é composta pelos gêneros *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus*, *Turncurtovirus*, que são classificados a partir de características como gama de hospedeiros, tipo de inseto vetor, organização genômica e relacionamento filogenético (VARSANI et al., 2017; ZERBINI et al., 2017).

O gênero *Begomovirus* possui um (monopartido) ou dois (bipartido) componentes genômicos, DNA-A e DNA-B, são transmitidos por um complexo de espécies crípticas da mosca-branca *Bemisia tabaci* (BARBOSA et al., 2014; NAVAS-CASTILLO et al., 2011) e infectam plantas dicotiledôneas. 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). E ambos são requeridos para ocorrência de infecção sistêmica do hospedeiro (BROWN et al., 2012; 2015).

Esse gênero vem se destacando nos últimos 20 anos pelo crescente número de espécies descritas de vírus de plantas que causam prejuízos em culturas de importância econômica por todo o mundo (GILBERTSON et al., 2015; INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016). No Brasil, *Bean golden mosaic virus* (BGMV) e *Macrottilium yellow spot virus* (MaYSV) que infectam leguminosas, são os vírus de maior importância econômica em feijoeiro (*Phaseolus* spp.) (FAUQUET et al., 2008; LIMA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Além de várias doenças em tomateiro causada por um complexo de begomovírus, onde prevalecem duas espécies *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV) (INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016).

Begomovírus de plantas cultivadas podem infectam plantas não cultivadas em diferentes famílias botânicas, que servem como hospedeiras alternativas (MORALES et al., 2001; ALABI et al., 2008; BARBOSA et al., 2009; BARRETO et al., 2013; ROCHA et al., 2013). O contrário também pode ocorrer, ou seja, vírus detectados em plantas não cultivadas são capazes de infectar plantas cultivadas (IDRIS et al., 1999; BARRETO et al., 2013; LIMA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Além disso, infecções mistas podem ocorrer, possibilitando o surgimento de eventos de recombinação e pseudorecombinação entre espécies e estirpes distintas, contribuindo assim para a evolução desses vírus (SEAL; VAN DEN BOSCH; JEGER, 2006; ALABI et al., 2008; GARCÍA-ANDRÉS et al., 2006; MONDE

et al., 2010; ROCHA et al., 2013; STEWART et al., 2014; VAGHI MEDINA; MARTIN; LÓPEZ LAMBERTINI, 2015).

Algumas espécies de begomovírus têm sido relatadas em plantas não cultivadas pertencentes à família Euphorbiaceae: *Euphorbia mosaic virus* (EuMV; (HERNÁNDEZ-ZEPEDA et al., 2007), *Croton yellow vein virus* (CYVV; HUSSAIN et al., 2011), *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV; FERNANDES et al., 2011), *Dalechampia chlorotic mosaic virus* (DCMV; FIALLO-OLIVÉ et al., 2013), *Jatropha mosaic virus* (JMV; SIMMONDS-GORDON et al., 2014), e *Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus* (CnMLDV; MELO et al., 2016)

Estudos sobre a diversidade e estrutura genética de populações de begomovírus têm ajudado a entender as forças evolutivas atuando sobre esses patógenos em condições de campo (PRASANNA et al., 2010; GONZÁLEZ-AGUILERA et al., 2012; SILVA et al., 2012; LIMA et al., 2013; ROCHA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014; FERRO, M. et al., 2017), e tais informações podem ser úteis para o desenvolvimento de estratégias de manejo voltadas para a obtenção de plantas resistentes (GONZÁLEZ-AGUILERA et al., 2012).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Cnidoscolus urens* (L.) Arthur

O gênero *Cnidoscolus* Pohl integrante da família Euphorbiaceae é composto por cerca de 50 espécies que têm como característica marcante tricomas urticantes (BURGER; HUFT, 1995). Endêmicas do Novo Mundo, são encontradas especialmente no México e região Nordeste do Brasil (WEBSTER, 1994; BURGER; HUFT, 1995; MELO; SALES, 2008), na qual já foram relatadas aproximadamente dez espécies (MELO; SALES, 2008).

A espécie *C. urens*, popularmente conhecida como cansanção ou urtiga-cansanção se destaca no gênero por ser a mais amplamente distribuída, presente desde o Leste do México até a Argentina (BURGER; HUFT, 1995; MELO; SALES, 2008). No Brasil, *C. urens* foi relatada nas regiões Nordeste (exceto nos Estados do Ceará e Maranhão), Sudeste, Centro-Oeste, Norte em Rondônia e no Sul no estado do Paraná (CORDEIRO; SECCO, 2015). Infecção por begomovírus nesta espécie já foi relatada (ASSUNÇÃO et al., 2006), e recentemente o primeiro genoma completo de um begomovírus ocorrendo naturalmente neste hospedeiro foi relatado e identificado como *Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus* (CnMLDV)(MELO, 2016).

2.2 A família *Geminiviridae*

A família *Geminiviridae* é composta por vírus de genoma circular de fita simples ssDNA, encapsidados, com partícula geminada quasi-icosaédrica de tamanho variável entre 2,6kb e 5,2kb. Podem se apresentar com monopartidos, como ocorre em sua maioria, ou bipartido (DNA-A e DNA-B) particularidade do gênero *Begomovirus*, que para estabelecer uma infecção sistêmica necessita da presença dos dois componentes genômicos (BROWN et al., 2012; 2015).

Composta pelos gêneros *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus*, e *Turncurtovirus*, que se distinguem a partir de características como gama de hospedeiros, tipo de inseto vetor, organização genômica e relacionamento filogenético (VARSANI et al, 2014; 2017; ZERBINI et al., 2017), podem ser transmitidos a plantas monocotiledôneas e dicotiledônea via cigarrinha, membracídeos, afídeos e mosca-branca, ocasionando perdas de produtividade em algumas

culturas de importância econômica (VARSANI et al., 2014; INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016).

Além das plantas cultivadas, podem ainda infectar plantas ornamentais e silvestres (HANLEY-BOWDOIN et al., 2013). Os sintomas característicos de infecção são facilmente notados, como deformação foliar, enrolamento, amarelecimento, nanismo, mosaico e estrias. Até o momento, dois gêneros desta família, *Eragrovirus* e *Grabovirus*, ainda tem seus vetores desconhecidos (VARSANI et al., 2014; 2017).

Devido sua ampla distribuição geográfica, é possível observar em diferentes continentes os efeitos e impactos ocasionados por geminivírus. Nas Américas, *Bean golden mosaic virus* (BGMV) e *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) têm maior relevância em feijoeiros; na América do Norte e Oriente Médio o *Beet curly top virus* (BCTV; *Curtovirus*) em beterraba açucareira; na cultura do tomate o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV; *Begomovirus*) está presente na Europa, África, Ásia, América Central, Caribe, Estados Unidos e Austrália; *African cassava mosaic virus* (ACMV; *Begomovirus*) causa prejuízos em mandioca e em milho *Maize streak virus* (MSV; *Mastrevirus*) na África; *Wheat dwarf virus* (WDV; *Mastrevirus*) em trigo na Europa; e na Ásia o *Cotton leaf curl virus* (CLCuV; *Begomovirus*) em algodoeiro (HANLEY-BOWDOIN et al., 2013; SCHUBERT et al., 2014; INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016).

2.3 O gênero *Begomovirus*

Dentre os membros de *Geminiviridae*, o gênero *Begomovirus* (espécie tipo *Bean golden yellow mosaic virus* - BGYMV) tem maior relevância devido ao seu grande número de espécies, atualmente o *International Comitee on Taxonomy of Viruses* – ICTV (<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>) reconhece 388 espécies (VARSANI et al., 2014; BROWN et al., 2015; ICTV, 2018).

Considerados emergentes nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, os begomovírus são os mais importantes devido à sua alta incidência e severidade das doenças em culturas de importância econômica (MORALES, ANDERSON, 2001; MORALES, 2006). Este notável aumento na ocorrência das doenças causadas por begomovírus foi impulsionado pelo vetor mosca-branca (Homoptera: Aleyrodidae), especialmente o biótipo B que se espalhou pelo mundo (GILBERTSON et al., 2015). Os sintomas dos begomovírus em plantas variam a depender da planta hospedeira, da fase da cultura em que ocorre a infecção e a espécie viral. Contudo os sintomas mais frequentes são nanismo; uma combinação de

mosaico/mosqueado verde-amarelo-dourado, enrolamento, enrugamento, deformação, manchas amarelas e amarelecimento das nervuras ou internervuras nas folhas (PICÓ et al., 1996; MORALES; ANDERSON, 2001; INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016).

Os begomovírus são classificados em dois grupos de acordo com sua diversidade genética e sua distribuição geográfica, begomovírus do “Velho Mundo” (VM), que podem apresentar um ou dois componentes genômicos e frequentemente estão associados a moléculas de ssDNA satélites denominados alfassatélites (anteriormente DNA-1) e betassatélites (FAUQUET; STANLEY, 2005; ZHOU et al., 2013; LOZANO et al., 2016; ROSARIO et al., 2016), os quais desempenham funções essenciais para o vírus auxiliar, como ocorre no DNA-B dos begomovírus bissegmentados (ROJAS et al., 2005) e begomovírus do “Novo Mundo” (NV).

O primeiro relato de betassatélites associado à begomovírus foi o *Ageratum yellow vein virus* (AYVV), outros begomovírus vêm sendo relatados e seguem a proposta de classificação e nomenclatura de Briddon et al., (2008). Atualmente estão listadas 61 espécies no ICTV, e nenhum betassatélite foi detectado em associação com vírus nativos do NM (ROMAY et al., 2010; ROSARIO et al., 2016).

Begomovírus do NV apresentam em sua maioria dois componentes genômicos DNA-A e DNA-B, com relatos de ocorrência de associação a alfassatélites (PAPROTKA; METZLER; JESKE, 2010; ROMAY et al., 2010). São poucos os begomovírus monopartidos nativos do NM, *Tomato leaf deformation virus* (ToLDeV; SÁNCHEZ-CAMPOS et al., 2013; MELGAREJO et al., 2013), *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV; VU et al., 2015) e *Tomato severe leaf curl virus* (ToSLCV; GILBERTSON et al., 2015).

Alfassatélites foram descritos ocorrendo naturalmente no Novo Mundo (Brasil e Venezuela) associados aos begomovírus bipartidos *Cleome leaf crumple virus* (CILCrV), *Euphorbia mosaic virus* (EuMV) e *Melon chlorotic mosaic virus* (MeCMV), ocorrendo naturalmente no Novo Mundo (PAPROTKA; METZLER; JESKE, 2010; ROMAY et al., 2010). Recentemente, DNAs satélites foram detectados em mosca-branca com a abordagem VEM (*vector enabled metagenomics*) na Guatemala e em Porto Rico, sendo demonstradas associações entre begomovírus e alfassatélites, o que sugere que a distribuição destas moléculas está bem difundida pelo continente americano (ROSARIO et al., 2016).

Não é possível afirmar a função dos satélites, porém, parecem estar associados à virulência do patógeno (BRIDDON et al., 2008), atuando na supressão do silenciamento gênico da planta, com a proteína β C1, codificada pelo betassatélite (CUI et al., 2005). Estudos indicam que os satélites de DNA podem atuar como fatores de patogenicidade, uma vez que,

begomovírus distintos quando interagem com um mesmo DNA satélite causam os mesmos sintomas nas plantas infectadas (MANSOOR et al., 2003). Sabe-se ainda que associação de alfassatélites com begomovírus (com ou sem betassatélites) não está relacionada ao desenvolvimento de sintomas na planta hospedeira, porém, podem atenuá-los (ZHOU et al., 2013).

