



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



ALINE MARQUES MELO

**DIVERSIDADE DE ESPÉCIES E VARIABILIDADE GENÉTICA DE
BEGOMOVÍRUS INFECTANDO CANSANÇÃO (*Cnidoscolus urens*
L.) NO ESTADO DE ALAGOAS**

Rio Largo - AL
2015

ALINE MARQUES MELO

**DIVERSIDADE DE ESPÉCIES E VARIABILIDADE GENÉTICA DE
BEGOMOVÍRUS INFECTANDO CANSANÇÃO (*Cnidoscolus urens* L.)
NO ESTADO DE ALAGOAS**

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

Orientador: Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima.

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

Rio Largo - AL
2015

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

M528d Melo, Aline Marques.
 Diversidade de espécies e variabilidade genética de Begomovírus infectando Cansanção (*Cnidoscolus urens* L.) no estado de Alagoas Aline Marques Melo. – 2015.
 67 f. : il.

Orientador: Gaus Silvestre de Andrade Lima.
Coorientadora: Sarah Jacqueline Cavalcanti da Silva.
Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2015.

Bibliografia: f. 56-67.

1. Begomovírus. 2. Plantas daninhas. 3. Variabilidade genética.
4. Estruturação de população. 5. Euphorbiaceae. I. Título.

CDU: 632.38

ALINE MARQUES MELO

**DIVERSIDADE DE ESPÉCIES E VARIABILIDADE GENÉTICA DE
BEGOMOVÍRUS INFECTANDO CANSANÇÃO (*Cnidoscolus urens* L.)
NO ESTADO DE ALAGOAS**

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós Graduação em Proteção de Plantas, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas. E aprovada em 31 de Agosto de 2015.

Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima – Universidade Federal de Alagoas (Orientador)

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Edna Peixoto da Rocha Amorim – Universidade Federal de Alagoas
(Examinadora)

Dr. Roberto Ramos Sobrinho – Pós-doutorando PNPDI Intitucional /CAPES/ CECA-UFAL
(Examinador)

Rio Largo - AL
2015

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo, por sempre me guiar em todos os momentos da minha trajetória e por dar-me coragem para enfrentar todos os desafios;

Aos meus queridos pais, José Acácio Melo e Georgina Marques, pelo amor, incentivo e apoio em todas as horas;

Aos meus irmãos Clara Marques, Gustavo Marques e George Marques por sempre estarem ao meu lado;

A todos familiares e amigos que contribuíram para meu crescimento;

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

A Dr^a. Sarah Cavalcanti pela amizade, pelos ensinamentos, orientação e apoio durante minha trajetória no mestrado;

Ao Dr. Roberto Ramos e o Dr. Leonardo Barbosa pela amizade e pelos ensinamentos;

Aos meus amigos Lucas Jobim, Mayra Machado, Nayana Bruschi e Janaíne Rossane pelo companheirismo no dia-a-dia, pelos momentos de alegria, aprendizado e por tornarem tudo mais prazeroso;

A todos do Laboratório de Fitopatologia Molecular e Virologia Vegetal: Maria Jussara, Fred, Antônio, Lourdes Regina, Josi, Ana, Tamires, Laura, Jackeline Laurentino, Gilberlan, Daniel, pela amizade, ajuda mútua e ensinamentos durante todo esse período;

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 todos os meus colegas do Programa de Pós-graduação em Proteção de Plantas do CECA-UFAL;

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.

Obrigada!

RESUMO

Doenças causadas por begomovírus (família *Geminiviridae*) são um sério problema para as culturas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, incluindo o Brasil. Begomovirus também estão associados com uma ampla gama de plantas daninhas, as quais são consideradas reservatórios de vírus, bem como fontes de inoculo primário para epidemias em culturas. Foi realizado um levantamento da planta daninha *Cnidocolus urens* (família Euphorbiaceae) no estado de Alagoas. Um total de 34 amostras mostrando sintomas típicos de infecção viral foram coletadas em quatro diferentes áreas do estado de Alagoas. O DNA total foi extraído a partir de cada amostra e genomas virais completos foram amplificados utilizando a DNA polimerase de fago phi29, clonado em vetores plasmidiais e completamente sequenciado. Um total de 21 clones foram obtidos (19 DNA-A e 2 de DNA-B). Comparações de sequências pareadas e análises filogenéticas indicaram a presença de duas novas espécies cujos nomes propostos são: *Cnidocolus mosaic leaf deformation virus* (CnMLDV) e *Cnidocolus severe rugose virus* (CnSRV). As duas novas espécies foram mais relacionadas ao *Passionfruit severe leaf distortion virus* (PSLDV, FJ972767) isolado no estado da Bahia, Brasil. O DNA-A das duas novas espécies apresentou organização genômica típica dos begomovírus bissegmentados do Novo Mundo e mostraram <87% de identidade de sequência entre si. Evidência de recombinação foi encontrada entre isolados de CnMLDV e CnSRV. Os eventos de recombinação foram detectados nos genes *CP*, *Rep* e *REn*, tendo CnMLDV e PSLDV como prováveis parentais. A análise da população do CnMLDV demonstra que a sua variabilidade genética é muito alta. Valores *dN/dS* indicaram que a população CnMLDV pode estar sob a influência de seleção purificadora ou que foi submetida a uma expansão recente, de modo que a ocorrência de mutações não é suficiente para explicar completamente a sua variabilidade genética. Conclui-se que a recombinação, assim como a mutação, são importantes mecanismos evolutivos que atuam sobre a variabilidade genética da população CnMLDV. Os resultados deste estudo indicam que *C. urens* pode desempenhar um papel significativo, tanto como fonte de inóculo quanto como fonte de novos vírus emergentes.

Palavras-chave: Plantas daninhas. Estruturação de população. Euphorbiaceae.

ABSTRACT

Diseases caused by begomoviruses (family *Geminiviridae*) are a serious constraint to cultivated plants in tropical and subtropical regions of the world, including Brazil. Begomoviruses are also associated with a wide range of weeds, which are considered to be begomovirus reservoir as well as primary inoculum sources for epidemics in crops. We have carried out a survey of the weed *Cnidocolus urens* (family Euphorbiaceae) in the state of Alagoas. A total of 34 samples showing typical symptoms of viral infection were collected in four different areas of the Alagoas state. Total DNA was extracted from each sample and complete viral genomes were amplified using the DNA polymerase from phage phi29, cloned into plasmid vectors and completely sequenced. A total of 21 clones we obtained (19 DNA-A and 2 DNA-B). Pairwise sequence comparisons and phylogenetic analysis indicated the presence of two new begomovirus species whose proposed names are: *Cnidocolus* mosaic leaf deformation virus (CnMLDV) and *Cnidocolus* severe rugose virus (CnSRV). The two new species were more related to *Passionfruit severe leaf distortion virus* (PSLDV, FJ972767) isolate from the Bahia state, Brazil. The DNA-A of the two new species had a typical bipartite New World begomovirus genome organization and displayed < 87% sequence identity each other. Evidence of recombination was found among isolates of CnMLDV and CnSRV. The recombination events were detected in the *CP*, *Rep* and *REN* genes, having CnMLDV and PSLDV as the putative parents. Analysis of the CnMLDV population demonstrated that its genetic variability is very high. *dN/dS* values indicated that the CnMLDV population may be under the influence of purifying selection or has undergone a recent expansion, so that the occurrence of mutations is not sufficient to fully explain its genetic variability. It is concluded that recombination, as well as mutation, are important evolutionary mechanisms acting on genetic variability of the CnMLDV population. The findings of this study indicate that *C. urens* can play a significant role, both as inoculum source and as source of emerging novel viruses.

Key words: Weeds. Population structure. Euphorbiaceae.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática do genoma do <i>Bean golden yellow mosaic virus</i> (BGYMV), espécie-tipo do gênero <i>Begomovirus</i>	14
Figura 2 - Replicação via ciclo rolante em geminivírus.....	17
Figura 3 - Matriz bidimensional representando porcentagem de identidade de comparações pareadas de sequências nucleotídicas do DNA-A coletadas nos estados de AL com amostras de begomovírus disponíveis no GenBank.....	32
Figura 4 - Sintomas em <i>Cnidoscolus urens</i> infectadas por dois novos begomovírus.....	33
Figura 5 - Análise filogenética de inferência Bayesiana baseada no DNA-A, mostrando a formação de dois grupos principais.....	38
Figura 6 - Análise filogenética de inferência Bayesiana baseada na ORF <i>CP</i> , mostrando a formação de dois grupos principais.....	39
Figura 7 - Análise filogenética de inferência Bayesiana baseada na ORF <i>Rep</i> , mostrando a formação de dois grupos principais.....	40
Figura 8 - Análise reticulada baseada no DNA-A dos isolados de CnMLDV e CnSRV obtidos neste trabalho, junto com isolados depositados no GenBank.....	44
Figura 9 - Análise reticulada baseada na ORF <i>CP</i> dos isolados de CnMLDV e CnSRV obtidos neste trabalho, junto com isolados depositados no GenBank.....	45
Figura 10 - Análise reticulada baseada na ORF <i>Rep</i> dos isolados de CnMLDV e CnSRV obtidos neste trabalho, junto com isolados depositados no GenBank.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Open reading frames (ORFs), com seus respectivos números de aminoácidos (aa), encontrados no DNA-A e DNA-B das espécies de begomovírus descritas neste trabalho.....	34
Tabela 2 - Amostras de begomovírus provenientes do estado da Alagoas obtidas neste trabalho.....	36
Tabela 3 - Sequências de begomovírus obtidas a partir do banco de dados não-redundante Genbank.....	37
Tabela 4 - Diversidade nucleotídica (π) em CnMLDV no DNA-A, e ORF's <i>CP</i> e <i>Rep</i>	42
Tabela 5 - Eventos de recombinação detectados entre os isolados de CnMLDV e CnSRV obtidos neste trabalho e os begomovírus mais proximamente relacionados acessados do Genbank.....	47
Tabela 6 - Sítios selecionados positiva e negativamente nas ORFs <i>CP</i> e <i>Rep</i> da população de CnMLDV.....	50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1	A família <i>Geminiviridae</i>	11
2.2	Organização genômica dos Begomovirus	13
2.3	Replicação Viral	15
2.4	Variabilidade e estrutura genética de populações de begomovirus	18
2.4.1	Mutação	18
2.4.2	Recombinação	19
2.4.3	Pseudorecombinação	20
2.5	Diversidade de begomovirus infectando plantas cultivadas e plantas não-cultivadas no Brasil	22
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	Coleta do material vegetal	28
3.2	Clonagem e sequenciamento do genoma completo de begomovirus	28
3.3	Análise de sequências e demarcação de espécies	29
3.4	Análise filogenética	29
3.5	Estrutura genética e índices de variabilidade	29
3.6	Análises de recombinação	30
3.7	Análise de seleção	30
4	RESULTADOS	31
4.1	Análises de sequências e demarcação de espécie	31
4.2	Análises Filogenéticas	35
4.3	Estrutura genética e índices de variabilidade	41
4.4	Análise de Recombinação	43
4.5	Análise de seleção	49
5	DISCUSSÃO	51
6	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

Os vírus pertencentes à família Geminiviridae possuem genoma constituído por DNA circular de fita simples, encapsidados por uma proteína estrutural que confere à partícula viral uma forma icosaédrica geminada (STANLEY et al., 2005). Essa família é formada pelos gêneros *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus* (VARSANI et al., 2014). Os begomovírus são compostos por um ou dois componentes genômicos (DNA-A e DNA-B), são transmitidos pela mosca-branca *Bemisia tabaci* e infectam plantas dicotiledôneas. No DNA-A encontram-se os genes envolvidos na replicação e encapsidação do genoma viral, enquanto no DNA-B encontram-se os genes responsáveis pelos movimentos intra e intercelular do vírus (LAZAROWITZ, 1992). No Brasil, o feijoeiro e o tomateiro são as principais culturas afetadas por begomovírus. Em feijão as perdas podem chegar a 100% e em tomate a redução chega a 60% na produtividade (QUINTELA et al., 2008; MORALES; ANDERSON 2001; GIORDANO et al., 2005).

Além de infectarem plantas cultivadas, os begomovírus também podem infectar hospedeiros não-cultivados, principalmente aqueles pertencentes às famílias Malvaceae, Euphorbiaceae e Fabaceae (MORALES; ANDERSON, 2001). Estudos demonstraram que begomovírus provenientes de plantas não-cultivadas podem ser transmitidos para espécies cultivadas através do inseto vetor (CASTILLO-URQUIZA et al., 2007; COTRIM et al., 2007).

A diversidade genética dos begomovírus que infectam plantas cultivadas e/ou não-cultivadas no Brasil é alta (AMBROZEVICIUS et al., 2002; CALEGARIO, 2004; CASTILLO-URQUIZA, 2008; LIMA et al., 2013; ROCHA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014) podendo ser resultante de eventos de recombinação e pseudorecombinação entre os begomovírus em infecções mistas (AMBROZEVICIUS, et al, 2002, ZHOU et al., 1997; FONDONG et al., 2000). Devido à ocorrência desses eventos, é de fundamental importância conhecer a estrutura e a diversidade genética das populações de begomovírus para compreender as interações vírus/vetor/hospedeiros (GARCIA-ARENAL; FRAILE; MALPICA, 2003; ROOSSINCK, 1997). Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo determinar a diversidade de espécies e variabilidade genética de begomovírus infectando cansanção (*Cnidoscolus urens* L.) no estado de Alagoas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A família *Geminiviridae*

A família *Geminiviridae* é considerada uma das mais importantes e numerosas famílias de vírus que infectam plantas, incluindo vírus com genoma de DNA fita simples (ssDNA) circular envoltos por um capsídeo icosaédrico geminado, transmitidos a plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas via cigarrinha ou mosca-branca (BROWN et al., 2012; VARSANI et al., 2014). Esta família contém mais de 325 espécies, distribuídas com base no tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros, organização genômica e relacionamento filogenético em sete gêneros: *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus* (VARSANI et al., 2014). Recentemente, foi proposta a inclusão de um oitavo gênero, *Capulavirus*, para abrigar três geminivírus altamente divergentes. Estes não possuem vetor conhecido, exceto a espécie Alfafa leaf curl virus, a qual pode ser transmitida por *Aphis craccivora*, consistindo no primeiro relato da transmissão de um geminivírus por afídeo (ROUMAGNAC et al, 2015).

O gênero *Mastrevirus*, espécie tipo *Maize streak virus*, inclui os geminivírus com um componente genômico, transmitidos para plantas monocotiledôneas por diversas cigarrinhas (Homoptera: Cicadellidae). O gênero *Curtovirus* contém os geminivírus com único componente genômico, transmitidos por diversas cigarrinhas (Homoptera: Cicadellidae) a plantas dicotiledôneas. O *Beet curly top virus* (BCTV) é a espécie-tipo. O gênero *Topocuvirus* também apresenta um componente genômico e tem como única espécie, o *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV), transmitida pela cigarrinha *Micrutalis malleifera* (Homoptera: Auchenorrhyncha) a plantas dicotiledôneas (STANLEY et al., 2005). O gênero *Becurtovirus* possui um componente genômico e tem como espécie tipo o *Beet curly top Iran virus* (BCTIV), transmitido pela cigarrinha *Circulifer haematoceps* (Cicadellidae), existente no Mediterrâneo e Oriente Médio. O gênero *Turncurtovirus* possui um único componente genômico e uma única espécie, o *Turnip curly top virus* (TCTV), também transmitida pela cigarrinha *Circulifer haematoceps*. Este difere dos becurtovírus na gama de espécies hospedeiras e organização genômica. O gênero *Eragrovirus* possui uma única espécie descrita, o *Eragrostis curvula streak virus* (ECSV), que também contém um componente genômico, no entanto até o presente momento nenhum inseto vetor foi associado ao processo de transmissão (VARSANI et al., 2014).

