



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



RENATO NUNES DO NASCIMENTO

**VARIABILIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DO
BEGOMOVÍRUS *Euphorbia yellow mosaic virus* INFECTANDO
HOSPEDEIROS NÃO-CULTIVADOS NO BRASIL**

Rio Largo - AL
2015

N244v Nascimento, Renato Nunes do.
Variabilidade e estrutura genética do Begomovírus *Euphorbia yellow mosaic virus* infectando hospedeiros não-cultivados no Brasil / Renato Nunes do Nascimento. – 2015.
64 f. : il.

Orientadora: Iraildes Pereira Assunção.

Coorientador: Roberto Ramos Sobrinho.

Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2015.

Bibliografia: f. 53-64.

1. Geminivírus. 2. Plantas daninhas. 3. Variabilidade genética.
4. Estruturação de população. I. Título.

CDU: 632.38

RENATO NUNES DO NASCIMENTO

**VARIABILIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DO
BEGOMOVÍRUS *Euphorbia yellow mosaic virus* INFECTANDO
HOSPEDEIROS NÃO-CULTIVADOS NO BRASIL**

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

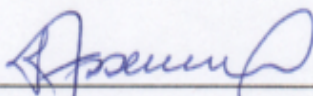
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Iraíldes Pereira Assunção

Rio Largo - AL
2015

RENATO NUNES DO NASCIMENTO

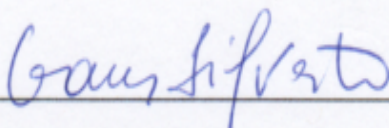
**VARIABILIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DO
BEGOMOVÍRUS *Euphorbia yellow mosaic virus* INFECTANDO
HOSPEDEIROS NÃO-CULTIVADOS NO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Proteção de Plantas, do Centro
de Ciências Agrárias da Universidade
Federal de Alagoas. Aprovada pela seguinte
Banca Examinadora:



Prof.^a Dr.^a Iraildes Pereira Assunção - Universidade Federal de Alagoas (Orientadora)

Banca Examinadora:



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



Dr. Roberto Ramos Sobrinho – Bolsista PRODOC/CAPES/UFAL (Examinador)

RENATO NUNES DO NASCIMENTO

**VARIABILIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DO
BEGOMOVÍRUS *Euphorbia yellow mosaic virus* INFECTANDO
HOSPEDEIROS NÃO-CULTIVADOS NO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Proteção de Plantas, do
Centro de Ciências Agrárias da
Universidade Federal de Alagoas.
Aprovada pela seguinte Banca
Examinadora:

Prof.^a Dr.^a. Iraildes Pereira Assunção - Universidade Federal de Alagoas (Orientadora)

Banca Examinadora:

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

Dr. Roberto Ramos Sobrinho – Bolsista PRODOC/CAPES/UFAL (Examinador)

Rio Largo - AL
2015

Dedico esse trabalho à minha esposa Suênia
e à minha filha Clarissa, razões para esse
esforço.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Proteção de Plantas do CECA - UFAL, à todos os mestres da casa pelos ensinamentos, ao Prof. Gaus Andrade de Lima, ao Prof. Marcio Aurélio Lins e Prof. Eliane Aparecida Holanda Cavalcanti, ambos do *Campus* Arapiraca pelo apoio para a realização desse curso.

À minha família pelo apoio incondicional, aos meus colegas de laboratório: Aline, Lucas, Jane Cléa, Fred, Jaqueline, Lourdes Regina, Laura, Jecy, Leonardo e em especial à Mayra Ferro pelas valiosas contribuições, Jean Phellipe pelo constante apoio e ao Prof. Jorge Portella pelas boas conversas, sempre proveitosas.

Aos meus amigos-irmãos em Alagoas, Anderson Sabino e Jefferson Leal.

Aos meus orientadores desde o início dos trabalhos de pesquisa: Dr.^a Márcia Carine, Dr. Roberto Ramos Sobrinho e Prof.^a Dr.^a Iraildes Pereira Assunção.

RESUMO

Os begomovírus estão entre os grupos de fitopatógenos de maior importância econômica em todo o mundo, afetando diversas espécies cultivadas, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, além de plantas cultivadas como as pertencentes ao gênero *Phaseolus* (feijoeiros) e tomateiro (*Solanum lycopersicum*), os begomovírus infectam plantas não-cultivadas pertencentes à diversas famílias botânicas como Malvaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae e Asteraceae. Esses vírus podem ser transmitidos entre os diferentes hospedeiros cultivados e não-cultivados, com plantas silvestres atuando como possíveis fontes de inóculo e como hospedeiros alternativos, apresentando importância epidemiológica durante o ciclo da doença. O objetivo deste trabalho foi quantificar os diferentes mecanismos evolutivos atuando sobre a variabilidade e estrutura genética de populações de begomovírus infectando hospedeiros não-cultivados no Brasil. Amostras de plantas da família Euphorbiaceae apresentando sintomas de infecção por begomovírus foram coletadas no estado da Paraíba, o DNA total foi extraído e os componentes genômicos virais foram amplificados por RCA, clivados com enzimas de restrição, clonados e sequenciados. As sequências obtidas foram comparadas com sequências a partir do banco de dados de nucleotídeos não redundantes Genbank, usando o critério de $\geq 91\%$ para demarcação de espécie. Foram realizadas análises filogenéticas, de diversidade, recombinação e seleção. A análise de comparações pareadas mostrou que os 49 isolados utilizados neste trabalho pertenceram a uma única espécie viral: *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV). Filogeneticamente, as populações agruparam em árvores bastante similares, porém com algumas incongruências topológicas para as diferentes regiões genômicas. Foi observada a formação de dois grupos principais correlacionados com a origem geográfica. A diversidade nucleotídica da população total apresentou-se maior quando comparada com as subpopulações do Nordeste e Centro-Oeste, sendo essa diversidade semelhante para os conjuntos de dados DNA-A, CP e Rep. Análise reticulada do conjunto de dados DNA-A, CP e Rep mostrou evidências de recombinação atuando na evolução de alguns isolados do Nordeste e Centro-Oeste, sendo detectado apenas um isolado possivelmente recombinante, com pontos de recombinação na Região Comum e interface dos genes Trap e Ren. Análise de seleção mostrou que a pressão de seleção negativa ou purificadora é a principal força seletiva atuando sobre os genes CP e Rep das subpopulações do EuYMV.