Uma nova classe de DNAs satélites foi descrita associada a begomovírus bipartidos do NM infectando plantas não-cultivadas (família Malvaceae) em Cuba (FIALLO-OLIVÉ et al., 2012). Moléculas semelhantes foram detectadas em adultos de mosca-branca utilizando a abordagem VEM no sul da Flórida (WfVEM-Sat) (NG et al., 2011), porém a estrutura do genoma não foi descrita em detalhes (FIALLO-OLIVÉ et al., 2012). O nome proposto para a classe foi deltassatélites (LOZANO et al., 2016) que inclui ToLCV-Sat, primeiro DNA satélite associado ao begomovírus *Tomato leaf curl virus* (DRY et al., 1997), os satélites relatados em Cuba (que juntamente com os satélites da Flórida são chamados de deltassatélites do NM) (FIALLO-OLIVÉ et al., 2016) e os DNAs satélites associados a sweepovírus infectando convolvuláceas na Espanha e Venezuela (LOZANO et al., 2016; FIALLO-OLIVÉ et al., 2016).

O método de identificação e determinação de espécies de begomovírus se dá a partir da sequência completa de nucleotídeos do DNA-A, seguindo o critério de identidade de sequência nucleotídica do DNA-A de $\geq 91\%$ em comparações pareadas usando o programa *Sequence Demarcation Tool* (BROWN et al., 2015; SDT; MUHIRE; VARSANI; MARTIN, 2014).

Um método simples para clonagem de genoma completo de begomovírus foi desenvolvido por Inoue-Nagata et al. (2004) baseado na amplificação por círculo rolante (*rolling-circle amplification* - RCA) dos componentes genômicos, seguido de digestão com enzima de restrição e ligação ao vetor plasmidial, tornando mais rápido os procedimentos de clonagem e sequenciamento para estudos com grande número de isolados (MAR et al. 2017; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014; ROCHA et al., 2013; SILVA et al., 2012).

Outra técnica que vem sendo usada é a de clones infecciosos, facilitando estudos de diferentes viroses, assim como na compreensão da interação vírus/hospedeiro/vetor (BREWER et al., 2018). Além disso, tem facilitado a realização de estudos de variabilidade genética e epidemiologia molecular, fornecendo suporte a programas de melhoramento genético de espécies cultivadas.

2.4 Organização genômica e função das proteínas

A maioria dos begomovírus do NV possuem dois componentes genômicos (DNA-A e DNA-B) encapsidados separadamente em partículas icosaédricas geminadas, e para o desenvolvimento de infecção sistêmica se faz necessário à presença de ambos. O DNA-A e o DNA-B possuem uma região conservada (RC) com aproximadamente 200pb, onde compartilham identidade de sequência acima de 90% (LAZAROWITZ, 1992; LAZAROWITZ et al., 1992; FONTES et al., 1994b). A RC abriga a origem de replicação viral (*ori*) numa estrutura em forma de grampo com o nonanucleotídeo conservado 5'-TAATATTAC-3' (JESKE, 2009; BROWN et al., 2012; BROWN et al., 2015).

Em 2011, Lima et al. relatou um nonanucleotídeo não usual (5'-TAGTATTAC-3') no begomovírus *Malvaviscus yellow mosaic virus* (MYMV), provenientes de plantas ornamentais da família Malvaceae (LIMA et al., 2011). Este nonanucleotídeo está inserido numa sequência de 30 nucleotídeos que formam uma estrutura em forma de grampo. Foi observado que mesmo ocorrendo variação na sequência de 30 nucleotídeos, a estrutura em forma de grampo sempre está presente (FARIA; ZERBINI, 2000).

O componente DNA-A dos begomovírus codifica para as proteínas: *Rep* (“replication associated protein”), *TrAP* (“trans activating protein”), *REn* (“replication enhancer protein”), *C4* e *CP* (“coat protein”). Esta última é transcrita no sentido viral e as outras quatro no sentido complementar, sendo estes genes os responsáveis pela replicação e encapsidação viral. (FARIA, ZERBINI, 2000). As proteínas: *NSP* (“nuclear shuttle protein” ou BV1) no sentido viral, e *MP* (“movement protein” ou BC1) no sentido complementar, são encarregadas pelo movimento do vírus no hospedeiro (célula-a-célula e a através do envelope nuclear), e são codificadas pelos genes presentes no DNA-B (Figura 1; TIMMERMANS, DAS, MESSING, 1994; BROWN, 1997; FARIA et al., 2000).

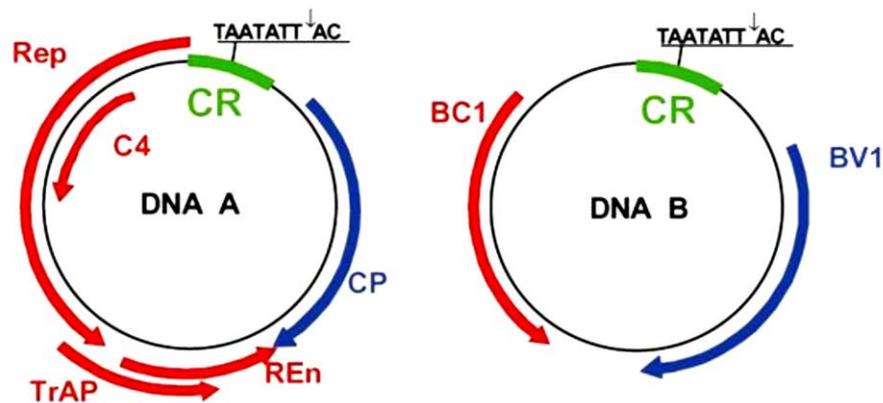


Figura 1. Representação esquemática do genoma do *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV), espécie-tipo do gênero *Begomovirus*. Os círculos representam o genoma viral, com dois componentes (DNA-A e DNA-B) de aproximadamente 2.600 nucleotídeos cada. Uma sequência de aproximadamente 200 nucleotídeos, 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).

A proteína capsidial (*CP*) tem a função de proteger o genoma viral contra a degradação, determina a especificidade do vírus pelo inseto vetor e é fundamental para a transmissão (HÖFER et al., 1997a BRIDDON et al., 1990;). Em begomovírus monopartidos também tem a função de transportar o DNA viral do núcleo para o citoplasma e do citoplasma para o núcleo (LIU et al., 1999).

A proteína *Rep* é fundamental e a única indispensável para a replicação do ssDNA viral no núcleo da célula hospedeira iniciando a replicação por círculo rolante (BRIDDON, 2015; JESKE, 2009). A função desta proteína é ligar ao sítio de início da replicação viral e clivar umas das fitas de DNA (FONTES; LUCKOW; HANLEY-BOWDOIN, 1992).

A proteína transativadora da transcrição (*TrAP*), atua na expressão de genes de sentido viral (*CP* e *NSP*). Ainda é possível que esta proteína desempenhe função de interagir e inativar enzimas que estão envolvidas na defesa do hospedeiro, como a *ADK* (“adenosine kinase”) e *SNF1* (“sucrose nonfermenting 1”) (SUNTER et al., 2001).

A proteína *REn* embora não seja fundamental para a replicação, quando está presente, há um aumento no acúmulo de DNA viral na célula hospedeira (ZERBINI; CARVALHO; MACIEL-ZAMBOLIM, 2000). Isso ocorre pelo aumento da afinidade da proteína *Rep* na origem de replicação, ocasionado *REn* (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999). Mutação em seus

genes parece estar relacionada ao retardamento ou atenuação de sintomas, mesmo não sendo fundamental para o aparecimento deles (ELMER et al., 1988; ETESSAMI et al., 1991).

A C4 é responsável por suprimir a resposta do hospedeiro à ação da Rep (ROJAS et al, 2005; STANLEY et al, 2005), podendo determinar a severidade dos sintomas (JUPIN et al., 1995). Vanitharani et al. (2004) demonstraram em estudos que esta proteína está envolvida na supressão do silenciamento gênico pós-transcricional em plantas infectadas com *African cassava mosaic virus* (ACMV) e *Sri Lanka cassava mosaic virus* (SLCMV).

O componente DNA-B tem sentido complementar (MP) que codifica a proteína (*Movement Protein* - MP) relacionada com o movimento célula-a-célula do vírus por meio do aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas. E no sentido viral o gene (NSP) codifica uma proteína (*Nuclear Shuttle Protein* - NSP) que realiza o transporte do DNA através do envelope nuclear (FARIA; ZERBINI, 2000; ZERBINI; CARVALHO; MACIEL-ZAMBOLIN, 2002). Essas duas proteínas atuam de forma a mediar o tráfego intra e intercelular do DNA viral (SANDERFOOT; LAZAROWITZ, 1995), proporcionando ao vírus infectar sistemicamente a planta.

2.5 Replicação viral

O processo de infecção dos geminivírus se inicia com entrada das partículas virais na hospedeira por meio da inoculação pelo inseto vetor. Uma vez no interior da célula, este irá espontaneamente se desassociar do capsídeo, e será transportado até o núcleo, onde ocorrerá a replicação do vírus (LAZAROWITZ, 1992; PALMER; RYBICKI, 1998). No núcleo celular o ssDNA é convertido em um intermediário de fita dupla (dsDNA) chamado de Forma Replicativa (FR). Não é possível afirmar, mas provavelmente essa conversão ocorra através de fatores do hospedeiro (STENGER et al., 1991; STANLEY, 1995; ZERBINI; CARVALHO; MACIEL-ZAMBOLIN, 2000). Dentro da célula essa FR irá servir como molde para a síntese de novos componentes genômicos e na transcrição dos genes virais. A replicação do vírus ocorre via mecanismo de círculo rolante, semelhante ao utilizado pelos bacteriófagos ϕ X174 e M13 (Figura 2) (STENGER et al., 1991; STANLEY, 1995).

Nos dois componentes genômicos (DNA-A e DNA-B) a RC, composta por uma sequência conservada em forma de grampo (“structurally conserved element”, SCE), onde está localizada a origem de replicação (*ori*), formada por um nonanucleotídeo encontrado em todos os geminivírus e que constitui o domínio funcional da origem de replicação (HEYRAUD-NITSCHKE et al., 1995; OROZCO; HANLEY-BOWDOIN, 1999).

A replicação por círculo rolante se inicia com a clivagem do dsDNA exatamente no nonanucleotídeo (TAATATT↓AC); (FONTES et al., 1994; LAUFS et al., 1995). A replicação ocorre da mesma forma tanto para o DNA-A, como para o DNA-B (LAUFS et al., 1995; FARIA; ZERBINI, 2000; STANLEY et al., 2005).

A clivagem do dsDNA na RC é realizada pela proteína Rep. Nessa região existe uma sequência específica de ligação desta proteína (FONTES; LUCKOW; HANLEY-BOWDOIN, 1992; FONTES et al., 1994a) e regiões promotoras da RNA polimerase tipo II de plantas, responsável pela transcrição dos genes virais (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999). O reconhecimento pela proteína Rep é considerado vírus-específico (HARRISON; ROBINSON, 1999; RAMOS et al., 2003).

A partir do momento em que *Rep* é ligada ao DNA viral ocorre a estabilização do complexo formado por *Rep*, *REn* e fatores do hospedeiro, iniciando-se a replicação por círculo rolante e finalizada com a encapsidação do ssDNA genômico circular maduro em partículas virais (GUTIERREZ, 1999).