Dentre os membros de *Geminiviridae*, destaca-se o gênero *Begomovirus*, com mais de 200 espécies atualmente reconhecidas (BROWN et al., 2015). Este gênero possui espécies com um componente (monossegmentados) ou dois componentes (bissegmentados) genômicos, transmitidas pelo inseto vetor *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) para plantas dicotiledôneas (STANLEY et al., 2005; FARIA et al., 2000) e tem como espécie tipo o *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) (FAUQUET et al., 2008).

Os begomovírus são considerados emergentes, devido à alta incidência e severidade das doenças que causam em diversas culturas de importância econômica nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (MORALES, ANDERSON, 2001; MORALES, 2006). São exemplos de doenças emergentes que ocorrem mundialmente: o enrolamento foliar do tomateiro na Europa e Bacia do Mediterrâneo, causado pelo complexo *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV); o mosaico da mandioca na África, causado pelas espécies *African cassava mosaic virus* (ACMV) e *East African cassava mosaic virus* (EACMV); o enrolamento foliar do algodoeiro na Ásia, causado pelo complexo *Cotton leaf curl virus* (CLCuV) e as doenças de tomateiro no Brasil, causada por um complexo de diferentes espécies de begomovírus (NAVAS-CASTILO, FIALO-OLIVÉ, SÁNCHEZ-CAMPOS, 2011).

Os sintomas dos begomovírus em plantas são muito variáveis, pois dependem da planta hospedeira, da fase da cultura em que ocorre a infecção e a espécie viral. Entretanto, os sintomas mais frequentes são mosaico amarelo, deformação do limbo foliar, nanismo, entre outros (PICÓ et al., 1996; MORALES; ANDERSON, 2001).

Os begomovírus podem ser distribuídos geograficamente em dois grupos: os do “Velho Mundo” e os do “Novo Mundo”. Os begomovírus do “Velho Mundo” são encontrados na Europa, Ásia, África e Austrália, em sua maioria monossegmentados e frequentemente associados a moléculas de ssDNA circular denominadas, DNA satélites. Os DNA satélites pertencem a duas diferentes classes: alfassatélites (DNA-1) e betassatélites (DNA β) (BRIDDON, 2003; BRIDDON, STANLEY, 2006), os quais podem atuar em funções essenciais para o vírus auxiliar, como ocorre no DNA-B dos begomovírus bissegmentados (ROJAS et al., 2005).

Os betassatélites contêm uma ORF que codifica uma proteína responsável pela indução de sintomas e que atua como supressora do silenciamento gênico pós-transcricional (CUI et al., 2004; CUI et al., 2005; BRIDDON; STANLEY, 2006). Os alfassatélites contêm uma ORF que codifica uma proteína associada à replicação (Rep), seguida de uma região rica em adenina e uma estrutura em forma de grampo que inclui a origem de replicação (IDRIS et

al., 2003). Os alfassatélites são capazes de replicar autonomamente, porém requerem um vírus auxiliar para infecção sistêmica da planta e transmissão por inseto (SAUNDERS; STANLEY, 1999; SAUNDERS et al., 2000; SAUNDERS; BEDFORD; STANLEY, 2002).

Já os begomovírus do “Novo Mundo” são encontrados nas Américas, na sua maioria, bissegmentados (dois componentes genômicos – DNA-A e DNA-B) com aproximadamente 2,6 Kb cada (Figura 1). O DNA-A e o DNA-B só possuem uma única região com identidade entre as sequências, denominada Região Comum (RC) (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999). Recentemente foi encontrada uma espécie de begomovírus, o *Tomato leaf deformation virus* (ToLDeV), que não possui o componente DNA-B causando sintomas associados ao “Tomato leaf curl disease” (ToLCD) no Peru e Equador. Este consistiu no primeiro relato de um begomovírus monossegmentado nativo do Novo Mundo (MELGAREJO et al., 2013; SÁNCHEZ-CAMPOS et al., 2013). Também foi demonstrada a ocorrência de DNAs alfassatélites não é exclusiva do “Velho Mundo”. Estes foram descritos no “Novo Mundo” associados aos begomovírus bissegmentados *Cleome leaf crumple virus* (CILCrV), *Euphorbia mosaic virus* (EuMV) e *Melon chlorotic mosaic virus* (MeCMV) (PAPROTKA; METZLER; JESKE, 2010b; ROMAY et al., 2010).

2.2 Organização genômica dos *Begomovirus*

A maioria dos begomovírus das Américas possuem dois componentes genômicos (DNA-A e DNA-B) que são encapsidados separadamente em partículas icosaédricas geminadas. Ambos os componentes virais são necessários para o desenvolvimento de infecção sistêmica na hospedeira. Os DNA-As e DNA-Bs cognatos, possuem uma região conservada (RC) com aproximadamente 200pb, a qual compartilha acima de 90% de identidade de sequência (LAZAROWITZ, 1992; LAZAROWITZ et al., 1992; FONTES et al., 1994b). A RC abriga uma sequência de nove nucleotídeos (5'-TAATATT↓AC-3'), chamada de nonanucleotídeo, que está presente em todos os geminivírus e onde se situa a origem de replicação viral (OROZCO; HANLEY-BOWDOIN, 1996).

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 4 são transcritas no sentido complementar (FARIA, ZERBINI, 2000), com estes genes sendo responsáveis pela replicação e encapsidação viral. Já no DNA-B, estão localizados os genes responsáveis pelo movimento do vírus no hospedeiro (célula-a-célula e a longa distância), codificando as

proteínas: *NSP* (“nuclear shuttle protein” ou BV1) no sentido viral, e *MP* (“movement protein” ou BC1) no sentido complementar (Figura 1; TIMMERMANS, DAS, MESSING, 1994; BROWN, 1997; FARIA et al., 2000).

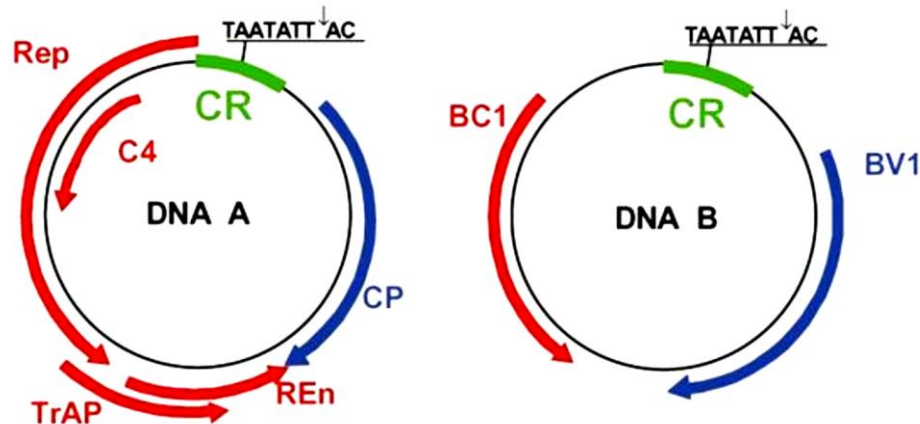


Figura 1. Representação esquemática do genoma do *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV), espécie-tipo do gênero *Begomovirus*. Os círculos representam o genoma viral, com dois componentes (DNA-A e DNA-B) de aproximadamente 2.600 nucleotídeos cada. Uma sequência de aproximadamente 200 nucleotídeos, 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 degradação e é fundamental para a transmissão e determina a especificidade do vírus pelo inseto vetor (BRIDDON et al., 1990; HÖFER et al., 1997a).

A proteína *Rep* é fundamental para a replicação do ssDNA viral no núcleo da célula hospedeira iniciando a replicação por círculo rolante (GUTIERREZ, 1999). 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 nos promotores de genes de sentido viral (*CP* e *NSP*). Logo, os transcritos desses genes só irão estar presentes na célula após a expressão da *TrAP* (SUNTER, BISARO, 1992). Outra possível função desta proteína é 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* é um fator acessório da replicação viral (PEDERSEN; HANLEY-BOWDOIN, 1994). Logo, mesmo não sendo uma proteína fundamental para a replicação,

quando ela está presente ocorre um maior acúmulo de DNA viral na célula hospedeira (ZERBINI; CARVALHO; MACIEL-ZAMBOLIM, 2000). Este evento pode ser explicado devido ao fato de que a REn pode aumentar a afinidade da proteína Rep na origem de replicação (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999). Mesmo esta proteína não sendo fundamental para a ocorrência de sintomas, mutações em seus genes podem estar relacionadas com o retardamento ou atenuação destes (ELMER et al., 1988; ETESSAMI et al., 1991).

A proteína *C4* é uma supressora de silenciamento gênico (VANITHARANI et al., 2004), podendo determinar a severidade dos sintomas (JUPIN et al., 1995). Estudos realizados com *African cassava mosaic virus* (ACMV) e *Sri Lanka cassava mosaic virus* (SLCMV) demonstram que esta proteína está envolvida na supressão do silenciamento gênico pós-transcricional em plantas (VANITHARANI et al., 2004).

O componente DNA-B dos begomovírus codifica para duas proteínas: uma no sentido viral (*MP*), relacionada com o movimento célula-a-célula do vírus por meio do aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas; e outra no sentido complementar (*NSP*), responsável pelo transporte do DNA através do envelope nuclear (FARIA; ZERBINI, 2000; ZERBINI; CARVALHO; MACIEL-ZAMBOLIM, 2000), realizando o transporte do vírus replicado no núcleo de célula hospedeira para seu citoplasma (PALMER; RYBICKI, 1998). Ou seja, essas duas proteínas atuam de forma a mediar o tráfego intra e intercelular do DNA viral (SANDERFOOT; LAZAROWITZ, 1995), proporcionando ao vírus infectar sistematicamente a planta.

2.3 Replicação viral

A primeira etapa do processo de infecção dos geminivírus é a entrada das partículas virais na planta por meio da inoculação pelo inseto vetor. Uma vez o vírus dentro da planta ele irá se desassociar de forma espontânea do capsídeo e será transportado até o núcleo da célula hospedeira, onde ocorrerá a replicação do vírus (LAZAROWITZ, 1992; PALMER; RYBICKI, 1998). Dentro do núcleo celular o ssDNA é convertido em um intermediário de fita dupla (dsDNA) chamado de Forma Replicativa (FR). Não se sabe ao certo, mas essa conversão ocorre provavelmente por meio de fatores do hospedeiro (STENGER et al., 1991; STANLEY, 1995; ZERBINI; CARVALHO; MACIEL-ZAMBOLIM, 2000). A FR vai se acumulando dentro da célula e serve como molde para a síntese de novos componentes genômicos e na transcrição dos genes virais. A replicação desses vírus ocorre via mecanismo

de círculo rolante, semelhante ao utilizado pelos bacteriófagos ϕ X174 e M13 (Figura 2; STENGER et al., 1991; STANLEY, 1995).

A localização da origem de replicação (*ori*) é na RC dos dois componentes genômicos. Neste local, existe uma sequência conservada em forma de grampo (“structurally conserved element”, SCE) chamada de nonanucleotídeo, encontrada em todos os geminivírus e que constitui o domínio funcional da origem de replicação (HEYRAUD-NITSCHKE et al., 1995; OROZCO; HANLEY-BOWDOIN, 1998). É nesse nonanucleotídeo que ocorre a clivagem (TAATATT↓AC) do dsDNA e que se inicia a replicação viral por círculo rolante (FONTES et al., 1994; LAUFS et al., 1995). A replicação ocorre de forma similar, independente do componente genômico, ou seja, 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 região comum é realizada pela Rep. Nessa região se encontra uma sequência específica para a 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). A partir do momento em que Rep é ligada ao DNA viral e ocorre a estabilização do complexo formado por Rep, *REn* e fatores do hospedeiro se inicia a replicação por círculo rolante (GUTIERREZ, 1999). O reconhecimento pela proteína Rep é considerado vírus-específico (HARRISON; ROBINSON, 1999; RAMOS et al., 2003). O último estágio é a produção e a encapsidação do ssDNA genômico circular maduro em partículas virais (GUTIERREZ, 1999).

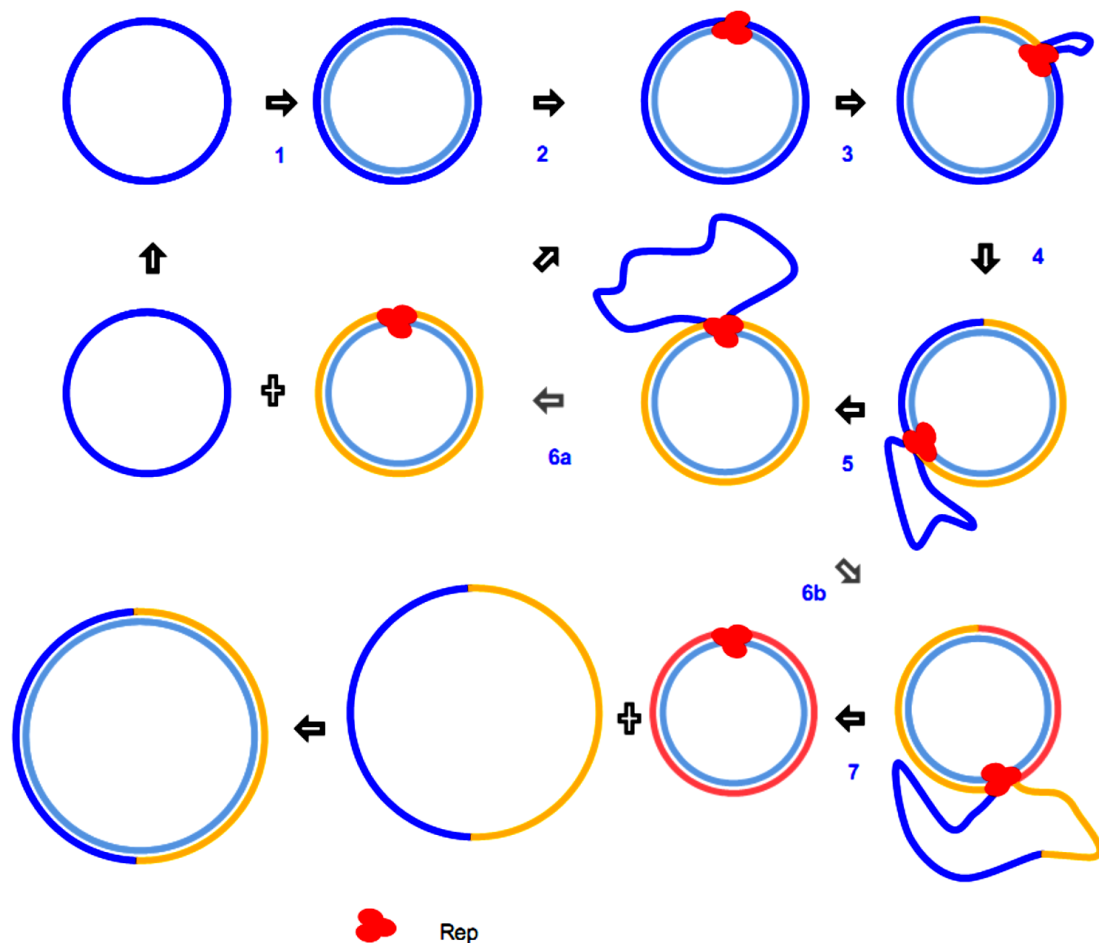


Figura 2. Replicação via ciclo rolante em geminivírus. ssDNA circular viral (em azul) é convertida em dsDNA pela DNA polimerase da hospedeira (passo 1). A Rep (em vermelho) é expressa e se associa aos sítios de ligação na origem de replicação (passo 2). À medida que a replicação ocorre a fita de DNA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

Apesar a replicação por círculo rolante ser a principal forma de replicação dos geminivírus, existe outro mecanismo para que a replicação ocorra, conhecido como Replicação Dependente de Recombinação (RDR), que foi sugerido com base na identificação de intermediários de replicação viral do *Abutilon mosaic virus* (AbMV) que não poderiam ser explicados pelo mecanismo de círculo rolante (JESKE et al., 2001). Estudos posteriores 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.