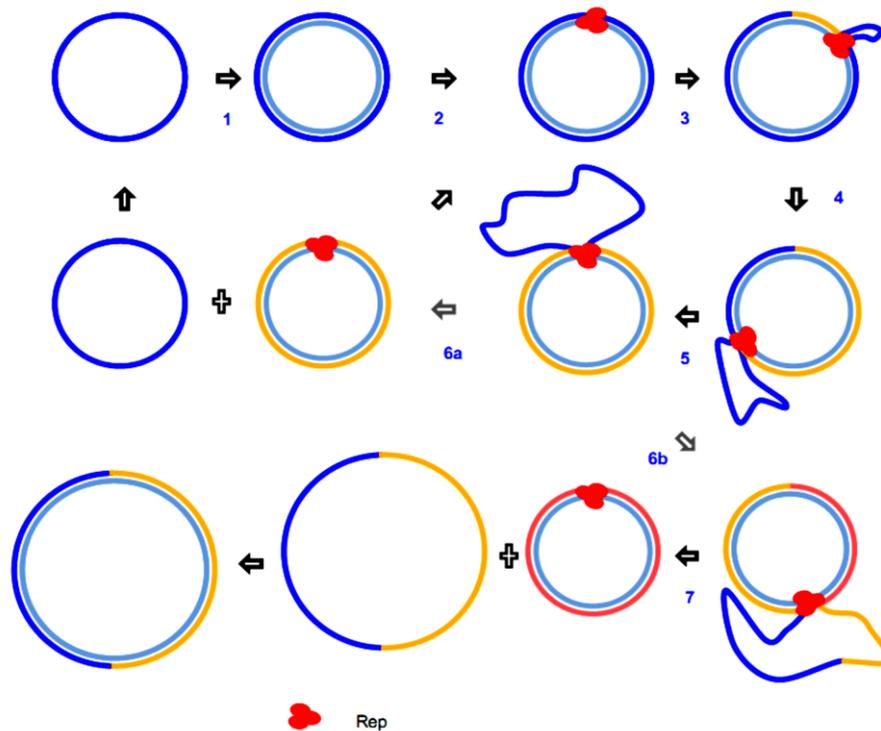


Figura 2. Replicação via ciclo rolante em geminivírus. ssDNA circular viral (em azul) é convertida em dsDNA pela DNA polimerase da hospedeira (passo 1). A Rep (em vermelho) é expressa e se associa aos sítios de ligação na origem de replicação (passo 2). À medida que a replicação ocorre a fita de DNA mais antiga é liberada

(passos 4 e 5). O genoma viral monomérico pode ser liberado (passo 6a) ou mais ciclos de replicação podem ocorrer (passo 6b e 7). Monômeros ou dímeros de ssDNA (passos 6a e 7) podem ser convertidos em dsDNA pela DNA polimerase do hospedeiro para que novos ciclos de replicação ocorram. O genoma viral produzido no passo 6a pode também ser encapsidado. Sucessivas gerações de ssDNA são coloridas em azul, amarelo e rosa (Figura extraída de MARTIN et al., 2011).

A Replicação Dependente de Recombinação (RDR), uma forma secundária de replicação dos geminivírus, foi sugerida com base na identificação de intermediários de replicação viral do *Abutilon mosaic virus* (AbMV) que não podem ser explicados pelo mecanismo de círculo rolante (JESKE et al., 2001). Outros estudos demonstraram que esses intermediários também foram encontrados em *African cassava mosaic virus* (ACMV), *Beet curly top virus* (BCTV), *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) e *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (PREISS e JESKE, 2003), indicando que a RDR é um mecanismo comum entre esses vírus.

2.6 Variabilidade e estrutura genética de populações de begomovírus

A estrutura genética de populações de fitovírus refere-se à quantidade e à distribuição da variabilidade genética dentro e entre subpopulações (GARCÍA-ARENAL et al., 2001). Populações de geminivírus possuem um elevado grau de diversidade genética e a sua análise é fundamental para melhor compreender a evolução do vírus e sua interação com a planta hospedeira (GARCÍA-ARENAL; FRAILE; MALPICA, 2003; SEAL; VAN DEN BOSCH; JEGER, 2006).

As principais fontes de variabilidade genética são os eventos de mutação, recombinação e pseudorecombinação (GARCÍA-ARENAL; FRAILE; MALPICA, 2003; SEAL; VAN DEN BOSCH; JEGER, 2006), tornando com que os vírus se adaptem a novos hospedeiros e a mudanças nas condições ambientais (ROOSSINCK, 1997).

2.6.1 Mutação

Mutações são alterações na molécula de DNA por meio de substituições em pares de bases, originando mutações pontuais que vem sendo estudadas nesse grupo de vírus sob diferentes condições de seleção, como a presença de um efeito gargalo, transferências

sucessivas entre hospedeiros sem emprego do vetor, e a inoculação de plantas resistentes (ISNARD et al., 1998). A evolução de todos os vírus, assim como para os geminivírus, depende primordialmente de mutações (HARKINS et al., 2009)

Duffy e Holmes (2009) realizaram análises estruturadas no tempo, em isolados de *East African cassava mosaic virus* (EACMV) para estimar a taxa de evolução dessa espécie de begomovírus. As taxas foram estimadas em $1,6 \times 10^{-3}$ e $1,33 \times 10^{-4}$ substituições/sítio/ano para o DNA-A e DNA-B, respectivamente. 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. Os autores concluíram que as mutações observadas refletem uma rápida dinâmica mutacional, entretanto, validaram esses altos níveis de heterogeneidade apenas para o DNA-A e a ORF AV1. Begomovírus brasileiros bipartidos foram analisados por Rocha et al. (2013), e exibiram alta frequência de mutação, sendo as regiões intergênica e do gene *CP* as de maiores valores.

2.6.2 Recombinação

O processo de recombinação se dá pela incorporação de partes de uma fita de DNA ou RNA na fita de um indivíduo diferente durante o mecanismo de replicação (PADIDAM; BEACHY; FAUQUET, 1999). Atuando na manutenção e no reparo das moléculas de DNA (CROMIE et al., 2001), a recombinação é de extrema importância para evolução, pois defende o genoma do acúmulo de mutações deletérias (KEIGHTLEY; OTTO, 2006) e ainda permite o surgimento de novas combinações genéticas (CRAMERI et al., 1998).

Ocorrendo corriqueiramente em geminivírus, este processo (PADIDAM; BEACHY; FAUQUET, 1999) parece contribuir em grande para a diversificação genética dos begomovírus, aumentando seu potencial evolutivo e adaptação local (MONCI et al., 2002). Possivelmente, isto se reflita no surgimento de algumas das espécies virais mais importantes para a agricultura mundial (ZHOU et al., 1997; MONCI et al., 2002; GARCIA-ANDRES et al., 2007).

Em plantas não cultivadas a recombinação é responsável pela alta variabilidade genética observada em populações de begomovirus (LIMA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Com relação a plantas cultivadas, eventos de recombinação implicam diretamente no surgimento de novas doenças e epidemias, como por exemplo, a epidemia devastadora do mosaico da mandioca (*Manihot esculenta*), causada pelo

recombinante EACMV em Uganda e países vizinhos (PITA et al., 2001); as epidemias do complexo TYLCV na Bacia Ocidental do Mediterrâneo, com o surgimento dos recombinantes *Tomato yellow leaf curl Malaga virus* (TYLCMaV) e *Tomato yellow leaf curl Axarquia virus* (TYLCAxV) nos campos de tomate na Espanha; e as epidemias de *Cotton leaf curl virus* (CLCuV) no Paquistão causadas por um complexo de espécies incluindo diversos begomovírus recombinantes (IDRIS; BROWN, 2002; MONCI et al., 2002).

Alguns fatores contribuem expressivamente para a ocorrência de eventos de recombinação, como as infecções mistas, um pré-requisito para que este evento ocorra (PADIDAM et al., 1995; UMAHARAN et al., 1998). O biótipo B de *B. tabaci*, inseto polífago e que apresenta um alto grau de adaptação e dispersão, assim como a grande produção de cópias do genoma através da replicação via “forma replicativa” dsDNA (BEDFORD et al., 1994). Estes três fatores resultam em recombinações virais e o aparecimento de infecções em novas hospedeiras.

Não é possível afirmar quais mecanismos controlam a recombinação em begomovírus (PADIDAM; BEACHY; FAUQUET, 1999). Porém, já foi constatado que sítios recombinantes não são uniformemente distribuídos ao longo do genoma, existindo sítios frequentes (“hot spots”) e infrequentes (“cold spots”) de recombinação (STANLEY, 1995; FAUQUET et al., 2005; GARCIA-ANDRES et al., 2007; LEFEUVRE et al., 2007), constatando-se, via análises de bioinformática para detecção de vírus recombinantes de ocorrência natural, que a origem de replicação viral é um sítio frequente de recombinação (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999).

Lefeuvre et al. (2007) analisaram e compararam sequências de begomovírus mono e bissegmentados depositadas no GenBank, constatando que a região do gene *Rep* que codifica a porção N-terminal da proteína Rep, e a região intergênica adjacente (RC) são frequentemente intercambiadas durante a replicação. Sítios frequentes de recombinação localizados na região intergênica entre os genes *CP* e *Ren* também foram identificados.

2.6.3 Pseudorecombinação

O mecanismo alternativo de pseudorecombinação ocorre na maioria dos begomovírus que apresentam dois componentes genômicos, onde a troca de material genético pode ocorrer sem necessidade de recombinação intermolecular, ocorrendo apenas troca de componentes

genômicos entre dois vírus distintos (SUNG; COUTTS, 1995; ANDRADE et al., 2006). A formação de pseudorecombinantes é mais viável entre estirpes de uma mesma espécie de begomovírus (HOFER, et al. 1997a; UNSELD, 2000; GARRIDO-RAMIREZ et al, 2000).

Experimentos com pseudorecombinação 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 pseudorecombinantes infecciosos (GILBERTSON et al., 1993a).

Por outro lado, pseudorecombinantes 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 pseudorecombinante recíproco induziu sintomas atenuados e tardios. Esses resultados demonstraram que geminivírus com regiões comuns suficientemente similares podem formar pseudorecombinantes infecciosos, mas ressaltam que frequentemente os pseudorecombinantes 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) e TGMV (STANLEY et al., 2005; VON ARNIM; STANLEY, 1992).

Andrade et al. (2006) descreveram a espécie *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) originalmente isolado de tomate, mas filogeneticamente próximo aos vírus isolados de *Sida* sp. Apesar disso, o ToYSV foi capaz de formar pseudorecombinantes com vírus de tomate. Pseudorecombinantes infectivos formados entre o DNA-A de ToYSV e o DNA-B de *Tomato crinkle leaf yellow virus* (TCrLYV) induziram sintomas severos em *N. benthamiana*.

Esse potencial para formar pseudorecombinantes foi, em parte, atribuído ao fato de que a origem de replicação de ambos os componentes possui a sequência do sítio de ligação da Rep idêntica. Apesar disto, o mesmo não ocorre com o pseudorecombinante viável formado entre o DNA-A de *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) e o DNA-B de ToYSV, que possuem a sequência do sítio de ligação da Rep diferente. Estes resultados reforçam a hipótese de que a formação de pseudorecombinantes viáveis não se baseia apenas nas relações filogenéticas e nas sequências conservadas dos iterons (ANDRADE et al., 2006).

Contudo, a especificidade da ligação da proteína Rep aos iterons é considerada determinante na formação de pseudo-recombinantes viáveis entre diferentes espécies/estirpes de begomovírus (EAGLE; OROZCO; HANLEY-BOWDOIN, 1994; FONTES 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 íterons (ARGUELLO-ASTORGA; RUIZ-MEDRANO, 2001; RUIZ-MEDRANO; XOCONOSTRE-CAZARES; LUCAS, 2001).

2.7 Diversidade de *begomovirus* infectando plantas da família Euphorbiaceae no Brasil

Nas últimas décadas os begomovírus têm emergido como um dos principais patógenos de plantas, ocasionando perdas econômicas severas, particularmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (MORALES, 2010) em culturas importantes como feijão (*Phaseolus vulgaris*), mandioca (*Manihot esculenta*), algodão (*Gossypium* sp.), tabaco (*Nicotiana tabacum*) e tomate (GRAHAM; MARTIN; ROYE, 2010).

No entanto, plantas não-cultivadas vêm sendo relatadas como hospedeiras de begomovírus por todo o mundo, incluindo o Brasil, com destaque para aquelas pertencentes às famílias Malvaceae, Euphorbiaceae e Fabaceae (MORALES; ANDERSON, 2001; IDRIS et al., 2003; JOVEL et al., 2004; VARSANI et al., 2009; FIALLO-OLIVE et al., 2010; MUBIN et al., 2010).