2.4 Variabilidade e estrutura genética de populações de begomovírus

A estrutura genética de populações de vírus de plantas refere-se à quantidade e à distribuição da variabilidade genética dentro e entre subpopulações (GARCÍA-ARENAL et al., 2001). Definir a estrutura genética é o primeiro passo para se estudar as populações virais, pois a estrutura genética reflete a história evolutiva e o potencial da população para evoluir (PINEL et al., 2003; MORENO et al., 2004; FONT et al., 2007). Populações de geminivírus, incluindo os begomovírus, possuem um elevado grau de diversidade genética e a sua análise é de fundamental importância para melhor compreender a evolução do vírus e sua interação com a planta hospedeira. Eventos de mutação, recombinação e pseudorecombinação são as principais fontes de variabilidade genética de vírus em plantas (GARCÍA-ARENAL; FRAILE; MALPICA, 2003; SEAL; VAN DEN BOSCH; JEGER, 2006). Esta diversidade acaba gerando oportunidades para que os vírus se adaptem a novos hospedeiros e a mudanças nas condições ambientais (ROOSSINCK, 1997).

2.4.1 Mutação

A evolução de todos os vírus, assim como para os geminivírus, depende primariamente de mutações (HARKINS et al., 2009). Mutações são alterações na molécula de DNA por meio de substituições em pares de bases, e tais substituições originam mutações pontuais. O impacto das mutações pontuais tem sido estudado nesse grupo de vírus sob diferentes condições de seleção, como presença de um efeito gargalo, transferências sucessivas entre hospedeiros sem emprego do vetor, e inoculação de plantas resistentes (ISNARD et al., 1998).

Duffy e Holmes (2009) realizaram análises estruturadas no tempo de 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 mais uma rápida dinâmica mutacional do que uma frequência de evolução adaptativa. Contudo, validaram esses altos níveis de heterogeneidade apenas para o DNA-A e a ORF AV1. Foi observado então que a taxa de evolução indicada para essa espécie

de begomovírus, entre 10^{-3} e 10^{-5} , corroboram em geral aquelas determinadas experimentalmente para *Mayze streak virus* (MSV) e *Tomato yellow leaf curl China virus* (TYLCCNV) (GE et al., 2007; HARKINS et al., 2009). Dados obtidos por Rocha e colaboradores (2013), analisando begomovírus brasileiros bipartidos, mostraram altas frequências de mutação, e que as regiões do genoma que apresentam maiores valores são da região intergênica e do gene *CP*.

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

2.4.2 Recombinação

Recombinação é o processo pelo qual segmentos de uma fita de DNA ou RNA tornam-se incorporados na fita de um indivíduo diferente durante o mecanismo de replicação (PADIDAM; BEACHY; FAUQUET, 1999). Além de exercer um papel vital na manutenção e na reparação das moléculas de DNA (CROMIE et al., 2001), a recombinação é evolutivamente importante, uma vez que defende o genoma do acúmulo de mutações deletérias (KEIGHTLEY; OTTO, 2006). Portanto, ao permitir o surgimento de novas combinações genéticas, a recombinação, mais do que reverter as consequências dessas mutações deletérias, também fornece ao organismo opções evolutivas que apenas através de mutações não seriam possíveis (CRAMERI et al., 1998). Este evento é bastante comum em geminivírus (PADIDAM; BEACHY; FAUQUET, 1999) e parece contribuir grandemente para a diversificação genética dos begomovírus aumentando seu potencial evolutivo e adaptação local (MONCI et al., 2002). É provável que esse mecanismo esteja diretamente relacionado ao 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).

A recombinação destaca-se como um dos mais importantes mecanismos evolutivos em begomovírus (LEFEUVRE et al., 2007, LIMA et al., 2013; MARTIN et al., 2011) sendo responsável pela alta variabilidade genética observada em populações de begomovirus que infectam plantas não-cultivadas (LIMA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Já quando se trata de plantas cultivadas, eventos de recombinação têm sido diretamente

implicados na emergência 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* (TYLCMalV) 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).

Três fatores podem contribuir significativamente para a ocorrência de eventos de recombinação. Primeiro, infecções mistas, um pré-requisito para que eventos de recombinação ocorram (PADIDAM et al., 1995; UMAHARAN et al., 1998). Segundo, estes vírus replicam via “forma replicativa” dsDNA produzindo um grande número de cópias do genoma. Terceiro: o biótipo B de *B. tabaci* é um inseto polífago e apresenta um alto grau de adaptação e dispersão (BEDFORD et al., 1994). Como resultados, têm-se recombinações virais e observação de novas plantas hospedeiras sendo infectadas.

Os mecanismos precisos que controlam a recombinação em begomovírus permanecem desconhecidos (PADIDAM; BEACHY; FAUQUET, 1999). No entanto, é conhecido que sítios recombinantes não são uniformemente distribuídos ao longo do genoma com a existência de 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). Análises de bioinformática para detectar vírus recombinantes ocorrendo naturalmente revelaram que a origem de replicação viral é um sítio frequente de recombinação (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999). A comparação de sequência de begomovírus mono e bissegmentados depositadas no GenBank até maio de 2006 (123 e 116 sequências, respectivamente) indicou que a região do gene *Rep* que codifica a porção N-terminal da proteína Rep, assim como a região intergênica adjacente (RC) são frequentemente intercambiadas durante a replicação. Também foram identificados sítios frequentes de recombinação localizados na região intergênica entre os genes *CP* e *Ren* (LEFEUVRE et al., 2007).

2.4.3 Pseudorecombinação

A existência de dois componentes genômicos na maioria dos begomovírus promove um mecanismo alternativo, conhecido como pseudorecombinação, pelo qual a troca de

material genético pode ocorrer sem necessidade de recombinação intermolecular, ocorrendo apenas a troca de componentes genômicos entre dois vírus distintos (SUNG; COUTTS, 1995; ANDRADE et al., 2006). A formação de pseudorecombinantes viáveis entre espécies distintas é mais difícil, sendo mais comum a pseudorecombinação 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 demonstram 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. Contudo, esse não foi o caso para outro pseudorecombinante viável formado entre o DNA-A de *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) e o DNA-B de ToYSV, os quais possuem a sequência do sítio de ligação da Rep diferente. Estes resultados reforçam a idéia que a formação de pseudorecombinantes viáveis não se baseia apenas nas relações filogenéticas e nas sequências conservadas dos iterons.

Entretanto, especificidade da ligação da proteína Rep aos iterons é considerada a principal determinante da formação de pseudo-recombinantes viáveis entre diferentes espécies/estirpes de begomovírus (ARGÜELLO-ASTORGA et al., 1994; 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 iterons (ARGUELLO-ASTORGA; RUIZ-MEDRANO, 2001; RUIZ-MEDRANO; XOCONOSTRE-CAZARES; LUCAS, 2001).

2.5 Diversidade de *Begomovirus* infectando plantas cultivadas e plantas não-cultivadas no Brasil

Desde os anos 80, begomovírus têm emergido como um dos principais patógenos de plantas, particularmente nas regiões tropicais e subtropicais no mundo, causando severas perdas econômicas (MORALES, 2006). No Brasil, as culturas mais severamente afetadas são o feijoeiro e tomateiro (FARIA; MAXWELL, 1999; ZERBINI et al., 2005). Embora existam relatos de infecção por begomovírus em outras culturas importantes como a soja (*Glycine max*) (MELLO; ALMEIDA; ZERBENI, 2000; MELLO et al., 2002) e o pimentão (*Capsicum annum*) (NOZAKI et al., 2005), esses ocorrem esporadicamente nas áreas de cultivo, não sendo considerados fatores limitantes à produção.

Begomovírus que infectam feijoeiro (*Phaseolus* spp.) são distribuídos através das Américas, constituindo um fator limitante para a produtividade dessa cultura. A diversidade genética de begomovírus que infectam feijoeiro é baixa, com apenas quatro espécies descritas: *Bean calico mosaic virus* (BcaMV), *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV), *Bean golden mosaic virus* (BGMV), *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) e *Macroptilium yellow spot virus* (MaYSV) (FAUQUET et al., 2008; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014).

De acordo com Faria e Maxuell (1999), a espécie BGMV apresentam um baixo grau de variabilidade genética, o que não é comum para begomovírus. Um estudo recente sobre a estrutura genética de BGMV, indicaram que a variabilidade é maior nas *P. lunatus* do que *P. vulgaris*, e que as populações desse vírus estão estruturadas de acordo com a região geográfica e hospedeira (RAMOS-SOBRINHO et al., 2014).

Contrastando com as frequentes ocorrências de BGMV em feijoeiro, as infecções de begomovírus em soja são esporádicas principalmente na região Centro-Oeste do país, portanto

BGMV não tem importância econômica para esta espécie (MELLO et al., 2002; FERNANDES et al., 2009);

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

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

Levantamentos realizados para acessar a diversidade de begomovírus em tomateiro indicam que determinadas espécies tornaram-se prevalentes em diferentes regiões do país (CASTILLO-URQUIZA et al., 2007; COTRIM et al., 2007; CASTILLO-URQUIZA, 2008; FERNANDES et al., 2008). O sequenciamento direto de fragmentos de PCR de amostras de tomateiro coletadas na região central do estado de São Paulo nos anos de 2003 e 2004 revelou como espécie predominante o ToRSV, presente em 50% das amostras analisadas. O ToYVSV e o SiMoV também estavam presentes (COTRIM et al., 2007). A mesma estratégia foi

utilizada para identificar begomovírus em amostras de tomateiro coletadas entre 2002 e 2004 no Distrito Federal e nos estados da Bahia, Goiás, Minas Gerais, Pernambuco e São Paulo. Verificou-se a presença do ToSRV em 61% das amostras, além do ToYVSV, Tomato mottle leaf curl virus (ToMoLCV) e duas possíveis novas espécies (FERNANDES et al., 2008).

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

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

Três observações corroboram essa hipótese. Em primeiro lugar, todas as espécies de begomovírus detectadas até o presente em tomateiro no Brasil são de ocorrência restrita ao país. Em segundo lugar, a caracterização biológica de algumas espécies (ToRMV, ToCMoV e ToYSV) confirmou que plantas daninhas como *Nicandra physaloides*, *Solanum nigrum* e *Datura stramonium* são hospedeiras (FERNANDES et al., 2006; CALEGARIO et al., 2007; RIBEIRO et al., 2007). Por fim, begomovírus originalmente encontrados em plantas silvestres/daninhas, como o SiMoV e o SimMV, já foram encontrados infectando naturalmente o tomateiro (CASTILLO-URQUIZA et al., 2007; COTRIM et al., 2007).

A presença de diversas espécies no campo, todas transmitidas pelo mesmo inseto vetor, torna comum a ocorrência de infecções mistas, com dois ou mais vírus presentes simultaneamente na mesma planta, aumentando a probabilidade da ocorrência de eventos de recombinação e pseudo-recombinação, o que pode levar ao surgimento de espécies melhor adaptadas ao hospedeiro (PITA et al., 2001; MONCI et al., 2002; ANDRADE et al., 2006a; INOUE-NAGATA et al., 2006; RIBEIRO et al., 2007). Evidências de recombinação e pseudo-recombinação já foram encontradas em associação ao complexo de begomovírus infectando o tomateiro no Brasil. Galvão et al. (2003) e Ribeiro et al. (2007) sugeriram que os isolados MG-Bt1 e BA-Se1 do ToCMoV possuem origem recombinante. A formação de

pseudo-recombinantes viáveis entre clones infecciosos do TGMV (DNA-A) e ToYSV (DNA-B), e entre o ToYSV (DNA-A) e o Tomato crinkle leaf yellow virus (ToCrLYV), já foi demonstrada (ANDRADE et al., 2006a). Além disso, foi sugerida a presença de um pseudo-recombinante ocorrendo naturalmente entre o ToRMV e um novo vírus (FERNANDES et al., 2006).

PAPROTKA et al. (2010a) estudaram a diversidade genética de begomovírus presentes em acessos de batata-doce naturalmente infectados no Banco de Germoplasma brasileiro. Nesse estudo foram identificadas duas novas espécies, Sweet potato golden vein-associated virus (SPGVaV) e Sweet potato mosaic-associated virus (SPMaV), além de três novos isolados e vários variantes do *Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV). A comparação de sequências dos begomovírus encontrados nesses acessos revelou a presença de “footprints” de recombinação em seus genomas, ressaltando o risco do surgimento de novos begomovírus no material propagado vegetativamente no Banco de Germoplasma.

Além das plantas cultivadas, muitas espécies silvestres e/ou invasoras têm sido relatadas como hospedeiras de begomovírus em vários países, incluindo o Brasil (IDRIS et al., 2003; JOVEL et al., 2004; VARSANI et al., 2009; FIALLO-OLIVE et al., 2010; MUBIN et al., 2010). As espécies comumente relatadas como hospedeiras pertencem às famílias Malvaceae, Euphorbiaceae e Fabaceae (MORALES; ANDERSON, 2001). Alguns estudos demonstraram que begomovírus provenientes de plantas invasoras podem ser transmitidos para espécies cultivadas pelo inseto vetor ou mediante inoculação via extrato vegetal tamponado (FRISCHMUTH et al., 1997; FARIA et al., 2000; MORALES; ANDERSON, 2001; CASTILLO-URQUIZA et al., 2007; COTRIM et al., 2007).

No Brasil, já se realizaram estudos com o objetivo de caracterizar molecularmente isolados de begomovírus que infectam plantas silvestres e daninhas, sobretudo em associação às culturas do feijoeiro e do tomateiro (RIBEIRO et al., 1998; FARIA; MAXWELL, 1999; CASTILLO-URQUIZA et al., 2008). Os resultados desses estudos revelaram que, a exemplo do que ocorre com plantas cultivadas, a diversidade genética é alta entre os isolados de begomovírus que infectam plantas invasoras (AMBROZEVICIUS et al., 2002; CALEGARIO, 2004; CASTILLO-URQUIZA, 2008).

Costa e Bennett (1950) descreveram um vírus induzindo sintomas de mosaico em plantas de *Euphorbia prunifolia* (Euphorbiaceae) no Brasil, o qual era transmitido por mosca-branca (*Bemisia tabaci*), contudo a identificação foi feita apenas a partir dos sintomas, dadas as condições tecnológicas disponíveis na época. O agente etiológico descrito por Costa e Bennet em 1950 foi caracterizado alguns anos depois como pertencendo ao grupo dos

geminivírus (JARAMILLO; LASTRA, 1986) e identificado como *Euphorbia mosaic virus* (EuMV).