Plantas não-cultivadas da família Euphorbiaceae têm sido relatadas como hospedeiras naturais de begomovírus há bastante tempo. Na década de 1930, *Jatropha gossypifolia* L. foi descrita como hospedeira de begomovírus (COOK, 1931 apud SIMMONDS-GORDON, 2014). Desde então diversas espécies têm sido descritas e caracterizadas incluindo *Euphorbia mosaic virus* (EuMV), *Croton yellow vein virus* (CrYVV), *Euphorbia yellow mosaic virus*, (EuYMV), *Dalechampia chlorotic mosaic virus* (DaCIMV) e *Jatropha mosaic virus* (JMV).

No Brasil, um begomovírus causando mosaico em *Euphorbia heterophylla* L. (syn. *Euphorbia prunifolia*) foi relatado em 1950 (COSTA; BENNET, 1950), e provavelmente corresponde a EuYMV, o primeiro begomovírus de euforbiáceas completamente caracterizado no país (FERNANDES et al., 2011). Adicionalmete EuYMV tem sido encontrado infectando naturalmente *Macrotilium artopurpureum*, *Sida santaremensis*, *Crotalaria juncea* e *Solanum lycopersicum*.

Em 2006, foi detectada por meio de *Polymerase Chain reaction* (PCR) a infecção por begomovírus em plantas de *Cnidioscolus urens* proveniente do estado de Alagoas apresentando sintomas de mosaico e deformação foliar (Assunção et al., 2006). Contudo, a sequência completa do genoma deste begomovírus levou dez anos para ser conhecida, e este

foi nomeado *Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus* (CnMLDV). Até o momento CnMLDV é o único begomovírus descrito infectar *C. urens* o país.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta do material vegetal

Amostras foliares de cansação apresentando sintomas indicativos de infecção por begomovírus (amarelecimento, mosaico, deformação foliar, nanismo e bolhosidade) foram coletadas no estado de Alagoas e Piauí em 2018 (Figura 4). Sendo duas amostras provenientes da cidade de Atalaia (AL) e uma de Teresina (PI). O material vegetal foi armazenado em ultra-freezer (-80°C) no Laboratório de Fitopatologia Molecular e Virologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas.

3.2 Clonagem e sequenciamento do genoma completo de begomovírus

DNA total foi extraído a partir de cada amostra vegetal segundo protocolo de Doyle & Doyle (1987) e utilizado como molde para reações de amplificação dos genomas virais completos via círculo rolante na presença da enzima DNA polimerase do bacteriófago phi29, de acordo com o método descrito por Inoue-Nagata et al. (2004). Alíquotas das reações de amplificação foram submetidas, individualmente, a clivagens com enzimas de restrição (*ApaI* e *HindIII*) para linearizar o genoma. Os produtos das reações de clivagem enzimática foram analisados em gel de agarose a 0,8%, corados com brometo de etídio (5 µg/mL) e visualizados sob luz UV. Alíquotas das reações de clivagem contendo fragmentos de aproximadamente 2600 nucleotídeos (nt), correspondente a uma cópia de cada componente genômico, foram utilizadas para ligação no 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 DH10B pelo método de choque térmico (SAMBROOK, et al., 2001). Colônias contendo os possíveis plasmídeos recombinantes foram repicadas para meio LB líquido contendo ampicilina (Ampicilin, sodium salt USB[®]) e incubadas a 37°C sob agitação orbital de 180 rpm durante 12h. Após incubação, as culturas foram submetidas à extração de DNA plasmidial com KIT illustra[™] plasmidPrep Mini Spin (GE Healthcare). O DNA plasmidial foi então digerido com a enzima utilizada para clonagem e o padrão de bandas em gel de agarose 0,8% foi utilizado

para confirmação do processo de clonagem. Clones foram digeridos com a enzima *HaeIII* para seleção de isolados a serem completamente sequenciados comercialmente por *primer walking*.

3.3 Análise de sequências e demarcação de espécie

Sequências nucleotídicas correspondentes ao componente genômico viral (DNA-A) completo foram montadas utilizando-se o programa *CodonCode Aligner* v. 4.1.1 (www.codoncode.com). As sequências obtidas foram inicialmente analisadas com o algoritmo *BLASTn* (ALTSCHUL et al., 1990) e o banco de dados de nucleotídeos não-redundante GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) para determinar as espécies virais com as quais elas compartilham maior identidade de sequência. Sequências similares obtidas a partir do GenBank (Anexo1) foram utilizadas para demarcação de espécie dos novos isolados de begomovírus utilizando-se o programa *Sequence Demarcation Tool* v. 1.2 (MUHIRE et al., 2013).

3.4 Análise filogenética

Alinhamentos múltiplos de sequências nucleotídicas dos begomovírus provenientes de *C. urens* do presente trabalho (Anexo2) e outros isolados disponíveis no GenBank (Anexo1) foram preparados para o conjunto de dados DNA-A, gene *CP* e *Rep*, utilizando-se o algoritmo MUSCLE implementado no pacote MEGA 6 (TAMURA et al 2013), e ajustadas manualmente. Árvores de Inferência Bayesiana para cada conjunto de dados foram geradas no *web portal* CIPRES (MILLER et al., 2010) usando MrBayes v. 3.2.3 (RONQUIST et al., 2012). O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi determinado para cada conjunto de dados usando MrModeltest 2.3 (POSADA; BUCKLEY, 2004) de acordo com o *Akaike Information Criterion* (AIC). O modelo evolutivo GTR+I+G, foi utilizado para o conjunto de dados DNA-A. Análises foram rodadas para cada conjunto de dados por 10 milhões de gerações usando quatro cadeias e amostrando a cada 1.000 gerações, para um total de 10.000 árvores. As primeiras 2.500 árvores foram descartadas como uma fase de *burn-in*. Probabilidades posteriores (RANNALA; YANG, 1996) foram determinadas a partir de uma árvore consenso *majority-rule* gerada com as 7.500 árvores remanescentes. As árvores foram visualizadas e editadas nos programas FigTree v. 1.4 (ztree.bio.ed.ac.uk/software/figtree) e Inkscape (<https://inkscape.org/pt/>).

3.5 Análises de recombinação

A determinação dos locais (*breakpoints*) de recombinação e identificação de prováveis sequências parentais foram realizadas, utilizando os métodos RDP, Geneconv, Boot-scan, Maximum Chi Square, Chimaera, SisterScan e 3Seq implementados no pacote RDP v. 4.0 (MARTIN et al., 2015). Nesta análise, o mesmo banco de dados de sequências de DNA-A utilizado na análise filogenética (Anexo1) foi analisado com definições padrão para os diferentes métodos e a significância estatística foi inferida por um *P*-valor menor que o Bonferroni corrigido de 0,05. Somente eventos de recombinação detectados no mínimo por quatro diferentes métodos foram considerados confiáveis.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises de sequências e demarcação de espécie

Um total de seis clones do DNA-A obtidos a partir de três amostras *C. urens* foram completamente sequenciados. Seguindo o critério de $\geq 91\%$ de identidade nucleotídica para sequências completas de DNA-A para demarcação de espécies de begomovírus estabelecido pelo *Geminiviridae Study Group* do *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) (BROWN et al., 2015), as análises BLASTn e de comparações pareadas utilizando SDT revelaram a presença de duas espécies. Os clones BR_At3_18A, BR_At4_18A, BR_At5_18A, BR_At7_18A e BR_At8_18A correspondem a isolados da espécie *Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus* (CnMLDV) previamente descrita em Alagoas, com a qual compartilharam identidade variando entre 94,8 – 99,8% (Figura 3). O clone BR_Ter3_18A representa uma nova espécie que é mais proximamente relacionada com o *Tomato yellow spot virus* (ToYSV; número de acesso KJ742419) com 80,6% de identidade nucleotídica, para qual foi proposto o nome *Cnidoscolus blistering yellow mosaic virus* (CnBYMV). Quando a sequência da nova espécie (CnBYMV) foi comparada com a espécie tipo de CnMLDV e outros isolados obtidos nesse trabalho a porcentagem de identidade variou entre 79,4 e 79,8 % (Figura 3).

As sequências dos isolados virais do presente trabalho variaram em comprimento entre 2585 a 2672 nucleotídeos de comprimento e exibiram organização genômica típica dos begomovírus bissegmentados do “Novo Mundo” com quatro ORFs no DNA-A (*CP*, *Rep*, *TrAP*, *REn* e *AC4*) (Tabela 1). Os isolados de CnMLDV obtidos neste estudo não apresentaram a ORF AC5.

Na região comum dos isolados virais foi detectado o nonanucleotídeo conservado (5' TAATATT/AC 3'), o qual faz parte do stem-loop que contém a origem de replicação viral; e iterons de sequência GGGG para CnMLDV e GGAG para CnBYMV, sítio de ligação de Rep essencial para o início da replicação viral.

Uma evidência que reforça a presença de duas espécies de begomovírus nas amostras avaliadas é a diferença na expressão de sintomas na planta hospedeira. As amostras CN8 e CN9 infectadas por CnMLDV exibiram sintomas de mosaico e deformação foliar, semelhantes àqueles previamente descritos para outros isolados dessa espécie (MELO et al., 2016). Enquanto a amostra C1 infectada por CnBYMV, exibiu sintomas de bolhosidade e mosaico amarelo (Figura 4).

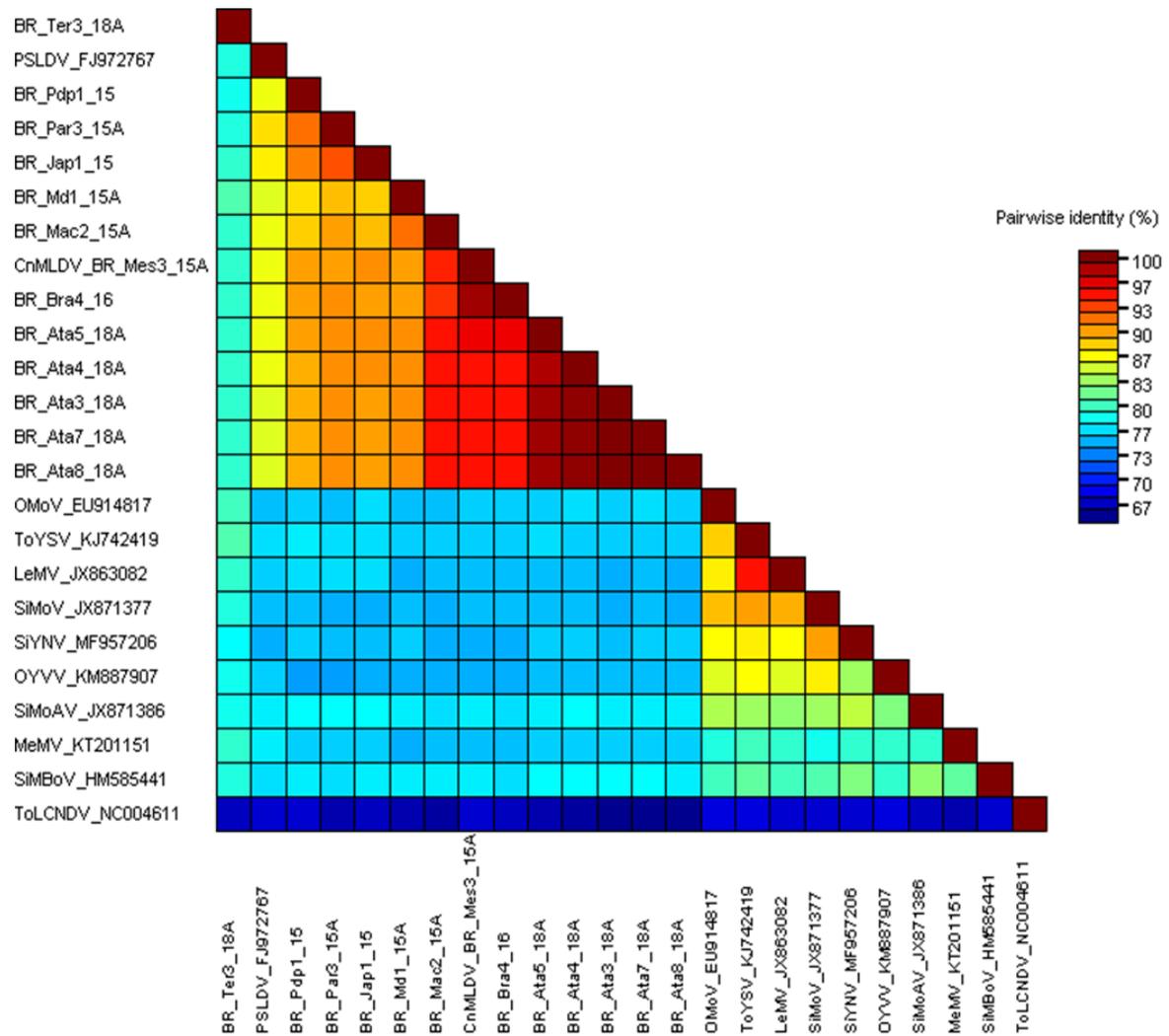


Figura 3. Matriz bidimensional representando porcentagem de identidade de comparações pareadas de seqüências nucleotídicas do DNA-A coletadas nos estados de AL (BR_At3_18A, BR_At4_18A, BR_At5_18A, BR_At7_18A, BR_At8_18A) e PI (BR_Ter3_18A) com amostras de begomovírus disponíveis no GenBank.