Em 2011, foi realizada caracterização molecular de um begomovírus infectando *Euphorbia heterophylla*, o qual apresentou porcentagem de identidade de 87% com o DNA-A da espécie *Euphorbia mosaic Peru virus* (EuMPV), e 56,2% de identidade com a espécie do EuMV isolado no México, sendo portanto considerado como uma espécie nova: *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV); (FERNANDES et al., 2011). A maioria dos isolados de EuYMV descritos até o momento indicam que esta é a única espécie de begomovírus da família Euphorbiaceae no Brasil que teve seu genoma completamente determinado. Essa espécie já foi relatada infectando naturalmente *Macroptilium atropurpureus*, *Sida santaremensis*, *Crotalaria juncea* e *Solanum lycopersicus* no Brasil (BARRETO et al, 2013; TAVARES et al, 2012; SILVA et al, 2011). Apesar desse vírus não ter sido descrito causando problemas econômicos em plantas cultivadas, essa ampla gama de hospedeiros (incluindo o tomateiro, uma espécie plantada em todo Brasil) indica que EuYMV pode vir a se tornar um problema fitossanitário no país.

Outro representante de planta daninha da família Euphorbiaceae que foi detectado begomovírus é *Cnidocolus urens*, conhecida popularmente como cansaço. É uma planta herbácea que tem como importante característica a presença de tricomas urticantes em quase todas as suas partes vegetativas e florais, os quais, quando tocados, provocam fortes dores localizadas, urticárias e até, em raros casos, desmaios (MUENSCHER, 1958; MELO, SALES, 2008).

Estudos realizados em plantas daninhas de *Cnidocolus urens* (Euphorbiaceae), *Cleome affinis* (Capparaceae), *Desmodium* sp., *Macroptilium lathyroides* (Fabaceae), *Herissantia crispa*, *Sidastrum micranthum*, *S. rhombifolia*, *Sida spinosa* (Malvaceae), *Triumfetta semitriloba* e *Waltheria indica* (Sterculiaceae), apresentando sintomas de mosaico amarelo, deformação do limbo foliar e redução do crescimento (ASSUNÇÃO et al., 2006) confirmaram a presença de infecção por begomovírus, utilizando-se a técnica de Amplificação em Cadeia da Polimerase (PCR). Padrões distintos de clivagem obtidos em análise de PCR-RFLP sugeriram a existência de um alto grau de variabilidade genética (ASSUNÇÃO et al., 2006). Entretanto, as espécies de begomovírus infectando estas plantas não foram identificadas.

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

(*Blainvillea yellow spot virus*, BIYSV), *Sida rhombifolia* (*Sida yellow mosaic virus*, SiYMV) e *Sida micrantha* (*Sida common mosaic virus*, SiCmMV).

Um novo begomovírus, *Abutilon mosaic Brazil virus* (AbMBV), foi identificado infectando *Abutilon* sp. no estado da Bahia. Análises filogenéticas demonstraram que ambos os componentes genômicos são distintos da espécie clássica, *Abutilon mosaic virus* (ABMV) originária do oeste da Índia. (PAPROTKA, METZLER, JESKE, 2010).

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

A caracterização molecular de begomovírus associados a *Sida* spp. revelou a presença de quatro novas espécies infectando essa hospedeira: *Sida yellow blotch virus* (SiYBV), *Sida yellow net virus* (SiYNV), *Sida mottle Alagoas virus* (SiMoAV) e *Sida yellow mosaic Alagoas virus* (SiYMAV). Esses resultados, reforçam a hipótese que a diversidade de espécies de *Sida* é bastante elevada (TAVARES et al., 2012)

Estudos sobre a diversidade de espécies e variabilidade genética de populações de leguminosas invasoras no Nordeste do Brasil, evidenciou a presença de quatro novas espécies: *Centrosema yellow spot virus* (CenYSV), *Macroptilium yellow vein virus* (MaYVV), *Macroptilium yellow net virus* (MaYNV) e *Macroptilium yellow spot virus* (MaYSV). A espécie MaYSV, apresenta uma alta variabilidade genética, sendo capaz de infectar diversas hospedeiras daninhas (*Macroptilium lathyroides*, *Calopogonium mucunoides*, *Canavalia* sp.) e cultivadas como feijoeiro (*P. vulgaris*) e fava (*P. lunatus*). MaYSV está amplamente disseminado na região Nordeste do país e é capaz de infectar eficientemente o feijoeiro e fava, substituindo as populações nativas de BGMV, sendo a espécie predominantemente encontrada nessa cultura em Alagoas (RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). MaYSV constitui uma ameaça para produção de feijoeiro no Brasil, pelo potencial de quebrar de resistência de uma cultivar geneticamente modificada via RNA interference que é resistente a doença mosaico dourado do feijoeiro causado pelo BGMV. Portanto esforços estão sendo realizados para impedir sua disseminação para outras regiões do país.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta do material vegetal

Amostras foliares de cansação (*Cnidoscolus urens*) apresentando sintomas indicativos de infecção por begomovírus (amarelecimento, mosaico, deformação foliar e nanismo) foram coletadas no estado da Alagoas (AL) em maio de 2015. 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 do genomas virais completos via círculo rolante na presença da enzima DNA polimerase do bacteriófago phi29, de acordo com método descrito por Inoue-Nagata et al. (2004). Alíquotas das reações de amplificação foram submetidas, individualmente, a clivagens com enzimas de restrição (*ApaI*, *BamHI*, *HindIII*, *SacI* e *KpnI*) 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 DH5α 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 espécies

Sequências nucleotídicas correspondentes aos componentes genômicos virais (DNA-A e DNA-B) completos foram montadas utilizando-se o programa *CodonCode Aligner* v. 4.1.1 (www.codoncode.com). As sequências obtidas foram inicialmente analisadas com o algoritmo BLAST n (ALTSCHUL et al., 1990) e o banco de dados de nucleotídeos não-redundante GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) para determinar as espécies virais com as quais elas compartilham maior identidade de sequência. As sequências similares obtidas a partir do GenBank (Tabela 2) 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* (Tabela 1) e outros isolados disponíveis no GenBank (Tabela 2) foram preparados para o conjunto de dados DNA-A, genes Rep e CP utilizando-se o algoritmo MUSCLE (EDGAR, 2004), e ajustadas manualmente no pacote MEGA6 (TAMURA et al 2013). Inferência Bayesiana para o DNA-A, CP e Rep foi realizada 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). Os modelos evolutivos GTR+I, GTR+I, HKY+I, GTR+I, SYM+G e GTR+I foram utilizados para os conjuntos de dados DNA-A, CP e Rep, respectivamente. 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 Estrutura genética e índices de variabilidade

Inferência sobre a estrutura genética da população de isolados de begomovírus obtidos de *C. urens* foi baseada no índice de fixação F de Wright (F_{st}) (WRIGHT, 1949), calculado usando o programa DnaSP v. 5.10 (ROZAS et al., 2003). A estrutura da população foi testada de acordo com a localização geográfica dos isolados virais. A média das diferenças de nucleotídeos por sítio (π) foi estimada para os conjuntos de dados DNA-A, Rep e CP em cada população utilizando-se DnaSP v. 5.10.

3.6 Análises de recombinação

Os conjuntos de dados de DNA-A e genes *CP* e *Rep* obtidos de isolados de *C. urens* e outros begomovírus disponíveis no GenBank, foram submetidos à análise de detecção de evolução em rede, utilizando o método Neighbor-Net implementado no programa SplitsTree v. 4.10 (HUSON; BRYANT, 2006).

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 alinhamento do conjunto de dados DNA-A 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.

3.7 Análise de seleção

Para detectar evidência de pressão de seleção positiva ou negativa, os conjuntos de dados de sequências nucleotídicas dos genes *CP* e *Rep* de foram submetidos aos testes de neutralidade Tajima D , Fu & Li D^* , Fu & Li F^* e estimação da taxa média de substituições não-sinônimas por substituições sinônimas (dN/dS) pelo modelo Pamilo-Bianchi-Li (PBL), todos disponíveis no programa DnaSP v 5.10 (ROZAS et al., 2003).

4 RESULTADOS

4.1 Análises de sequências e demarcação de espécie

Um total de 21 clones dos componentes genômicos virais completos (19 DNA-A e 2 DNA-B) foram obtidos a partir das amostras de *C. urens* coletadas no estado de Alagoas. As análises BLAST n e de comparações pareadas utilizando SDT demonstraram a presença de duas novas espécies, as quais foram identificados de acordo com o critério de $\geq 91\%$ de identidade para sequências completas de DNA-A, estabelecido pelo *Geminiviridae Study Group* do *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) para espécies do gênero *Begomovirus* (BROWN et al., 2015). Uma primeira nova espécie, nomeada *Cnidoscolus* mosaic leaf deformation virus (CnMLDV), foi representada por 18 clones (Figuras 3), sendo mais proximamente relacionada com o *Passionfruit severe leaf distortion* virus (PSLDV; número de acesso FJ972767) com entre 84-87,6% de identidade de sequências nucleotídicas. Uma segunda nova espécie, nomeada *Cnidoscolus* severe rugose virus (CnSRV), a qual também foi mais estreitamente relacionada com PSLDV (84% de identidade), foi representado pelo clone BR:Par2:15A. As duas novas espécies compartilharam $< 87\%$ de identidade de sequências nucleotídicas do DNA-A (Figura 3).

O sintoma apresentado em plantas de *C. urens* infectadas pela primeira nova espécie de begomovírus (CnMLDV) foi de mosaico e deformação foliar. Já o sintoma apresentado em plantas de *C. urens* infectadas pela segunda nova espécie de begomovírus (CnSRV) foi de bolhosidade severa (Figura 4).

Os genomas das duas novas espécies possui organização típica dos begomovírus bissegmentados do "Novo Mundo", com quatro ou cinco ORFs no DNA-A (*CP*, *Rep*, *TrAP*, *REn*, *AC4* e *AC5*) e duas ORFs no DNA-B (*MP* e *NSP*) (Tabela 1). Na região comum dos isolados virais de CnMLDV e CnSRV foram detectados 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), sítio de ligação de Rep essencial para o início da replicação viral. Adicionalmente, as sequências da região comum dos componentes DNA-A e DNA-B dos isolados BR:Mes3:15A e BR:Mes3:15B compartilharam acima de 97% de identidade nucleotídica, confirmando que ambos pertencem a espécie CnSRV.

Figura 3. Matriz bidimensional representando porcentagem de identidade de comparações pareadas de seqüências nucleotídicas do DNA-A coletadas nos estados de AL com amostras de begomovírus disponíveis no GenBank.

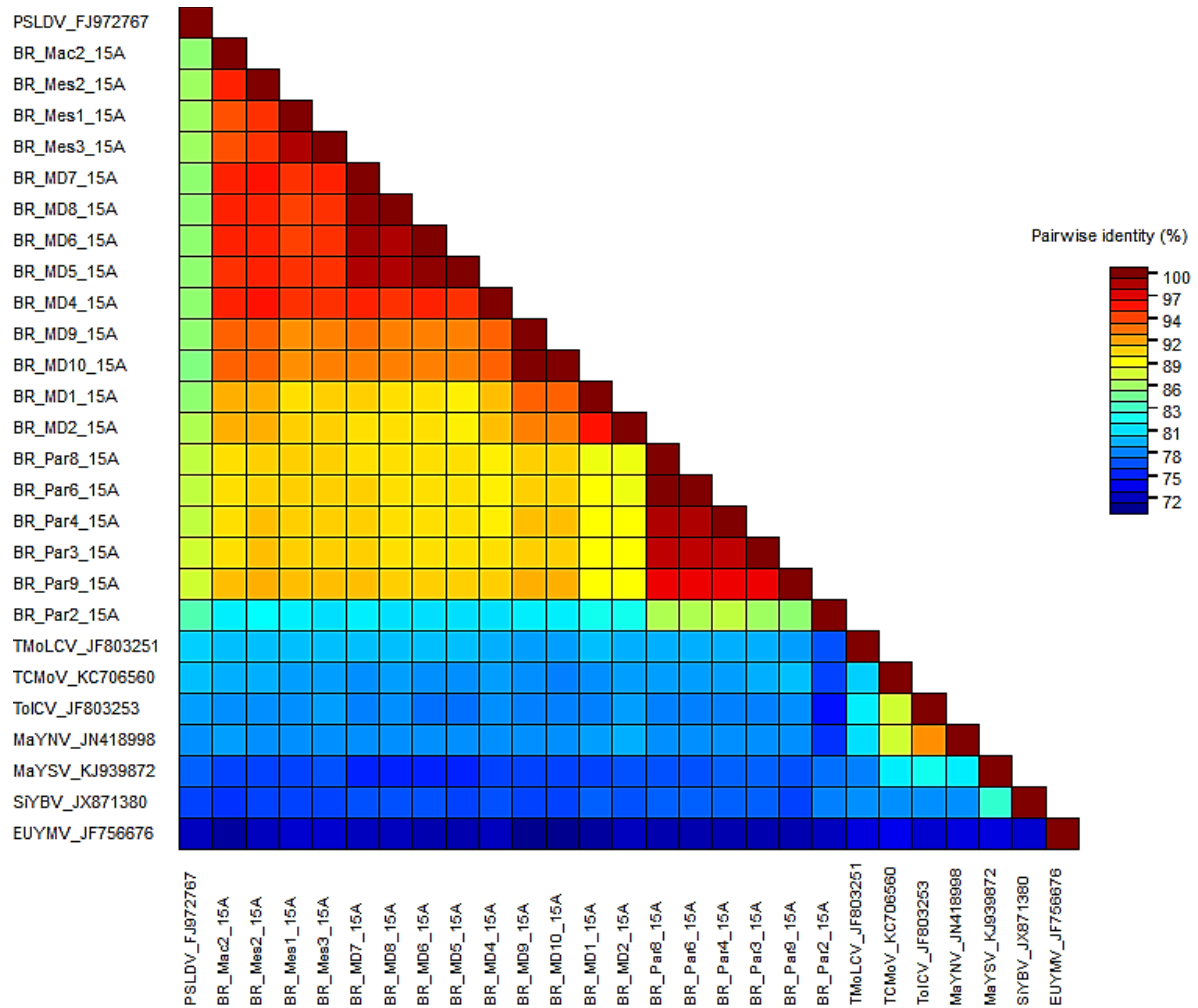


Figura 4. Sintomas em *Cnidoscolus urens* infectadas por dois novos begomovírus. **A.** Sintomas de mosaico e deformação nas folhas da planta da qual o *Cnidoscolus* mosaic leaf deformation virus (CnMLDV) foi obtido. **B.** Sintoma de bolhosidade severa nas folhas da planta da qual o *Cnidoscolus* sever rugose virus (CnSRV) foi obtido.



Tabela 1. Open reading frames (ORFs), com seus respectivos números de aminoácidos (aa), encontrados no DNA-A e DNA-B das espécies de begomovírus descritas neste trabalho.

Isolado	Genoma completo		CP	Rep	REn	TrAP	AC4	AC5	NSP	MP
	DNA-A	DNA-B								
BR:Mes1:15A	2642 nt	-	257 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	-	-	-
BR:Mes2:15A	2653 nt	-	257 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	-	-	-
BR:Mes3:15A	2641 nt	-	257 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	-	-	-
BR:Mes3:15B	-	2613 nt	-	-	-	-	-	-	256 aa	293 aa
BR:MD1:15A	2677 nt	-	257 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	-	-	-
BR:MD2:15A	2676 nt	-	257 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	-	-	-
BR:MD4:15A	2663 nt	-	257 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	-	-	-
BR:MD5:15A	2652 nt	-	265 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	-	-	-
BR:MD6:15A	2652 nt	-	265 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	-	-	-
BR:MD7:15A	2652 nt	-	265 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	-	-	-
BR:MD8:15A	2651 nt	-	265 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	-	-	-
BR:MD9:15A	2675 nt	-	257 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	-	-	-
BR:MD10:15A	2676 nt	-	257 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	-	-	-
BR:Par1:15B	-	2620 nt	-	-	-	-	-	-	258 aa	293 aa
BR:Par2:15A	2660 nt	-	257 aa	356 aa	132 aa	129 aa	87 aa	105 aa	-	-
BR:Par3:15A	2663 nt	-	257 aa	356 aa	132 aa	129 aa	97 aa	105 aa	-	-
BR:Par4:15A	2662 nt	-	257 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	105 aa	-	-
BR:Par6:15A	2661 nt	-	265 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	105 aa	-	-
BR:Par8:15A	2661 nt	-	257 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	105 aa	-	-
BR:Par9:15A	2663 nt	-	257 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	105 aa	-	-
BR:Mac2:15A	2676 nt	-	257 aa	357 aa	132 aa	129 aa	97 aa	-	-	-

4.2 Análises Filogenéticas

Análise filogenética baseada na sequência de nucleotídeos dos conjuntos de dados DNA-A, *CP* e *Rep* dos isolados de CnMLDV e CnSRV incluiu isolados obtidos aqui e outros disponíveis no GenBank (Tabelas 2 e 3). A filogenias bayesiana inferida para o conjunto de dados DNA-A revelou que todos os isolados da espécie CnMLDV formaram dois grupos principais: o Grupo 1, abrangendo isolados provenientes do município de Paripueira, e o Grupo 2, que inclui os isolados provenientes dos municípios de Maceió, Marechal Deodoro e Messias. A espécie CnSRV (BR:Par2:15A) formou um ramo irmão isolado dos demais clones (Figura 5).

Na filogenia inferida para o gene *CP* também foi observada a formação dos Grupos 1 e 2 para isolados de CnMLDV, porém com algumas incongruências topológicas (Figura 6). Por exemplo, o isolado BR:Mes3:15A pertencente ao Grupo 2 para filogenia do DNA-A, ocupou um ramo independente a todos os outros isolados. Além disso, a espécie CnSRV (BR:Par2:15A) agrupou com os outros isolados provenientes de Paripueira pertencentes ao Grupo 1.

No caso do gene *Rep*, ainda é possível observar a formação de dois grupos principais, porém também com incongruência topológica (Figura 7), pois a espécie CnSRV (BR:Par2:15A) formou um terceiro grupo, juntamente com o *Tomato chlorotic mottle virus* (TCMoV, NC003664).

Estas incongruências observadas para filogenia dos genes *Rep* e *CP*, sugerem possíveis eventos de recombinação entre os isolados das espécies de CnMLDV e CnSRV. A formação de dois grupos principais nas filogenias inferidas para o DNA-A, genes *CP* e *Rep* sugere também estruturação populacional para os isolados CnMLDV.

Tabela 2. Amostras de begomovírus provenientes do estado da Alagoas obtidas neste trabalho.

Código	Hospedeiro	Local	Data	Isolado		Atribuição de espécies
				DNA-A	DNA-B	
C01H2	<i>Cnidoscolus urens</i>	Messias – AL	Maio, 2015	BR:Mes1:15A		CnMLDV ^(nova)
C03A2	<i>Cnidoscolus urens</i>	Messias – AL	Maio, 2015	BR:Mes2:15A		CnMLDV
C04A2	<i>Cnidoscolus urens</i>	Messias – AL	Maio, 2015	BR:Mes3:15A	BR:Mes3:15B	CnMLDV
C10H3	<i>Cnidoscolus urens</i>	Marechal Deodoro – AL	Maio, 2015	BR:MD1:15A		CnMLDV
C11H3	<i>Cnidoscolus urens</i>	Marechal Deodoro – AL	Maio, 2015	BR:MD2:15A		CnMLDV
C13H1	<i>Cnidoscolus urens</i>	Marechal Deodoro – AL	Maio, 2015	BR:MD4:15A		CnMLDV
C14H1	<i>Cnidoscolus urens</i>	Marechal Deodoro – AL	Maio, 2015	BR:MD5:15A		CnMLDV
C15H1	<i>Cnidoscolus urens</i>	Marechal Deodoro – AL	Maio, 2015	BR:MD6:15A		CnMLDV
C16H2	<i>Cnidoscolus urens</i>	Marechal Deodoro – AL	Maio, 2015	BR:MD7:15A		CnMLDV
C17H2	<i>Cnidoscolus urens</i>	Marechal Deodoro – AL	Maio, 2015	BR:MD8:15A		CnMLDV
C19H2	<i>Cnidoscolus urens</i>	Marechal Deodoro – AL	Maio, 2015	BR:MD9:15A		CnMLDV
C20H2	<i>Cnidoscolus urens</i>	Marechal Deodoro – AL	Maio, 2015	BR:MD10:15A		CnMLDV
C22A3	<i>Cnidoscolus urens</i>	Paripueira – AL	Maio, 2015		BR:Par1:15B	CnMLDV
C23K2	<i>Cnidoscolus urens</i>	Paripueira – AL	Maio, 2015	BR:Par2:15A		CnSRV ^(nova)
C24A1	<i>Cnidoscolus urens</i>	Paripueira – AL	Maio, 2015	BR:Par3:15A		CnMLDV
C25S2	<i>Cnidoscolus urens</i>	Paripueira – AL	Maio, 2015	BR:Par4:15A		CnMLDV
C27A1	<i>Cnidoscolus urens</i>	Paripueira – AL	Maio, 2015	BR:Par6:15A		CnMLDV
C29A2	<i>Cnidoscolus urens</i>	Paripueira – AL	Maio, 2015	BR:Par8:15A		CnMLDV
C31A1	<i>Cnidoscolus urens</i>	Paripueira – AL	Maio, 2015	BR:Par9:15A		CnMLDV
C33A1	<i>Cnidoscolus urens</i>	Maceió – AL	Maio, 2015	BR:Mac2:15A		CnMLDV

Tabela 3. Sequências de begomovírus obtidas a partir do banco de dados não-redundante Genbank.

Espécie (Acrônimo)	Nº de acesso no Genbank	Hospedeiro	Local	Data
<i>Passionfruit severe leaf distortion virus</i> (PSLDV)	NC012786	<i>Passiflora edulis f. flavicarpa</i>	Bahia	2010
<i>Passionfruit severe leaf distortion virus</i> (PSLDV)	FJ972767	<i>Passiflora edulis f. flavicarpa</i>	Bahia	2010
<i>Tomato mottle leaf curl virus</i> (ToMoLCV)	JF803251	<i>Solanum lycopersicum</i>	Pernambuco	2012
<i>Tomato mottle leaf curl virus</i> (ToMoLCV)	JF803248	<i>Solanum lycopersicum</i>	Goiás	2012
<i>Macroptilium yellow spot virus</i> (MaYSV)	KJ939872	<i>Phaseolus lunatus</i>	Brasil	2015
<i>Macroptilium yellow spot virus</i> (MaYSV)	NC016999	<i>Phaseolus lunatus</i>	Brasil	2015
<i>Sida yellow blotch virus</i> (SiYBV)	NC020254	<i>Sida urens</i>	Alagoas	2013
<i>Sida yellow blotch virus</i> (SiYBV)	JX871380	<i>Sida urens</i>	Alagoas	2013
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i> (ToCMoV)	KC706560	<i>Solanum lycopersicum</i>	Minas Gerais	2013
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i> (ToCMoV)	NC003664	<i>Solanum lycopersicum</i>	Brasil	2008
<i>Tomato interveinal chlorosis virus</i> (ToICV)	JF803253	<i>Solanum lycopersicum</i>	Pernambuco	2012
<i>Tomato interveinal chlorosis virus</i> (ToICV)	JF803252	<i>Solanum lycopersicum</i>	Pernambuco	2012
<i>Macroptilium yellow net virus</i> (MaYNV)	JN418998	<i>Macroptilium lathyroides</i>	Alagoas	2012
<i>Macroptilium yellow net virus</i> (MaYNV)	NC017001	<i>Macroptilium lathyroides</i>	Alagoas	2012
<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i> (EuYMV)	JF756676	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Goiás	2011
<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i> (EuYMV)	NC012553	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Goiás	2011

Figura 5. Análise filogenética de inferência Bayesiana baseada no DNA-A, mostrando a formação de dois grupos principais. Grupo 1 = isolados provenientes apenas do município de Paripueira, e Grupo 2 = os isolados provenientes dos municípios de Maceió, Marechal Deodoro.

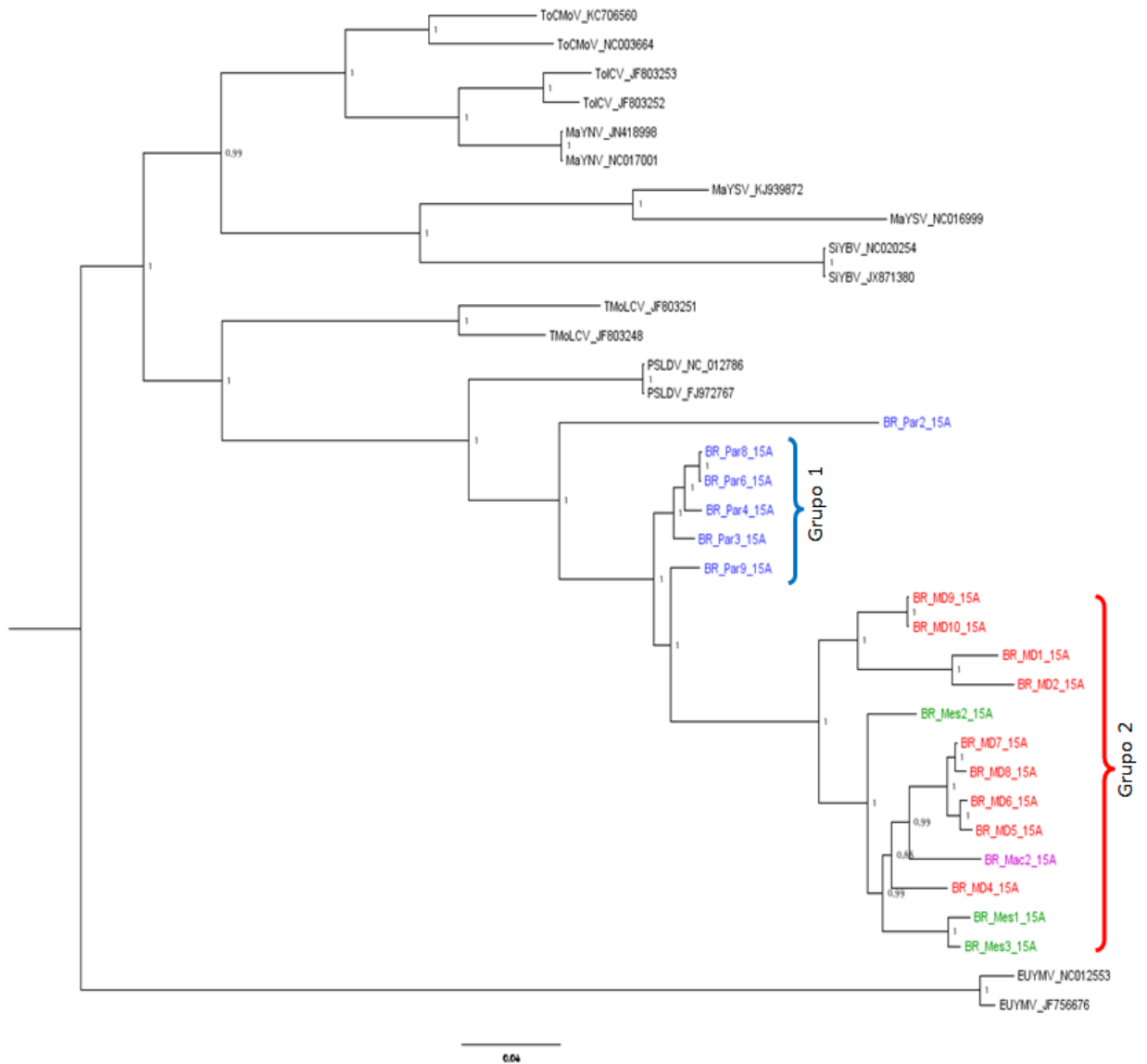


Figura 6. Análise filogenética de inferência Bayesiana baseada na ORF *CP*, mostrando a formação de dois grupos principais. Grupo 1 = isolados provenientes apenas do município de Paripueira, e Grupo 2 = os isolados provenientes dos municípios de Maceió, Marechal Deodoro e Messias.