Tabela 1. Open Reading frame (ORFs), com seus respectivos números de aminoácidos (aa), encontradas no componente genômico DNA-A dos begomovírus descritos neste trabalho.

Amostra/ Clones	Origem	Isolado	Tamanho			ORFs			Espécie
			DNA-A	CP	Rep	TrAP	REn	AC4	
CN8	Atalaia								CnMLDV
CN8.3		BR_At3_18A	2672 nt	251 aa	357 aa	129 aa	132 aa	97 aa	
CN8.4		BR_At4_18A	2641 nt	257 aa	357 aa	129 aa	132 aa	97 aa	
CN8.7		BR_At3_18A	2663 nt	257 aa	357 aa	129 aa	129 aa	97 aa	
CN9	Atalaia								CnMLDV
CN9.5		BR_At5_18A	2641 nt	257 aa	357 aa	129 aa	132 aa	97 aa	
CN9.8		BR_At8_18A	2663 nt	257 aa	357 aa	129 aa	132 aa	97 aa	
C1	Teresina								CnBYMV
C1.3		BR_Ter3_18A	2585 nt	254aa	359aa	129aa	132aa	85aa	(nova)



Figura 4. Sintomas em *Cnidoscolus urens* infectadas por begomovírus obtidos neste estudo. **A.** Sintomas de mosaico e deformação foliar causados por *Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus* (CnMLDV). **B.** Sintomas de bolhosidade e mosaico amarelo causados por *Cnidoscolus blistering yellow mosaic virus* (CnBYMV).

4.2 Análises filogenéticas

Para determinar o relacionamento filogenético dos begomovírus desse trabalho e outros begomovírus de plantas cultivadas e não cultivadas, árvores baseadas nas sequências completas do DNA-A, genes *CP* e *Rep* foram construídas utilizando Inferência Bayesiana. Na árvore filogenética os seis clones de DNA-A obtidos foram distribuídos em dois grandes grupos bem suportados (Figura 5). No grupo I os clones BR_At3_18A, BR_At4_18A, BR_At5_18A, BR_At7_18A, BR_At8_18A se agruparam com outros isolados de CnMLDV, provenientes do estado de Alagoas e com o isolado de PSLDV. No entanto, estes foram mais proximamente relacionados a isolados de CnMLDV oriundos de Branquinha, Maceió, Marechal Deodoro e Messias (subpopulação Sul). Enquanto os isolados de CnMLDV provenientes de Japaratinga, Paripueira e Porto de Pedras formaram um outro subgrupo (subpopulação Norte). Estes diferem dos demais isolados da subpopulação sul por apresentar uma ORF adicional AC5, a qual codifica uma proteína relacionada com silenciamento transcricional de genes (TGS), silenciamento pós-transcricional de genes (PTGS) e/ou resposta semelhante à de hipersensibilidade (LI et al., 2015). Esse resultado confirma a existência de estruturação por região geográfica de subpopulações de CnMLDV em Alagoas, como sugerido por Mendes (2017). Enquanto o grupo II englobou a espécie CnBYMV

representada pelo clone BR_Ter3_18A e begomovírus descritos em plantas cultivadas e não cultivadas.

Nas filogenias baseadas nas sequências nucleotídicas dos genes *CP* e *Rep* (figura 6 e 7) os isolados de CnMLDV (BR_At3_18A, BR_At4_18A, BR_At5_18A, BR_At7_18A, BR_At8_18A) continuaram se agrupando geograficamente com outros isolados pertencentes a população Sul descrita por Mendes et al (2017). No entanto, na filogenia para o gene *CP* a espécie CnBYMV agrupou mais proximamente com a espécie CnMLDV proveniente de Messias (BR_Mes_15A), ocupando um grupo contendo todos os isolados de CnMLDV de Alagoas. Enquanto na filogeia do gene *Rep* a espécie CnBYMV agrupou mais proximamente com a espécie CnMLDV proveniente de Messias (BR_Mes_15A), porém ocupou o grupo que contém outros begomovírus de planta cultivadas e não cultivadas. As incongruências topológicas encontradas nas árvores filogenéticas do DNA-A, gene *CP* e gene *Rep* sugerem a existência de recombinação na espécie CnBYMV.

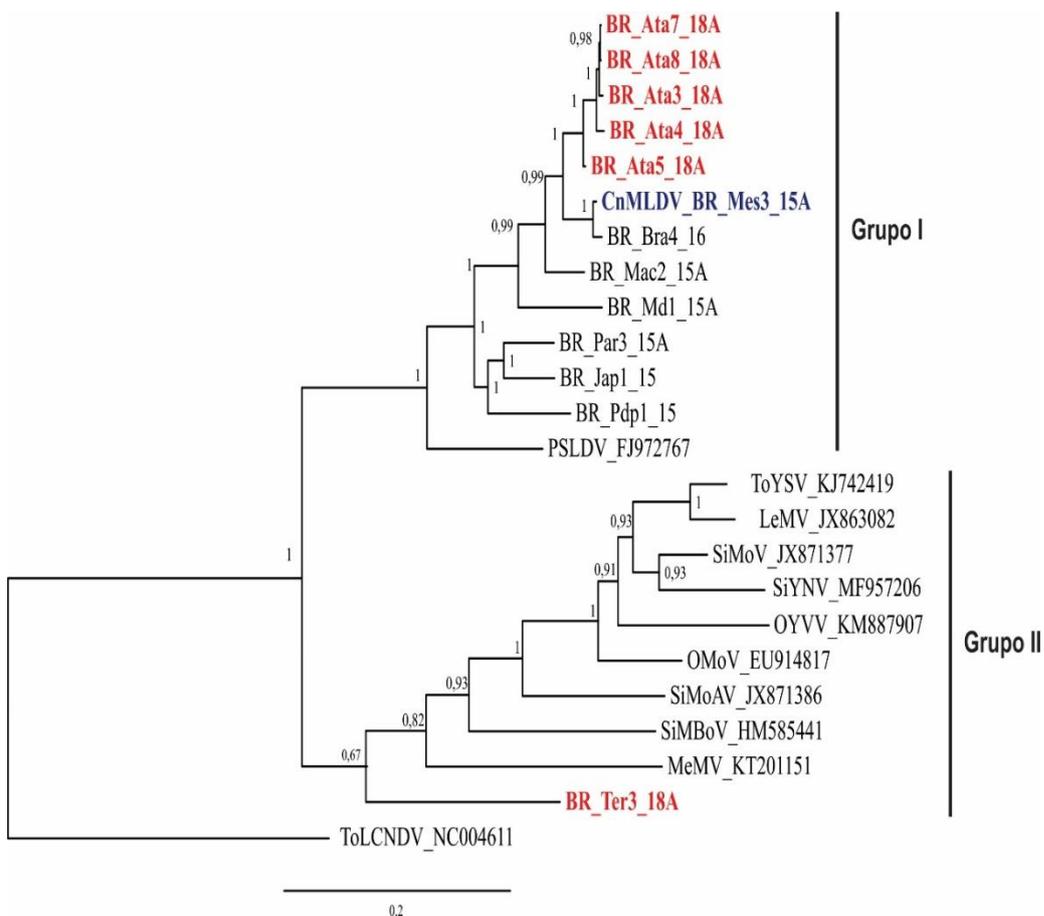


Figura 5. Análise filogenética de inferência Bayesiana baseada no DNA-A, mostrando a formação de dois grupos principais. Grupo I = isolados de provenientes de Alagoas e PSLDV, e Grupo II = isolado de *C. urens* proveniente do Piauí e begomovírus que infectam plantas cultivadas e não cultivadas.

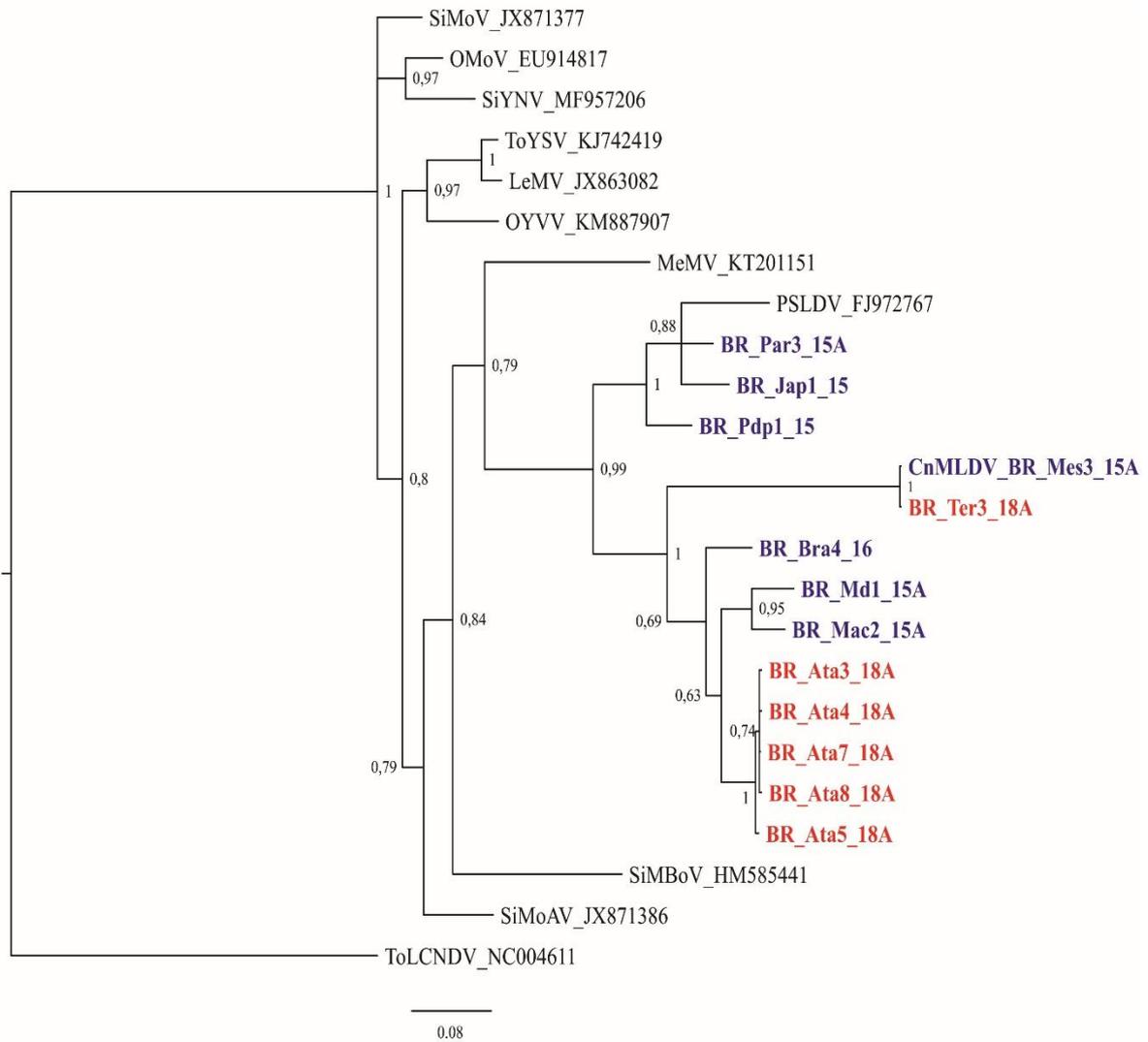


Figura 6. Árvores filogenéticas de inferência Bayesiana construídas para Gene *CP*. Isolados de CnMLDV por descrito por Mendes (2017) estão marcados em azul, e os do presente trabalho estão indicados em vermelho.