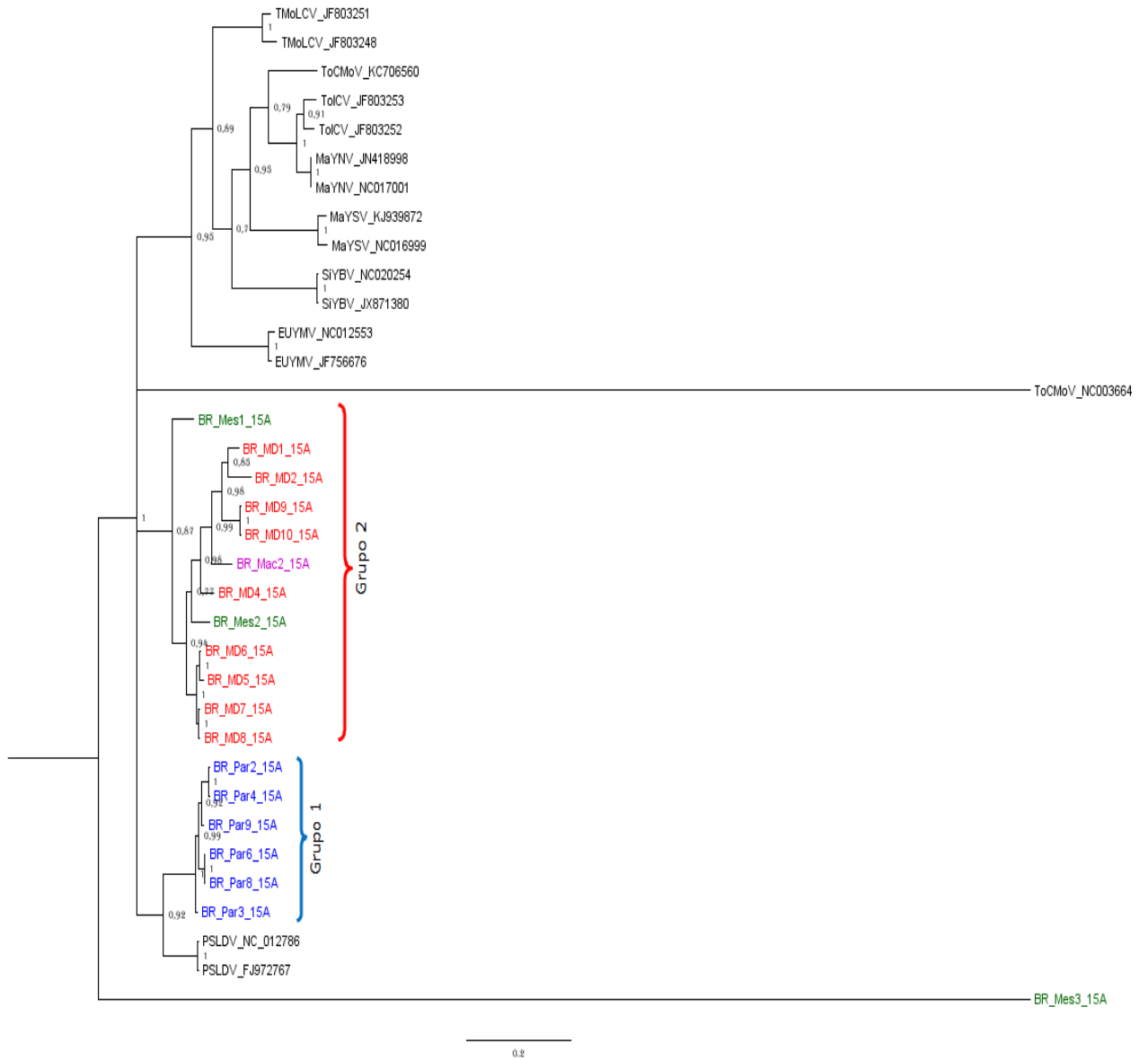
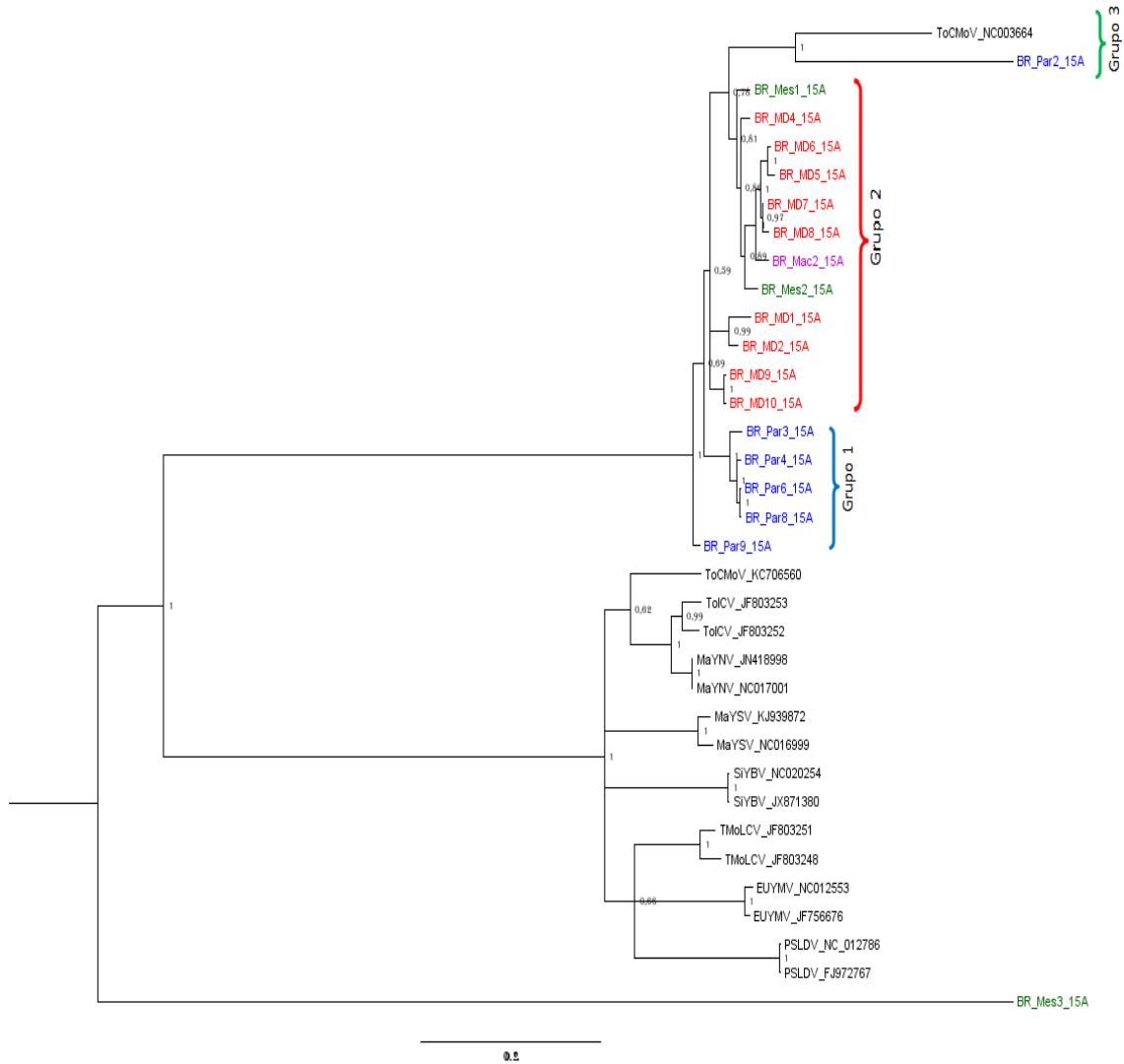


Figura 7. Análise filogenética de inferência Bayesiana baseada na ORF *Rep*, mostrando a formação de dois grupos principais. Grupo 1 = isolados provenientes apenas do município de Paripueira, Grupo 2 = os isolados provenientes dos municípios de Maceió, Marechal Deodoro e Messias, e Grupo 3 = CnSRV com um isolado TCMoV.



4.3 Estrutura genética e índices de variabilidade

Um alto valor F_{st} foi observado quando os 18 isolados da espécie CnMLDV foram submetidos ao testes de diferenciação F_{st} de acordo com a região geográfica (F_{st} geografia = 0,57). Esse resultado sugere que a população de CnMLDV se encontra estruturada com base na região geográfica, contendo duas subpopulações. A Subpopulação 1, inclui os isolado provenientes de Maceió, Marechal Deodoro e Messias. Enquanto a subpopulação 2, engloba os isolados obtidos no município de Paripueira (Tabela 1).

O índice de diversidade nucleotídica (π) da população total de CnMLDV e subpopulação 1 foram similares quando considerados todos os conjuntos de dados (DNA-A, CP e REP). Os maiores valores de π foram encontrados para o gene CP, tanto na população total quanto na subpopulação 1 (Litoral Sul), quando comparados com os índices para o DNA-A (Tabela 4). Entretanto, valores de π semelhantes aqueles encontrados para CP, também foram observados para o gene Rep da Subpopulação 1. Quando analisada a variabilidade dentro da subpopulação 2 (Litoral Norte), foi observado que π apresentou valores semelhantes para os conjuntos de dados DNA-A, CP e Rep, indicando que a diversidade nucleotídica está uniformemente distribuída ao longo do genoma.

Tabela 4. Diversidade nucleotídica (π) em CnMLDV no DNA-A, e ORF's *CP* e *Rep*.

População	Nº de sequências	DNA-A π^* (SD)†	CP π (SD)	Rep π (SD)
CnMLDV (total)	18	0.0729 (0.0046)	0.1418 (0.0324)	0.0973 (0.0367)
CnMLDV (Subpopulação 1 - Litoral Sul)	13	0.0601 (0.0066)	0.1217 (0.0463)	0.1062 (0.0491)
CnMLDV (Subpopulação 2 - Litoral Norte)	5	0.0211 (0,0000)	0,0157 (0.0030)	0.0276 (0.0097)

* Par-a-par, diversidade nucleotídica por sítio.

† Desvio padrão.

4.4 Análise de Recombinação

A análise reticulada revelou forte evidência de eventos de recombinação contribuindo para o processo evolutivo de isolados de CnMLDV e CnSRV (Figuras 8, 9 e 10), como sugerido pelas incongruências encontradas nas árvores filogenéticas.

Foram detectados fortes sinais de recombinação intraespecíficas entre os 18 isolados de CnMLDV para os conjuntos de dados DNA-A, *CP* e *Rep*. Por exemplo, a recombinação intraespecífica pode ser claramente observada entre os diferentes isolados provenientes do município de Paripueira (Grupo 2) para DNA-A e *CP* (Figuras 8 e 9). Vários eventos de recombinação intraespecífica também foram evidenciados entre os isolados provenientes dos municípios de Maceió, Marechal Deodoro e Messias (Grupo 1).

Evidências de recombinação interespecíficas foram observadas entre os isolados de CnMLDV e CnSRV quando utilizada apenas sequência do gene *CP* (Figura 9), como sugerido pela análise filogenética para esta mesma região. Adicionalmente, também foi sugerido um possível evento de recombinação interespecífica entre a espécie CnSRV e o PSLDV, quando utilizado o grupo de dados DNA-A (Figura 8). Este evento corrobora com as análises filogenéticas, onde o PSLDV surge como possível ancestral para as espécies CnMLDV e CnSRV.

Investigação de adicionais eventos de recombinação, determinação dos breakpoints de recombinação e identificação das possíveis espécies parentais foi realizada para o conjunto de dados do DNA-A utilizando o pacote RDP4. Como evidenciado pela análise reticulada, eventos de recombinação intra e interespecíficos ocorrendo em isolados das espécies CnMLDV e CnSRV foram detectados (Tabela 5). Sete eventos independentes de recombinação foram detectados, com pontos (*breakpoints*) de recombinação ocorrendo na Região Comum (CR), genes *CP*, *Rep* e *REn*. A maioria dos eventos de recombinação envolvendo os isolados de CnMLDV preditos pela análise reticulada foram confirmados. Juntos, estes resultados reforçam a importância da recombinação no processo evolutivo de espécies pertencentes ao gênero *Begomovirus*.

Figura 8 – Análise reticulada baseada no DNA-A dos isolados de CnMLDV e CnSRV obtidos neste trabalho, junto com isolados depositados no GenBank.

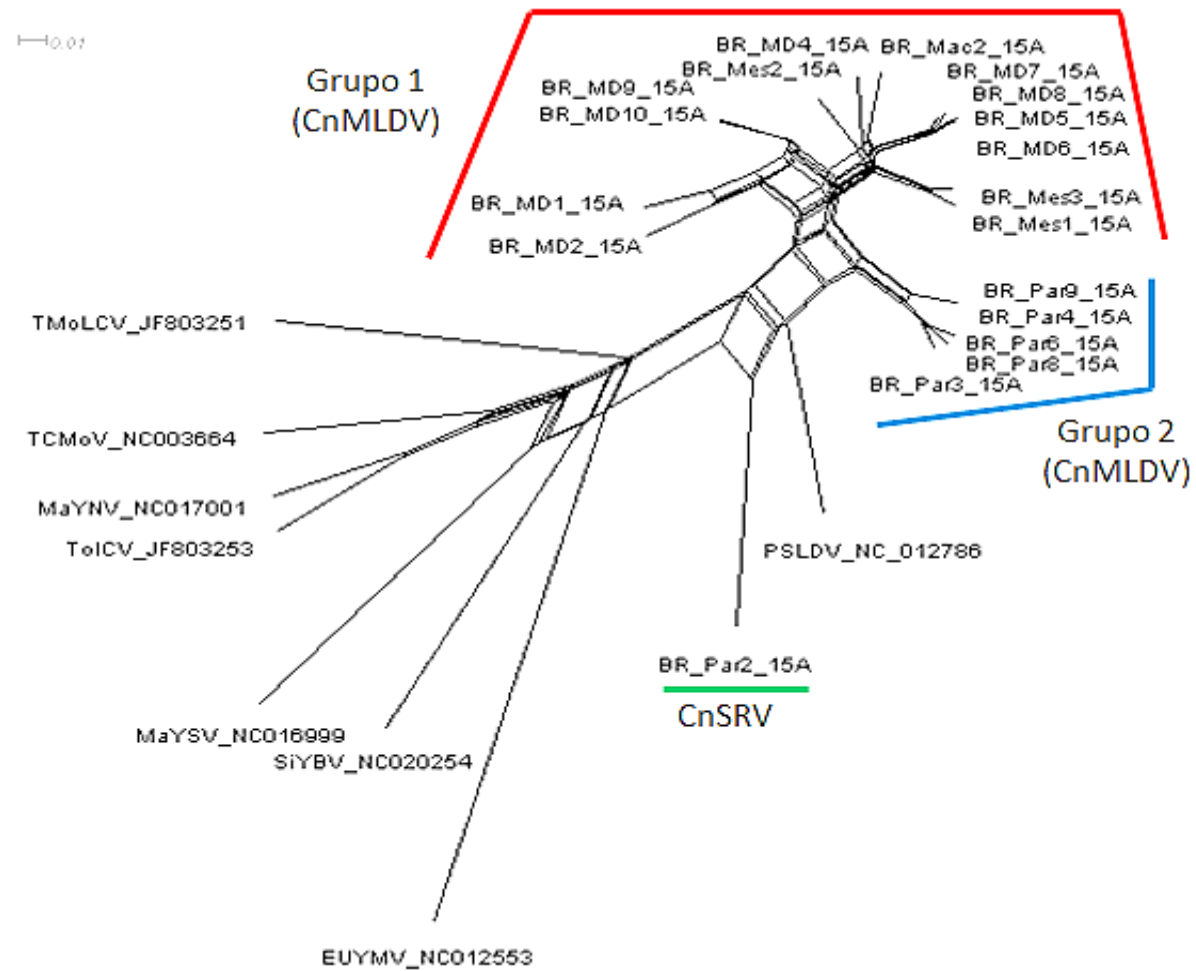


Figura 9 – Análise reticulada baseada na ORF CP dos isolados de CnMLDV e CnSRV obtidos neste trabalho, junto com isolados depositados no GenBank.

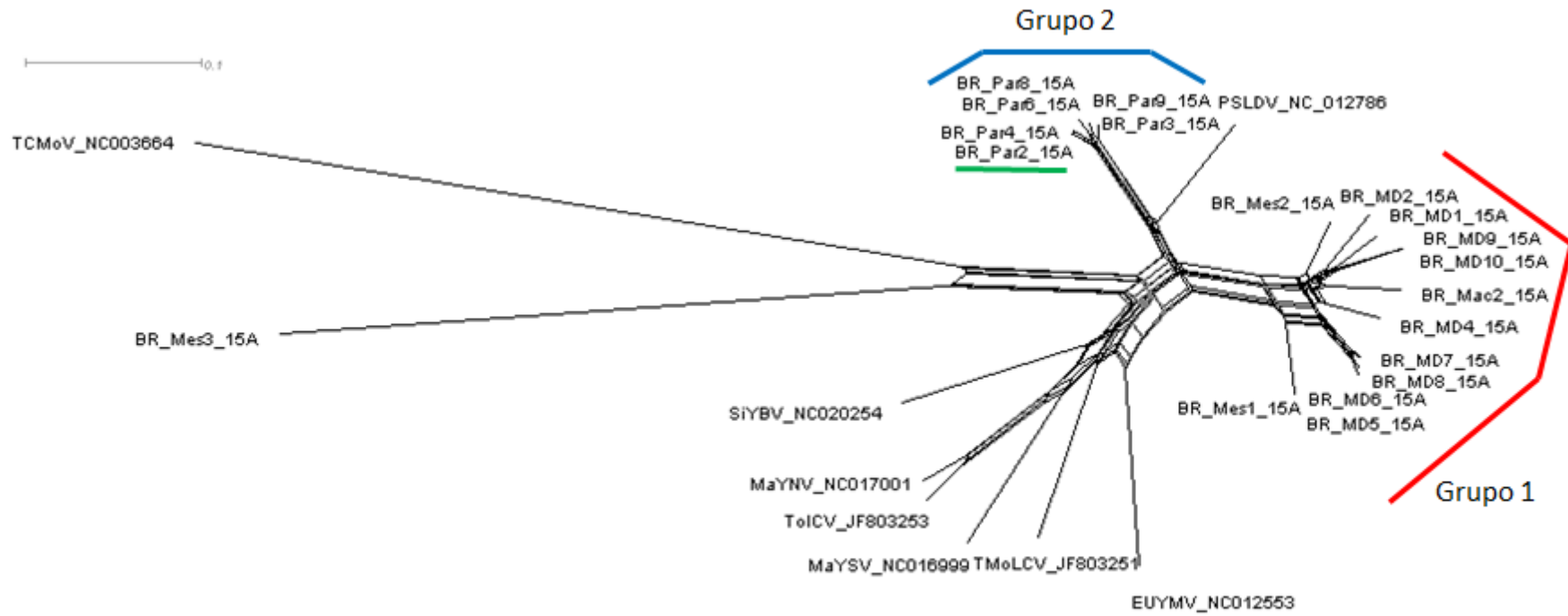


Figura 10 – Análise reticulada baseada na ORF Rep dos isolados de CnMLDV e CnSRV obtidos neste trabalho, junto com isolados depositados no GenBank.

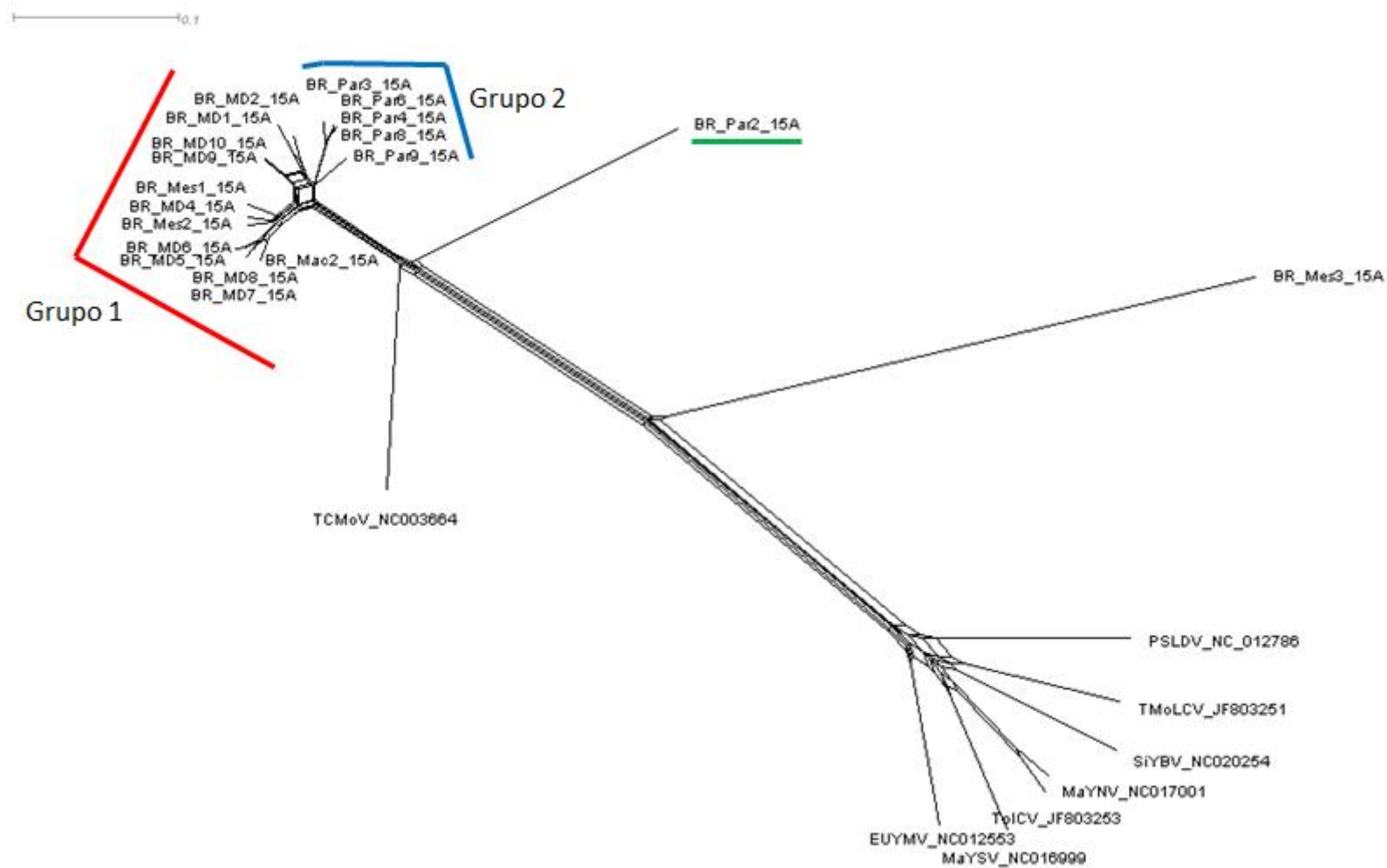


Tabela 5. Eventos de recombinação detectados entre os isolados de CnMLDV e CnSRV obtidos neste trabalho e os begomovírus mais proximamente relacionados acessados do Genbank.

Eventos	Breakpoints		Recombinantes	Parentais		Programas ^a	P-Value
	Começo	Fim		Menor	Maior		
1	948	1880	BR_MD1_15A BR_MD2_15A	Desconhecido	BR_Mac2_15A	RGBMCS3	4,46E-24
2	452	923	BR_Mes2_15A	BR_MD1_15A	BR_Mes_15A	RGBMCS3	9,42E-06
3	1424	2258	BR_Par3_15A BR_Par4_15A BR_Par6_15A BR_Par8_15A	Desconhecido	BR_Par9_15A	RGBMCS3	8,69E-05
4	2289	192	BR_Par3_15A BR_Par4_15A BR_Par6_15A BR_Par8_15A BR_Par9_15A	BR_MD10_15A	Desconhecido	RGBMCS3	1,88E-09
5	345	874	BR_Par2_15A BR_Par3_15A	PSLDV	BR_M10_15A	RGBMCS3	9,43E-12

			BR_Par4_15A					
			BR_Par6_15A					
			BR_Par8_15A					
			BR_Par9_15A					
			BR_Mac2_15A					
6	72	553	BR_Mac2_15A	BR_MD1_15A	BR_MD7_15A	RGBMCS3	3,11E-11	
7	1148	2006	BR_Par2_15A	PSLDV	Desconhecido	RGBMCS3	3,18E-82	

(a)= R, RDP; G, GENECONV; B, Bootscan; M, Maxchi; C, Chimaera; S, SiSscan; 3s, 3Seq.

4.5 Análise de seleção

Testes de neutralidade foram usados para acessar os tipo de seleção ou forças demográficas atuando nas sequências codificadoras para os genes *CP* e *Rep* das populações de CnMLDV. A maioria dos valores obtidos para os testes Tajima D, Fu & Li D* e Fu & Li F* para as ORFs *CP* e *Rep* das populações de CnMLDV, foram negativos e estatisticamente não suportados (Tabela 6). No entanto, valores negativos estatisticamente significativos foram detectados para os testes Fu & Li D* e Fu & Li F* na população total e subpopulação 1 para a ORF *Rep*. Também foram encontrados valores positivos não significativos estatisticamente para os três testes de neutralidade para ORF *CP* da Subpopulação 2. Esses resultados sugerem a ocorrência de seleção negativa (purificadora) ou uma recente expansão da população.

Os valores de $dN/dS < 1$ foram encontrados para as ORFs *CP* e *Rep* da população total e subpopulações 1 e 2 de CnMLDV, confirmando que seleção purificadora pode de fato estar atuando sob as mesmas.

Tabela 6. Sítios selecionados positiva e negativamente nas ORFs CP e Rep da população de CnMLDV.

População	ORF*	Tajima's <i>D</i>	Fu and Li's <i>D</i>	Fu and Li's <i>F</i>	dN/dS
CnMLDV (Total)	CP	-1,0562 (ns) [†]	-1,6031 (ns)	-1,6764 (ns)	0.8237
	REP	-1,7670 (ns)	-2,6750 (s) [‡]	-7,9900 (s)	0,7786
CnMLDV (Subpopulação 1)	CP	-1.5357 (ns)	-1.8557 (ns)	-2.0273 (ns)	0.8061
	REP	-1.7788 (ns)	-2.2779 (s)	-2.4556 (s)	0.7579
CnMLDV (Subpopulação 2)	CP	0.1245 (ns)	0.1240 (ns)	0.1333 (ns)	0.6869
	REP	-0.8737 (ns)	-0.8508 (ns)	-0.9284 (ns)	0.8545

*Rep, Replication-associated protein; CP, Coat protein.

[†]ns, valores não significativos a $P > 0,10$

[‡]s, valores significativos a $P < 0.05$

5. DISCUSSÃO

A diversidade de espécies de begomovírus tem sido amplamente investigada (CASTILLO-URQUIZA et al., 2008, SILVA et al., 2011 e 2012, TAVARES et al., 2012, FERNANDES et al., 2008). Entretanto, apenas poucos estudos sobre a estrutura genética de populações de begomovírus de hospedeiras não-cultivadas estão disponíveis (SILVA et al., 2011 e 2012, LIMA et al., 2013, ROCHA et al., 2013, RAMOS-SOBRINHO et al., 2014), principalmente aqueles que incluem os vírus que infectam hospedeiras da família Euphorbiaceae.

O complexo de espécies ACMV, EACMV e *South African cassava mosaic virus* (SACMV) responsável por causar o mosaico da mandioca (“cassava mosaic disease”) no continente Africano, são os begomovírus mais economicamente importantes que infectam euforbiáceas, representando a principal ameaça para segurança alimentar nesse continente (RYBICKI et al., 2015). No entanto, até o presente momento nenhuma dessas espécies foi descrita no “Novo Mundo”. EuYMV, obtido de *Euphorbia heterophylla*, é a espécie predominante de begomovírus que infectam membros de Euphorbiaceae no Brasil (FERNANDES et al., 2011, ROCHA et al., 2013). Neste estudo foram investigadas a diversidade e variabilidade genética de begomovírus que infectam cansanção (*C. urens*, família Euphorbiaceae) no estado de Alagoas.

Duas novas espécies de begomovírus foram obtidas a partir de 19 sequências completas do DNA-A. Esses resultados sugerem que a diversidade de espécies de begomovírus que infectam *C. urens* é maior que a encontrada para EuYMV, o qual constituía até recentemente, no único representante desse gênero ocorrendo no país.

Análises filogenéticas baseadas nas sequências completas do DNA-A demonstraram que as duas novas espécies (CnMLDV e CnSRV) formam dois grupos distintos na árvore, porém compartilham como ancestral comum o PSLDV, obtida de maracujazeiro, no estado da Bahia (Figura 5).

As filogenias para os conjuntos de dados DNA-A e genes *CP* e *Rep* revelaram que os isolados da espécie CnMLDV formaram dois grupos principais com base na região geográfica (Figuras 5, 6 e 7). Resultados semelhantes foram descritos para diferentes begomovírus de plantas não cultivadas e tomateiro (ROCHA et al., 2013; NASCIMENTO, 2015). Contudo, foi observado que populações de BGMV podem estar estruturadas tanto pela localização geográfica quanto pelo hospedeiro (RAMOS-SOBRINHO et al, 2014). A formação de grupos de isolados de acordo com a região geográfica sugere estruturação populacional da CnMLDV.

A hipótese de estruturação genética evidenciada pela filogenia, foi confirmada com base no alto valor *Fst* (*Fst geografia* = 0,57) baseado nas sequências completas do DNA-A. A população de CnMLDV foi subdividida nas subpopulações Litorais Norte e Sul (Figura 5), apesar da grande proximidade das áreas de coleta (60 Km). Entretanto, o pequeno número de isolados provenientes da subpopulação do Litoral Norte pode estar interferindo nesse resultado. Desta forma, torna-se necessária a obtenção de mais isolados dessas regiões para confirmação antes de uma conclusão definitiva.

Mutação e Recombinação são os principais mecanismos evolutivos que agem na distribuição da variabilidade genética em populações virais (GARCIA-ARENAL; FRAILE; MALPICA, 2003). As ocorrências frequentes de eventos de recombinação, em algumas populações de begomovírus, estão diretamente relacionadas aos altos índices de variabilidade genética (LIMA et al., 2013; ROCHA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). No presente estudo, altos índices de variabilidade foram encontrados. Vários estudos demonstram que a variabilidade de populações de begomovírus em hospedeiras não-cultivadas é mais alta que em begomovírus de plantas cultivadas (FIALLO-OLIVÉ et al., 2010; SILVA et al., 2011, 2012; WYANT et al., 2011).

Os maiores índices de variabilidade da população de CnMLDV foram encontrados principalmente para os genes *Rep* e *CP* da população total e subpopulação Litoral Norte, com índices de diversidade nucleotídica variando entre $\pi = 0,09$ e $\pi = 1,41$ (Tabela 4). Altos valores de π também foram encontrados para DNA-A da população total ($\pi_{total} = 0.0729$) (Tabela 4). Esses valores são ligeiramente superiores que aqueles já determinados para outros begomovírus de plantas não cultivadas como MaYSV e SiMoALV, os quais apresentam índices de diversidade nucleotídica em torno de $\pi_{total} = 0.06$ (LIMA et al., 2013; FERRO, 2015). A variabilidade genética de $\pi_{total} = 0.06$ foi encontrada para os isolados que compõe a subpopulação Litoral Norte. Mesmo sendo a variabilidade mais baixa encontrada no trabalho, ainda supera aquelas encontradas para EuYMV (ROCHA et al., 2013; NASCIMENTO, 2015). Contudo, o baixo número de isolados desta população pode estar interferindo nos valores reais de sua variabilidade.

Recombinação constitui um importante mecanismo evolutivo que comumente atua nas populações de begomovírus brasileiros contribuindo para o aumento de diversidade e variabilidade genética desses vírus (SILVA et al., 2012; LIMA et al., 2013; ROCHA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Análises de evolução reticulada e RDP revelaram um complexo padrão de recombinação para CnMLDV, os quais ocorreram com maior frequência no gene *Rep* e *CP*. Esses resultados corroboram com o fato que eventos de

recombinação detectados em populações de begomovírus brasileiros ocorrem de forma regular em regiões não-randômicas do genoma (LIMA et al., 2013). Os resultados ainda sugerem que a recombinação pode explicar, em parte, a alta variabilidade genética encontrada para as populações de CnMLDV. Não foi possível fornecer evidência definitiva que as sequências parentais aqui identificadas são verdadeiros pais. No entanto, fortes evidências indicam que os isolados de CnMLDV das subpopulações Litorais Norte e Sul evoluíram por meio de eventos de recombinação intraespecífica, envolvendo como parentais isolados de CnMLDV de origens geográficas iguais ou distintas e em alguns casos com o PSLDV. A espécie CnMLDV parece ter evoluído a partir de eventos de recombinação interespecíficos envolvendo isolados de CnMLDV e PSLDV. Portanto, pode ser observado no presente trabalho que a recombinação constitui um dos principais mecanismo atuando na evolução dos isolados de CnMLDV.

É também evidente a atuação de eventos de mutação atuando sobre os isolados de CnMLDV e CnSRV após os possíveis eventos de recombinação, indicando que estes eventos podem não ser recentes (Figuras 8, 9 e 10). Estudos da estrutura genética de EuYMV e *Bean golden mosaic virus* (BGMV) infectando diversas hospedeiras leguminosas revelaram que a recombinação parece não contribuir grandemente na variabilidade genética de suas populações (RAMOS-SOBRINHO et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2015).