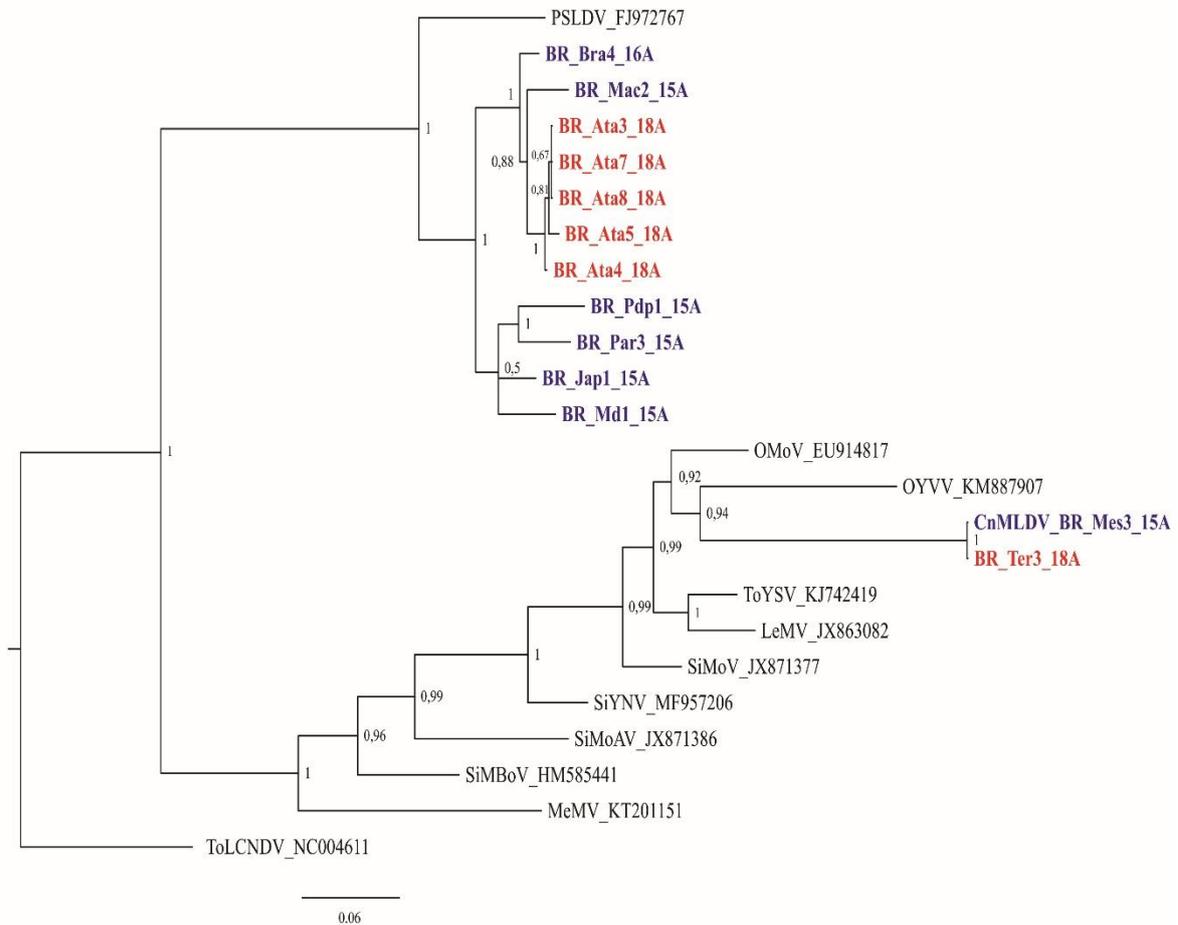


Figura 7. Árvore filogenética de inferência Bayesiana construída para gene *Rep*. Isolados de CnMLDV por descrito por Mendes (2017) estão marcados em azul, e os do presente trabalho estão indicados em vermelho.

4.3 Análise de recombinação

Um conjunto de dados composto pelos isolados deste estudo (BR_At3_18A, BR_At4_18A, BR_At5_18A, BR_At7_18A, BR_Ter3_18A), isolados recuperados de MENDES (2017) provenientes de *C. urens*, e outros begomovírus mais proximamente relacionados (Anexo1) foi submetido à análise no pacote RDP4 para confirmar prováveis eventos de recombinação. Nenhuma evidência para eventos de recombinação foi observada para os isolados de Alagoas. Diferindo dos resultados encontrados por MENDES (2017), que observou a ocorrência de vários eventos de recombinação intraespecífica e interespecíficas entre os isolados de CnMLDV. Um evento de recombinação foi detectado envolvendo o isolado BR_Ter3_18A (breakpoint inicial no nucleotídeo 2142 e breakpoint final no 53)

compreendendo a RC e o gene *Rep*, identificando CnMLDV como provável maior parental (84,2% de similaridade) e SiMoV (86,7%) como menor parental.

Recombinação é um dos principais fatores atuando para a variabilidade genética e evolução dos begomovírus (LEFEUVRE et al., 2007; 2009; PRASANNA; RAI, 2007; MARTIN et al., 2011; SILVA et al., 2011; 2012; LIMA et al., 2013; ROCHA et al., 2013; HOSSEINZADEH et al., 2014; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014; VENKATARAVANAPPA et al., 2014), sendo responsável pelo surgimento de novas espécies e/ou isolados causando grandes prejuízos em culturas de importância econômica em todo o mundo (ZHOU et al., 1997; MONCI et al., 2002; IDRIS; BROWN, 2002; BRIDDON et al., 2014).

A maioria dos eventos de recombinação em begomovírus apresentam breakpoints localizados nos genes *Rep*, *REn* e RC, corroborando com estudos anteriores os quais identificaram estas regiões como hotspot, já a região do gene CP é um coldspot de recombinação (STANLEY, 1995; FAUQUET et al., 2005; GARCÍA-ANDRÉS et al., 2007b; LEFEUVRE et al., 2007; SILVA et al., 2012; ROCHA et al., 2013; LIMA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). O gene *Rep* contém múltiplos domínios relacionados com o processo de replicação viral (ILYINA; KOONIN, 1992; HEYRAUD-NITSCHKE et al., 1995; OROZCO et al., 1997; NASH et al., 2011). Mendes et al. (2017), estudando a estrutura de populações de CnMLDV no estado de Alagoas observaram que esta espécie é altamente recombinante, possui alta variabilidade nucleotídica, porém suas ORFs CP e REP se encontram sobre forte seleção purificadora ($dN/dS < 0,2$). Isso significa que grande parte das mutações que ocorrem em CnMLDV são sinônimas, resultando em poucas alterações na sequência de aminoácidos, e conseqüentemente na conservação da estrutura e função dessas proteínas. No caso da proteína REP, a conservação de sua estrutura é importante para a manutenção dos principais processos biológicos dos begomovírus, especialmente a replicação.

CONCLUSÃO

- *Cnidoscolus mosaic leaf deformation vírus* (CnMLDV) é o único begomovírus descrito infectando *C. ures* no estado de Alagoas;
- Uma nova espécie foi descrita, *Cnidoscolus blistering yellow mosaic virus* (CnBYMV), em *C. urens* no estado do Piauí;
- Estudos adicionais são necessários para detecção e obtenção do componente genômico DNA-B para caracterização do genoma completo dessa nova espécie.

REFERÊNCIAS

- ALABI, O. J. et al. Alternate hosts of *African cassava mosaic virus* and *East African cassava mosaic Cameroon virus* in Nigeria. **Archives of Virology**, v. 153, n. 9, p. 1743-1747, 2008.
- ALTSCHUL S.F., et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, 403-410, 1990.
- AMBROZEVICIUS, L.P. et al. Genetic diversity of begomovirus infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 372-377, 2002.
- ANDRADE, E.C. et al. *Tomato yellow spot virus*, a tomato-infecting begomovirus from Brazil with a closer relationship to viruses from *Sida* sp., forms pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from *Sida*. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 3687-3696, 2006.
- 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**, v. 146, p. 1465-1485, 2001.
- ASSUNÇÃO, I.P. et al. Diversidade genética de begomovírus que infectam plantas invasoras na Região Nordeste. **Planta Daninha**, v. 24, p. 239-244, 2006.
- BARBOSA, et al. Natural infection of *Nicandra physaloides* by *Tomato severe rugose virus* in Brazil. **Journal of General Plant Pathology**, v. 75, n. 6, p. 440, 2009.
- BARBOSA, L.F. et al. Indigenous American species of the *Bemisia tabaci* complex are still widespread in the Americas. **Pest Management Science**, **70**: 1440–1445, 2014.
- BARRETO, S. S. et al. A study of weeds as potential inoculum sources for a tomato-infecting begomovirus in central Brazil. **Phytopathology**, v. 103, n. 5, p. 436-44, 2013.
- BEDFORD, I.D. et al. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographical regions. **Annals of Applied Biology**, v. 125, p. 311-325, 1994.
- BREWER, H.C. et al. A guide to the contained use of plant virus infectious clones. **Plant Biotechnol. J**, v.16, p. 832–843, 2018.
- BRIDDON, R. W. et al. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. **Virology**, v. 177, p. 85-94, 1990.
- BRIDDON, R. W. *Geminiviridae*. [online], 2015. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000750.pub3.
- BRIDDON, R.W. et al. Recommendations for the classification and nomenclature of the DNA- β satellites of begomoviruses. **Archives of Virology**, v. 153, p. 763-781, 2008..
- BROWN J.K., et al. Family Geminiviridae. In: King A.M.Q, Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. (eds) *Virus Taxonomy 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, p. 351-373, 2012.

- BROWN, J.K. et al. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence Comparisons. **Archives of Virology**, v. 160, p. 1593-1619, 2015.
- BROWN, J.K. The biology and molecular epidemiology of the Geminiviridae subgroup III. **Plant Microbe Interactions**, v. 2, p. 125-195, 1997.
- BULL, S.E. et al. Infectivity, pseudorecombination and mutagenesis of Kenyan cassava mosaic begomoviruses. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 1624-1633, 2007.
- BURGER, W.; HUFT, M. Euphorbiaceae. In: **Flora costaricensis**, 1995. v. 36, p. 169.
- 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, 48 p., 2004.
- CALEGARIO, R.F. et al. Characterization of *Tomato yellow spot virus*, (ToYSV), a novel tomato-infecting begomovirus from Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1335-1343, 2007.
- 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**, v. 12, p. 233, 2007.
- CASTILLO-URQUIZA, G.P. et al. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Archives of Virology**, v. 153, p. 1985-1989. 2008.
- CHANG-SIDORCHUK, L. et al. Complete genome sequences of two novel bipartite begomoviruses infecting common bean in Cuba. **Arch. Virol.**, v. 162, p. 1431- 1433, 2017.
- CHATTERJI, A. et al. Identification of replication specificity determinants in two strains of tomato leaf curl virus from New Delhi. **Journal of Virology**, 73, p. 5481-5489, 1999.
- CORDEIRO, I.; SECCO, R.. Cnidoscopus in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015.
- COSTA A. S., BENNETT C.W. Whitefly-transmitted mosaic of *Euphorbia prunifolia*. **Phytopathology** 40:266–283, 1950.
- COSTA, A.S. Increase in the populational density of *Bemisia tabaci*, a threat of widespread virus infection of legumes crops in Brazil. In Bird J.; Maramorosch K. (eds) **Tropical diseases of legumes**. Academic Press, p. 27-49, 1975.
- COSTA, A.S.; BENNETT, C.W. Whitefly transmitted mosaic of *Euphorbia prunifolia*. **Phytopathology**, v. 40, p. 266-283, 1950.
- COTRIM, M.A. et al. Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. **Summa Phytopathologica**, v. 33, p. 300-303, 2007.
- CRAMERI, R., et al. DNA Shuffling of a Family of Genes from Diverse Species Accelerates Directed Evolution. **Nature**, v. 391, p. 288-291. 1998.

CROMIE, G.A, et al. Recombination at double-strand breaks and DNA ends: conserved mechanisms from phage to humans. **Molecular Cell**, 8(6):1163-74. 2001.

CUI, X.F. 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**, v. 79, p. 10764-10775, 2005.

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

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

DURHAM, T.C.; BAKER, C. J. L.; SNYDER, L.U. First Report of *Sida golden mosaic virus* Infecting Snap Bean (*Phaseolus vulgaris*) in Florida. **Plant Dis.**, v. 94, p. 487, 2010.

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

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 1792-1797, 2004.

ELMER, J. S. et al. Genetic analysis of the tomato golden mosaic virus. II. The product of the AL1 coding sequence is required for replication. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 7043-60, 1988.

ETESSAMI, P. et al. Mutational analysis of complementary-sense genes of African cassava mosaic virus DNA A. **Journal General Virology**, v. 72, p. 1005-12, 1991.

FARIA, J. C. E ZERBINI, F. M. Família *Geminiviridae*: Taxonomia, replicação e movimento. In: (Luz, W. C; Fernandes, J. M; Prestes, A. M; e Picinini, E. C.) **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 8, p. 27-57, 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**, v. 84, p. 321-329, 1994.

FARIA, J.C. et al. Situação atual das geminiviroses no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 125-137, 2000.

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

FAUQUET C.M.; STANLEY T.J. Revising the way we conceive and name viruses below the species level: a review of geminivirus taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. **Archives of Virology**, v. 150, p. 2151-2179, 2005.

FAUQUET, C.M. et al. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. **Archives of Virology**, v. 153, p. 783-821, 2008.

FAUQUET, C.M.; STANLEY, T.J. Revising the way we conceive and name viruses below the species level: a review of geminivirus taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. **Archives of Virology**, v. 150, p. 2151-2179, 2005.

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

FERNANDES, F. R., et al. Three distinct begomoviruses associated with soybean in central Brazil. **Archives of Virology**, 154, 1567-570. 2009.

FERNANDES, F.R, et al. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. **Virus Genes**, v. 36, p. 251-258, 2008.

FERNANDES, J.J. et al. Biological and molecular properties of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. **Plant Pathology**, v. 55, p. 513-522, 2006.

FERNANDES-ACIOLI, N.A.N. et al. First report of *Sida micrantha mosaic virus* in *Phaseolus vulgaris* in Brazil. **Plant Disease**, v. 95, p.1196, 2011.

FIALLO-OLIVE E et al. Complete genome sequences of two begomoviruses infecting weeds in Venezuela. **Arch Virol** 158:277–280, 2013.

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

FIALLO-OLIVÉ, E. et al. Complete nucleotide sequence of *Sida* golden mosaic Florida virus and phylogenetic relationships with other begomoviruses infecting malvaceous weeds in the Caribbean. **Archives of Virology**, v. 155, p. 1535-1537, 2010.

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

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

FONTES, E.P.B. et al. Geminivirus replication origins have a modular organization. **Plant Cell**, v. 6, p. 405-416, 1994b.

FONTES, E.P.B. et al. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. **Journal of Biological Chemistry**, 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**, v. 4, p. 597-608, 1992.

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**, v. 78, p. 2675-2682, 1997.

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** 84, 715-726. 2003.

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

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

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

GARCIA-ARENAL, F.; FRAILE, A.; MALPICA, J.M. Variation and evolution of plant virus populations. **International Microbiology**, 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**, v. 90, p. 1224-1232. 2000.

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

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**, v. 83, p. 709-715, 1993a.

GRAHAM, A.P.; MARTIN, D.P.; ROYE, M.E. Molecular characterization and phylogeny of two begomoviruses infecting *Malvastrum americanum* in Jamaica: evidence of the contribution of inter-species recombination to the evolution of malvaceous weed-associated begomoviruses from the Northern Caribbean. **Virus Genes**, v. 40, p. 256-266, 2010.

GUTIERREZ, C. Geminivirus DNA replication. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 56, p. 313-329, 1999.

HANLEY-BOWDOIN, L. et al. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 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**, 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**, v. 39, p. 369-398, 1999.

HERNANDEZ-ZEPEDA C. et al. Molecular characterization and experimental host range of Euphorbia mosaic virus-Yucatan Peninsula a begomovirus species in the Squash leaf curl virus. **Plant Pathol** 56:763–770, 2007.

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

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

HÖFER, P. et al. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect non transmissible geminivirus isolate. **Virology**, v. 236, p. 288-295, 1997a.

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

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

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

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

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

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

INOUE-NAGATA, A.K. et al. A simple method for cloning of the complete begomovirus using the bacteriophage phi 29 DNA polymerase. **Journal of Virological Methods**, v. 11, p. 209-211, 2004.

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

ISNARD, M. et al. Quasi species 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**, v. 79, p. 3091-3099, 1998.

JARAMILLO, S.; LASTRA, R. Purification and properties of the geminivirus Euphorbia mosaic virus. **Journal of Phytopathology**, v. 115, p. 193-203, 1986.

- JESKE, H. Geminiviruses. In: **TT Viruses**. Springer Berlin Heidelberg, 2009. p. 185-226.
- JESKE, H., LUTGEMEIER, M.; PREISS, W. DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of *Abutilon mosaic virus*. **EMBO Journal**, 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**, v.149, p. 829-841, 2004.
- JUPIN, I. et al. B. DNA replication specificity of TYLCV geminivirus is mediated by the amino-terminal 116 amino acids of the Rep protein. **FEBS Letters**, v. 262, p. 116-120, 1995.
- KEIGHTLEY, P., OTTO, S. P. Interference among deleterious mutations favours sex and recombination in finite populations. **Nature** 443: 89–92. 2006.
- 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**, v. 92, p. 3879–3883, 1995.
- LAZAROWITZ, S.G. et al. Sequence-specific interaction with the viral AL1 protein identifies a geminivirus DNA replication origin. **Plant Cell**, v. 4, p. 799-809, 1992.
- LAZAROWITZ, S.G. Geminiviruses: genome structure and gene function. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 11, p. 327-349, 1992.
- 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. 3458-68. 2007.
- LEFEUVRE, P. et al. Widely conserved recombination patterns among single-stranded DNA viruses. **Journal of Virology**, v. 83, n. 6, p. 2697-2707, 2009.
- LEYVA, R.M. et al. First report of *Tobacco leaf curl Cuba virus* infecting common bean in Cuba. **New Disease Reports**, v. 33, p. 17, 2016.
- LIMA A.T.M., et al. *Malvaviscus* yellow mosaic virus, a weed-infecting begomovirus carrying a nanovirus-like nonnucleotide and a modified stem-loop structure. **Phytopathology**, v. 101, p. 104, (Abstract), 2011.
- 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**, v. 31(Suplemento), p. 224, 2006.
- LIMA, A.T.M. et al. Synonymous site variation due to recombination explains higher genetic variability in begomovirus populations infecting non-cultivated hosts. **Journal of General Virology**, v. 94, p. 418-431, 2013.
- LIU, L. et al. *Bean yellow dwarf virus* RepA, but not Rep, binds to maize retinoblastoma protein, and the virus tolerates mutations in the consensus binding motif. **Virology**, v. 256, n. 2, p. 270-279, 1999.

- LOZANO, G. et al. Characterization of non-coding DNA satellites associated with sweepoviruses (genus *Begomovirus*, *Geminiviridae*)—definition of a distinct class of begomovirus-associated satellites. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 162, 2016.
- MANSOOR, S. et al. Geminivirus disease complexes: an emerging threat. Trends in **Plant Science**, v. 8, p. 128-134, 2003.
- MAR, T.B. et al. Genetic variability and population structure of the New World begomovirus *Euphorbia yellow mosaic virus*. **Journal of General Virology**, v. 98, p. 1537–155, 2017.
- MARTIN D. P. et al. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. **Virus Evolution**, p. 1-5, 2015.
- MARTIN, D. P. et al. Recombination in Eukaryotic Single Stranded DNA Viruses. **Viruses**, v. 3, p. 1699-1738, 2011.
- MATYIS, J.C.; et al. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v. 1, p. 267-275, 1975.
- MELGAREJO, T. A. et al. Characterization of a New World Monopartite Begomovirus Causing Leaf Curl Disease of Tomato in Ecuador and Peru Reveals a New Direction in Geminivirus Evolution. **Journal of Virology, American Society for Microbiology**, v. 87, p. 5397-5413, 2013.
- 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**, v. 7(Supplement), p. 157, 2002.
- MELLO, R.N.; ALMEIDA, A.M.R.; ZERBINI, F.M. Detection and identification of geminiviruses infecting soybean and associated weeds in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 444, 2000.
- MELO, A. L. D.; SALES, M. F. D. O gênero *Cnidoscolus* Pohl (Crotonoideae-Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, p. 806-827, 2008.
- MELO, A. M. et al. *Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus*: a novel begomovirus infecting euphorbiaceous plants in Brazil. **Archives of Virology**, v. 161, n. 9, p. 2605- 2608, 2016.
- MILLER, M. A. et al. The CIPRES Portals. **Cipres**. 2010. Website http://www.phylo.org/sub_sections/portal [acesso em 10 Fevereiro de 2019].
- MONCI, F. et al. A natural recombinant between the geminiviruses Tomato yellow leaf curl Sardinia virus and Tomato yellow leaf curl virus exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. **Virology**, v. 303, p. 317-326, 2002.
- MONDE, G. et al. Dual infection by cassava begomoviruses in two leguminous species (Fabaceae) in Yangambi, Northeastern Democratic Republic of Congo. **Archives of Virology**, v. 155, n. 11, p. 1865-1869, 2010.

MORALES, F.J. Distribution and dissemination of begomoviruses in Latin America and the Caribbean. In: *Bemisia* bionomics and management of global pest; Stansly PA & Naranjo SE (eds), pp: 283-318, 2010.

MORALES, F.J. History and current distribution of begomoviruses in Latin America. **Advances in Virus Research**, 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**, v. 146, n. 3, p. 415-441, 2001.

MUBIN, M. et al. Characterization of begomovirus components from a weed suggests that begomoviruses may associate with multiple distinct DNA satellites. **Virus Genes**, v. 40, p. 452-457, 2010.

MUHIRE B., et al. A genome-wide pairwise-identity-based proposal for the classification of viruses in the genus Mastrevirus (family Geminiviridae). **Archives of Virology**, v. 158, p. 1411–1424, 2013.

MUHIRE, B.M.; VARSANI, A.; MARTIN, D.P. SDT: A Virus Classification Tool Based on Pairwise Sequence Alignment and Identity Calculation. **PLoS ONE**, v. 9, p. 1-8, 2014.

NG, T. F. F. et al. Exploring the diversity of plant DNA viruses and their satellites using vector-enabled metagenomics on whiteflies. **PloS One**, v. 6, n. 4, p. e19050, 2011.