Mudanças na sequência nucleotídica dos genes como as causadas por mutações aleatórias podem provocar alterações na conformação da proteína de modo a alterar também sua função (BURNS, BOTTINO, 1991; SUZUKI et al, 1991; NUSSBAUM et al, 2002). A seleção negativa ou purificadora têm sido descrita como a principal força seletiva atuando sobre populações de begomovírus que infectam espécies cultivadas e não-cultivadas (SILVA et al., 2011; LIMA et al. 2013; ROCHA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Similarmente, seleção purificadora foi a principal força seletiva atuando sobre os genes *CP* e *Rep* da população de CnMLDV. Vários estudos identificam que as sequências codificadoras para os genes *Rep* e *CP* são hotspots de recombinação (LEFREUVE et al, 2007; LIMA et al 2013; ROCHA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014; FERRO, 2015). Apesar da maioria dos eventos de recombinação desse trabalho terem ocorrido em *CP* e *Rep*, contribuindo possivelmente para o alto grau de variabilidade para CnMLDV, a seleção purificadora parece atuar nessas regiões preservando as sequências de aminoácidos codificadas por esses genes. O motivo pelo qual a seleção purificadora atua nos genes de *CP* e *Rep* é para manter as funções biológicas de seus produtos protéicos, os quais estão relacionados a sobrevivência dos begomovírus. Por exemplo, o gene *Rep* em geminivírus

inclui regiões ou motivos conservados de grande importância para o processo de replicação viral (ILYINA, KOONIN, 1992). Já o gene *CP* inclui regiões ou motivos conservados envolvidos na formação do capsídeo, transmissão do vírus pelo vetor, e em alguns casos no movimento viral (BROWN et al., 2012). Portanto, manutenção da integridade dessas regiões é crucial para o sucesso da replicação, e conseqüentemente, infecção viral.

6 CONCLUSÃO

- ✓ CnMLDV foi a espécie predominante em *C. urens* em Alagoas.
- ✓ Apesar da grande proximidade entre as áreas de coleta, a população de CnMLDV demonstrou estruturação genética com base na região geográfica.
- ✓ A detecção de duas novas espécies (CnMLDV e CnSRV) em *C. urens*, demonstra que esta hospedeira atua como importante reservatório de begomovírus.
- ✓ Mutação, recombinação e seleção negativa ou purificadora são os principais mecanismos evolutivos atuando sobre a população de CnMLDV.

REFERÊNCIAS

- 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**, Brasília, 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. et al. High-frequency reversion of geminivirus replication protein mutants during infection. **Journal of Virology**, v. 81, p. 11005-11015, 2007.
- ARGUELLO-ASTORGA, G.R.; RUIZ-MEDRANO, R. An iteron-related domain is associated to Motif 1 in the replication proteins of geminiviruses: identification of potential interacting amino acid-base pairs by a comparative approach. **Archives of Virology**, New York, v. 146, p. 1465-1485, 2001.
- ASSUNÇÃO, I.P. et al. Diversidade genética de begomovírus que infectam plantas invasoras na Região Nordeste. **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v. 24, p. 239-244, 2006.
- 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, 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.
- BRIDDON R. W. Cotton leaf curl disease, a multicomponent begomovirus complex **Molecular Plant Pathology**, v. 4, p. 427-434, 2003.
- BRIDDON, R. W. et al. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. **Virology**, v. 177, p. 85-94, 1990.
- BRIDDON, R.W.; STANLEY, J. Subviral agents associated with plant single-stranded DNA viruses. **Virology**, v. 344, p. 198-210, 2006.
- BROWN J.K. New species and revised taxonomy proposal for the genus Begomovirus (Geminiviridae): phylogenetic and pairwise distance analysis using the same approach as implemented for the genera Mastrevirus and Curtovirus in the same family, 2013. Disponível em: <http://talk.ictvonline.org/files/ictv_official_taxonomy_updates_since_the_8th_report/m/plant-official/4838.aspx>. Acesso em Julho de 2015.
- 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. The biology and molecular epidemiology of the Geminiviridae subgroup III. **Plant Microbe Interactions**, v. 2, p. 125-195, 1997.

BULL, S.E.; BRIDDON, R.W.; SSERUBOMBWE, W.S.; NGUGI, K.; MARKHAM, P.G.; STANLEY, J. Infectivity, pseudorecombination and mutagenesis of Kenyan cassava mosaic begomoviruses. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 1624-1633, 2007.

BURNS GW, BOTTINO P.J. **Genética**. 6ª edição, Editora Guanabara Koogan S.A. 1991
 CALEGARIO, R.F. **Caracterização do isolado de begomovírus MG-Bi2, um possível membro da espécie *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV)**. Tese M.S. Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 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**, Rio de Janeiro, 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.

CHATTERJI, A.; PADIDAM, M.; BEACHY, R.N.; FAUQUET, C.M. Identification of replication specificity determinants in two strains of tomato leaf curl virus from New Delhi. **Journal of Virology**, Washington, v. 73, p. 5481-5489, 1999.

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.

CUI, X.F.; TAO, X.R.; XIE, Y.; FAUQUET, C.M.; ZHOU, X.P. A DNA beta associated with Tomato Yellow Leaf Curl China Virus is required for symptom induction. **Journal of Virology**, Washington, v. 78, p. 13966-13974, 2004.

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.

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

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**, Brasília, 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 standardize d isolate descriptors. **Archives of Virology**, v. 150, p. 2151-2179, 2005.

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

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

FERNANDES, A.V.; GALVÃO, R.M.; MACHADO, J.J.; ZERBINI, F.M.; FONTES, E.P.B. Cloning and molecular characterization of A components of two new *Sida rhombifolia*-infecting geminiviruses. **Virus Reviews and Research**, Belo Horizonte, v. 4, p. 148, 1999.

FERNANDES, F. et al. Molecular and biological characterization of a new Brazilian begomovirus, euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV), infecting *Euphorbia heterophylla* plants. **Archives of Virology**, 156(11), 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.

FERRO, M. M. M. **Estrutura genética de populações dos begomovírus *Tomato mottle leaf curl virus* e *Sida mottle Alagoas virus* infectando tomate (*Solanum lycopersicum*) e espécies de *Sida* no Brasil**. Dissertação (Mestrado em Proteção Vegetal) - Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas - PPGPP, Universidade Federal de Alagoas. 2015.

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.

FONT, M.I.; RUBIO, L.; MARTINEZ-CULEBRAS, P.V.; JORDA, C. Genetic structure and evolution of natural populations of viruses causing the tomato yellow leaf curl disease in Spain. **Virus Research**, Amsterdam, v. 128, p. 43-51, 2007.

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, 1994a.

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

GALVÃO, R. M., MARIANO, A. C., LUZ, D. F., ALFENAS, P. F., ANDRADE, E. C., ZERBINI, F. M., ALMEIDA, M. R., FONTES, E. P. B. 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.

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.

GE, L.M.; ZHANG, J.T.; ZHOU, X.P.; LI, H.Y. Genetic structure and population variability of tomato yellow leaf curl China virus. **Journal of Virology** 81, 5902-7. 2007.

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

GUTIERREZ, C. et al. Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. **Veterinary Microbiology**, v. 98, p. 111-119, 2004.

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.

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.

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.

HUSON, D. H.; BRYANT, D. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. **Molecular Biology and Evolution**, 23(2):254-267, 2006.

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

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.

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

INOUE-NAGATA et al. New species emergence via recombination among isolates of the Brazilian tomato infecting *Begomovirus* complex. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.41, n.8, p.1329-1332, 2006.

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.

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., HEROCOURT, F., BENZ, B., GRONENBORN, B. DNA replication specificity of TYLCV geminivirus is mediated by the amino-terminal 116 amino acids of the Rep protein. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 262, p. 116-120, 1995.

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, MARTIN DP, HOAREAU M, 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.

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.

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.; ALMEIDA, A.M.R.; ZERBINI, F.M. Detection and identification of geminiviruses infecting soybean and associated weeds in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 444, 2000.

MELLO, R.N.; COTRIM, M.A.A.; LOPES, E.F.; MOREIRA, A.G.; CONTIN, F.S.; FONTES, E.P.B.; ALMEIDA, A.M.R.; ZERBINI, F.M. Survey of begomoviruses associated with soybean and identification of *Sida mottle virus* (SiMoV) infecting this crop in Brazil. **Virus Reviews and Research**, Belo Horizonte, v. 7(Supplement), p. 157, 2002.

MELO, A.L., SALES, M. F. O gênero *Cnidoscolus* Pohl (Crotonoideae-Euphorbiaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22(3), p. 806-827, 2008.

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.

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**, New York, v. 146, n. 3, p. 415-441, 2001.

MORENO, I.M.; MALPICA, J.M.; DIAZ-PENDON, J.A.; MORIONES, E.; FRAILE, A.; GARCIA-ARENAL, F. Variability and genetic structure of the population of watermelon mosaic virus infecting melon in Spain. **Virology**, New York, v. 318, p. 451-460, 2004.

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.

MUENSCHER, W.C. Euphorbiaceae. In: MUENSCHER, W.C. (Ed.) **Poisonous plants of the United States**. New York: The Macmillan Company. p. 142-152, 1958.

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.

NASCIMENTO, N. N. **Variabilidade e estrutura genética do begomovírus *Euphorbia***

yellow mosaic virus infectando hospedeiros não-cultivados no Brasil. Dissertação (Mestrado em Proteção Vegetal) - Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas - PPGPP, Universidade Federal de Alagoas. 2015.

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

NOZAKI, D.N.; KRAUSE-SAKATE, R.; HASEGAWA, J.M.; CESAR, M.A.; DZIUBA, P.H.; PAVAN, M.A. Ocorrência de *Tomato severe rugose virus* em pimentão (*Capsicum annuum* L.) no estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30 (Suplemento), p. S189, 2005.

NUSSBAUM R.L.; McINNES R.R.; WILLARD H.F. **Thompson & Thompson: Genética Médica**. 6 ed.. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA, 1635p. 2002.

OROZCO, B.M.; HANLEY-BOWDOIN, L. A. DNA structure is required for geminivirus replication origin function. **Virology Journal**, London, v. 70, p. 148-158, 1996.

OROZCO, B.M.; HANLEY-BOWDOIN, L. Conserved sequence and structural motifs contribute to the DNA binding and cleavage activities of a geminivirus replication protein. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 273, p. 24448-24456, 1998.

PADIDAM, M.; BEACHY, R.N.; FAUQUET, C.M. A phage single-stranded DNA (ssDNA) binding protein complements ssDNA accumulation of a geminivirus and interferes with viral movement. **Journal of Virology**, Washington, v. 73, p. 1609-1616, 1999.

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

PALMER, K.E.; RYBICKI, E.P. The molecular biology of mastreviruses. *Advances In: Virus Research*, San Diego, 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**, New York, v. 404, p. 148-157, 2010.

PEDERSEN, T.J.; HANLEY-BOWDOIN. Molecular characterization of the AL3 protein encoded by a bipartite geminivirus. **Virology**, New York, v. 202, p. 1070-1075, 1994.

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. In: **Scientia Horticulturae**, v.67, p. 151-196, 1996.

PINEL, A.; ABUBAKAR, Z.; TRAORE, O.; KONATE, G.; FARGETTE, D. Molecular epidemiology of the RNA satellite of Rice yellow mottle virus in Africa. **Archives of Virology**, New York, v. 148, p. 1721-1733, 2003.

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

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.

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.

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

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

RAMOS-SOBRINHO, R., et al. Contrasting genetic structure between two begomoviruses infecting the same leguminous Hosts. **Journal of General Virology**, 95,2540–2552. 2014.

REZENDE, W.L. et al. Infecção mista em plantas de tomate infectadas por geminivírus, detectada por meio de LIS-SSCP-PCR. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 338, 1997.

RIBEIRO, S.G. et al. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. **Archives of Virology**, New York, v. 148, p. 281-295, 2003.

RIBEIRO, S.G. et al. Molecular and biological characterization of *Tomato chlorotic mottle virus* suggests that recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses. **Phytopathology**, Saint Paul , v. 97, p. 702-711, 2007.

RIBEIRO, S.G. et al. Widespread occurrence of tomato geminiviruses in Brazil, associated with the new biotype of the whitefly vector. **Plant Disease**, Saint Paul , v. 82, p. 830, 1998.

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

ROCHA, C. S. et al. Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly evolving, and segregated based on geographical location. **Journal of Virology**, v. 87, 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**, Palo Alto, v. 43, p. 361–394, 2005.

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

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.

ROUMAGNAC, P.; GRANIERL, M.; BERNARDOL, P.; DESHOUX, M. FERDINAND, R.; GALZI, S.; FERNANDEZ, E. ; ABT, C. J. I. ; FILLOUXL, D. ; MESLÉARD, F ; VARSANI, A.; BLANC, S. ; MARTIN, D. P. ; PETERSCHMITT, M. Alfalfa leaf curl virus: An aphid-transmitted geminivirus. JVI Accepted Manuscript. **Journal of Virology**. 2015.

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**, Cambridge, v. 4, p. 202-209., 2001.

RYBICKI, E.P. A Top Ten list for economically important plant viroses. **Archives of Virology**, v. 160. P. 17-20. 2015.

SAMBROOK J.; RUSSEL D. **Molecular Cloning -A Laboratory Manual** (3^a ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 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**, Rockville, v. 7, p. 1185-1194, 1995.

SAUNDERS, K.; BEDFORD, I.D.; BRIDDON, R.W.; MARKHAM, P.G.; WONG, S.M.; STANLEY, J. A unique virus complex causes *Ageratum yellow vein disease*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, p. 6890-6895, 2000.

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

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

SEAL, S. E., 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. High genetic variability and recombination in a begomovirus population infecting the ubiquitous weed *Cleome affinis* in northeastern Brazil. **Archives of Virology**, New York, 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.

STAMATAKIS, A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. **Bioinformatics** 22, 2688–2690. 2006.

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**, London, 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**, Washington, v. 88, p. 8029-8033, 1991.

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

SUNTER, G. 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.

SUNTER, G.; BISARO, D.M. Transactivation of geminivirus AR1 and BR2 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. **Plant Cell**, v. 4, p. 1321-1331, 1992.

SUZUKI, D.T., et al. **Introdução à Genética**. 4 ed.. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 764p. 1991.

TAVARES, S.S. et al. Further molecular characterization of weed-associated begomoviruses in Brazil with an emphasis on *Sida* spp. **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, 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.; PADIDAM, M.; PHELPS, R.H.; BEACHY, R.N.; FAUQUET, C.M. 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**, New York, v. 274, p. 179-188, 2000.

VANITHARANI, R.; CHELLAPPAN, P.; PITA, J.S.;FAUQUET, C.M. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. **Journal of Virology**, Washington, v. 78, p. 9487-9498, 2004.

VARSANI, A. et al. A highly divergent South African geminivirus species illuminates the ancient evolutionary history of this family. **Virology Journal**, v. 6, p. 36, 2009.

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

VON ARNIM, A.; STANLEY, J. Inhibition of *African cassava mosaic virus* systemic infection by a movement protein from the related geminivirus *Tomato golden mosaic virus*. **Virology**, New York, v. 187, p. 555-564, 1992.

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

WYANT, K. A. et al., The genomes of four novel begomovirus species and a new *Sida micrantha* mosaic virus strain from Bolivian weeds. **Arch. Virol**, v. 156, p. 347–352. 2011.

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

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

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.