NOZAKI, D.N et al. Ocorrência de *Tomato severe rugose virus* em pimentão (*Capsicum annuum* L.) no estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30 (Suplemento), p. S189, 2005.

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**, v. 73, p. 1609-1616, 1999.

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

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

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

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

PITA, J.S. et al. Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 655-665, 2001.

- POSADA, D.; BUCKLEY, T. Model Selection and Model Averaging in Phylogenetics: Advantages of Akaike Information Criterion and Bayesian Approaches Over Likelihood Ratio Tests. **Systematic Biology**, v. 53, p. 793–808, 2004.
- PRASANNA, H. C.; RAI, M. Detection and frequency of recombination in tomato-infecting begomoviruses of South and Southeast Asia. **Virology Journal**, v. 4, p. 111, 2007.
- PREISS, W.; JESKE, H. Multitasking in Replication Is Common among Geminiviruses. **The Journal of Virology**, v. 77, p. 2972-80, 2003.
- RAMOS, P. L. et al. *Tomato mottle Taino virus* pseudorecombines with PYMV but not with ToMoV: Implications for the delimitation of cis- and trans- acting replication specificity determinants. **Archives of Virology**, v. 148, p. 1697-1712, 2003.
- RAMOS-SOBRINHO, R., et al. Contrasting genetic structure between two begomoviruses infecting the same leguminous Hosts. **Journal of General Virology**, 95,2540–2552. 2014.
- RANNALA, B.; YANG, Z. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. **Journal of Molecular Evolution**, v. 43, p. 304-311, 1996.
- REZENDE, W.L. et al. Infecção mista em plantas de tomate infectadas por geminivírus, detectada por meio de LIS-SSCP-PCR. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 338, 1997.
- RIBEIRO, S.G. et al. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. **Archives of Virology**, v. 148, p. 281-295, 2003.
- RIBEIRO, S.G. et al. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. **Archives of Virology**, v. 148, p. 281-295, 2003.
- 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**, v. 97, p. 702-711, 2007.
- ROCHA, C. S. et al. Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly evolving, and segregated based on geographical location. **Journal of Virology**, v. 87, n. 10, p. 5784-5799, 2013.
- ROJAS, M.R. et al. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 361–394, 2005.
- ROMAY, G. et al. Association of an atypical alphasatellite with a bipartite New World begomovirus. **Archives of Virology**, v. 155, p. 1843-1847, 2010.
- RONQUIST, F. et al. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice across a Large Model Space. **Systematic Biology Advance Access**, v. 61, p. 539-42, 2012.
- ROOSSINCK, M. J. Mechanisms of plant virus evolution. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, p. 191–209, 1997.

- ROSARIO, K. et al. Begomovirus-associated satellite dna diversity captured through vector-enabled metagenomic (VEM) surveys using whiteflies (Aleyrodidae). **Viruses**, v. 8, p. 36, 2016.
- ROZAS, J. et al. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, v. 19, p. 2496–2497, 2003.
- RUIZ-MEDRANO, R.; XOCONOSTLE-CAZARES, B.; LUCAS, W.J. The phloem as a conduit for inter-organ communication. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 202-209., 2001.
- SAMBROOK J.; RUSSEL D. **Molecular Cloning -A Laboratory Manual** (3^a ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SÁNCHEZ-CAMPOS S. et al. Fulfilling Koch's postulates confirms the monopartite nature of tomato leaf deformation virus: A begomovirus native to the New World. **Virus Research**, v. 173, p. 286-293, 2013.
- SANDERFOOT, A.A.; LAZAROWITZ, S.G. Cooperation in viral movement: The geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery. **Plant Cell**, v. 7, p. 1185-1194, 1995.
- SEAL, S. E.; VAN DEN BOSCH, F.; JEGER, M. J. Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: Implications for sustainable control. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 25, p. 23-46. 2006.
- SILVA S. J. C. et al. Species diversity, phylogeny and genetic variability of begomovirus populations infecting leguminous weeds in northeastern Brazil. **Plant Pathology**, 61:457–467, 2012.
- SILVA, S.J.C. et al. High genetic variability and recombination in a begomovirus population infecting the ubiquitous weed *Cleome affinis* in northeastern Brazil. **Archives of Virology**, v. 156, p. 2205–2213, 2011.
- SILVA, S.J.C. et al. Species diversity, phylogeny and genetic variability of begomovirus populations infecting leguminous weeds in northeastern Brazil. **Plant Pathology**, v. 61, p. 457–467, 2012.
- SIMMONDS-GORDON R. N. et al. First report of a complete genome sequence for a begomovirus infecting *Jatropha gossypifolia* in the Americas. **Arch Virol** 159:2815–2818, 2014.
- SIMMONDS-GORDON, R. N. et al. First report of a complete genome sequence for a begomovirus infecting *Jatropha gossypifolia* in the Americas. **Archives of Virology**, v. 159, n. 10, p. 2815-8, 2014.
- 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**, v. 206, p. 707-712, 1995.
- STANLEY, J. et al. Family *Geminiviridae*. In *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. **Elsevier**, p. 301–326, 2005.

- 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**, v. 88, p. 8029-8033, 1991.
- STEWART, C. et al. Mixed infection of *Sida jamaicensis* in Jamaica reveals the presence of three recombinant begomovirus DNA A components. **Archives of Virology**, v. 159, n. 9, p. 2509-2512, 2014.
- SUNG, Y.K.; COUTTS, R.H. Pseudorecombination and complementation between potato yellow mosaic geminivirus and tomato golden mosaic geminivirus. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 2809-2815, 1995.
- SUNTER, G. et al. Plants expressing tomato golden mosaic virus AL2 or beet curly top virus L2 transgenes show enhanced susceptibility to infection by DNA and RNA viruses. **Virology**, v. 285, n. 1, p. 59-70, 2001.
- TAMURA, K. et al. **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.
- TAVARES, S.S. et al. Further molecular characterization of weed-associated begomoviruses in Brazil with an emphasis on *Sida* spp. **Planta Daninha**, v. 30, n. 2, p. 305-315, 2012.
- TIMMERMANS, M.C.P.; DAS, O.P.; MESSING, J. Geminiviruses and their uses as extrachromosomal replicons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 45, p. 79-112, 1994.
- UMAHARAN, P. et al. Distribution and diversity of geminiviruses in Trinidad and Tobago. **Phytopathology**, v. 88, p. 1262-1268, 1998.
- UNSELD, S. et al. Virus-specific adaptations for the production of a pseudorecombinant virus formed by two distinct bipartite geminiviruses from Central America. **Virology**, v. 274, p. 179-188, 2000.
- VAGHI MEDINA, C. G.; MARTIN, D. P.; LÓPEZ LAMBERTINI, P. M. *Tomato mottle wrinkle virus*, a recombinant begomovirus infecting tomato in Argentina. **Archives of Virology**, v. 160, n. 2, p. 581-585, 2015.
- VANITHARANI, R. et al. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. **Journal of Virology**, v. 78, 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**, v. 6, p. 36, 2009.
- VARSANI, A. et al. *Capulavirus* and *Grablovirus*: two new genera in the family *Geminiviridae*. **Archives of Virology**, p. 1-13, 2017.
- VARSANI, A. et al. Establishment of three new genera in the family *Geminiviridae*: *Becurtovirus*, *Eragrovirus* and *Turncurtovirus*. **Archives of Virology**, v. 159, p. 2193-2203, 2014.

VENKATARAVANAPPA, V. et al. Evidence for two predominant viral lineages, recombination and subpopulation structure in begomoviruses associated with yellow vein mosaic disease of okra in India. **Plant Pathology**, v. 64, n. 3, p. 508-518, 2015.

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**, v. 187, p. 555-564, 1992.

WEBSTER, G. L. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, p. 33-144, 1994.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v. 15, p. 323-354, 1949.

ZERBINI, F.M. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae. **Journal of General Virology**, v. 98, p. 131-133, 2017.

ZERBINI, F.M. et al. Traditional and novel strategies for geminivirus management in Brazil. **Australasian Plant Pathology**, v. 34, p. 475-480, 2005.

ZERBINI, F.M.; CARVALHO, M.G.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. **Introdução à Virologia Vegetal**. Ed. UFV, 2002. 145p. 2000.

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

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**, v. 78, p. 2101-2111, 1997.

ANEXO I

Tabela1. Sequências de begomovírus obtidas a partir do banco de dados não-redundante Genbank.

Espécie (Acrônimo)	Nº de acesso no Genbank	Hospedeiro	Local
<i>Sida yellow net virus</i> (SiYNV)	MF957206	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Brasil
<i>Tomato leaf curl New Delhi virus</i> (ToLCNDV)	NC_004611	<i>Solanum lycopersicon</i>	Índia
<i>Sida mottle Alagoas vírus</i> (SiMoAV)	JX871386	<i>Sida</i> sp.	Brasil
<i>Sida mosaic Bolivia vírus</i> (SiMBoV)	HM585441	<i>Sida micrantha</i>	Bolívia
<i>Passionfruit severe leaf distortion virus</i> (PSLDV)	FJ972767	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Brasil
<i>Oxalis yellow vein virus</i> (OYVV)	KM887907	<i>Oxalis debilis</i>	EUA
<i>Melochia mosaic virus</i> (MeMV)	KT201151	<i>Melochia</i> sp	Brasil
<i>Sida mottle vírus</i> (SiMoV)	JX871377	<i>Sida santaremensis</i>	Brasil
<i>Leonurus mosaic virus</i> (LeMV)	JX863082	<i>Leonurus sibiricus</i>	Brasil
<i>Tomato yellow spot virus</i> (ToYSV)	KJ742419	<i>Salvia hispanica</i>	Argentina
<i>Okra mottle virus</i> (OMoV)	EU914817	<i>Okra</i>	Brasil
<i>Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus</i> (CnMLDV)	NC038982	<i>Cnidoscolus ures</i>	Brasil
<i>Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus</i> (CnMLDV)	BR-Mes3-15A*	<i>Cnidoscolus ures</i>	Brasil
<i>Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus</i> (CnMLDV)	BR-Bra4-16	<i>Cnidoscolus ures</i>	Brasil
<i>Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus</i> (CnMLDV)	BR-Mac2-15A	<i>Cnidoscolus ures</i>	Brasil
<i>Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus</i> (CnMLDV)	BR-Md1-15A	<i>Cnidoscolus ures</i>	Brasil
<i>Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus</i> (CnMLDV)	BR-Jap1-15	<i>Cnidoscolus ures</i>	Brasil
<i>Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus</i> (CnMLDV)	BR-Par3-15A	<i>Cnidoscolus ures</i>	Brasil
<i>Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus</i> (CnMLDV)	BR-Pdp1-15	<i>Cnidoscolus ures</i>	Brasil

*Isolados em negrito foram recuperados do trabalho de Mendes (2017).

ANEXOII

Tabela2. Isolados de *C. urens* obtidos neste trabalho.

Código da Amostra	Local de Coleta	Isolado*	Tamanho do DNA	CP	Rep	TrAP	REn	AC4	MP	NSp
DNA-A										
CN8	Atalaia- AL									
CN8.3		BR-Ata3-18A	2672 nt	251 aa	357 aa	129 aa	132 aa	97 aa	-	-
CN8.4		BR-Ata4-18A	2641 nt	257 aa	357 aa	129 aa	132 aa	97 aa	-	-
CN8.7		BR-Ata7-18A	2663 nt	257 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	-	-
CN9	Atalaia- AL									
CN9.5		BR-Ata5-18A	2641 nt	257 aa	357 aa	129 aa	132 aa	97 aa	-	-
CN9.8		BR-Ata8-18A	2663 nt	257 aa	357 aa	129 aa	132 aa	97 aa	-	-
C1	Teresina-Piauí									
C1.3		BR-Ter3-18A	2585 nt	254aa	359aa	129aa	132aa	85aa	-	-