Palavras-chave: Geminivírus, Plantas daninhas, Variabilidade genética, Estruturação de população.

ABSTRACT

The begomoviruses are among the most economic important pathogens worldwide, affecting different crops, mainly in tropical and subtropical regions. In Brazil, besides cultivated plants belonging to the genus *Phaseolus* (beans) and tomato (*Solanum lycopersicum*), begomoviruses infect non-cultivated hosts in different botanical families: Malvaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae and Asteraceae. These viruses can be transmitted between different cultivated and non-cultivated hosts, with wild plants acting as putative source of inoculum and as alternate hosts, displaying epidemiological importance in the disease cycle. The aim of this study was to quantify the different evolutionary mechanisms acting on the variability and genetic structure of begomovirus populations infecting non-cultivated hosts in Brazil. Plants from the family Euphorbiaceae showing symptoms of begomovirus infection were collected in the Paraíba State, total DNA was extracted and viral genomic components were amplified by RCA, cleaved with restriction enzymes, cloned and sequenced. The sequences from this study were compared to sequences from the Genbank non-redundant nucleotide database, taking account the criterion of $\geq 91\%$ for species demarcation. Phylogenetic, diversity, recombination and selection analyses were performed. The pairwise comparison showed that all 49 isolates used in this study belonged to one only viral species: *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV). Phylogenetically, the population grouped in very similar trees, but with some topological inconsistencies for the different genomic regions. Formation of two main groups correlated with geographic origin was observed. Nucleotide diversity of the total population was higher than Northeastern and Midwestern subpopulations, being similar in the DNA-A, CP and Rep datasets. Network analysis of the DNA-A, CP and Rep datasets showed evidence of recombination affecting the evolution of isolated from Northeastern and Midwestern, being detected only one isolate as putative recombinant, with recombination breakpoints in the Common Region and interface of the Trap and Ren genes. Selection analysis showed that negative selection pressure or purifying selection is the main selection force acting on CP and Rep of the EuYMV subpopulations.

Key words: Geminivirus, Weeds, Genetic variability, Population structure.

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>	16
Figura 2 - Matriz bidimensional representando a porcentagem de identidade de comparações pareadas de sequências nucleotídicas do DNA-A dos isolados da Paraíba e Goiás com isolados de begomovírus disponíveis no GenBank.....	46
Figura 3 - Análise filogenética de máxima verossimilhança baseada no DNA-A, mostrando a formação de dois grupos distintos de acordo com a origem geográfica. Grupo 1 = isolados obtidos no Centro-Oeste, grupo 2 = isolados obtidos no Nordeste.	47
Figura 4 - Análise filogenética de máxima verossimilhança baseada na ORF CP, mostrando a formação de dois grupos distintos de acordo com a origem geográfica. Grupo 1 = isolados obtidos no Centro-Oeste, grupo 2 = isolados obtidos no Nordeste.	48
Figura 5 - Análise filogenética de máxima verossimilhança baseada na ORF Rep, mostrando a formação de dois grupos distintos de acordo com a origem geográfica. Grupo 1 = isolados obtidos no Centro-Oeste, grupo 2 = isolados obtidos no Nordeste.	49
Figura 6 - Análise reticulada baseada no DNA-A. Isolados obidos no estado da Paraíba (linha vermelha).....	50
Figura 7 - Análise reticulada baseada na ORF CP. Isolados obidos no estado da Paraíba (linha vermelha).....	51
Figura 8 - Análise reticulada baseada na ORF Rep. Isolados obidos no estado da Paraíba (linha vermelha).....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Isolados de begomovírus obtidos a partir de amostras coletadas no estado da Paraíba	39
Tabela 2 - Isolados de begomovírus provenientes do estado de Goiás.	40
Tabela 3 - Sequências de begomovírus obtidas a partir do banco de dados não-redundante de nucleotídeos Genbank.	41
Tabela 4 - Diversidade genética em populações do <i>Euphorbia yellow mosaic virus</i> infectando hospedeiras não-cultivadas no Brasil	43
Tabla 5 - Eventos de recombinação detectados entre os isolados de <i>Euphorbia yellow mosaic virus</i>	44
Tabela 6 - Sítios sob pressão de seleção positiva e negativa nas ORFs CP e Rep dos isolados de <i>Euphorbia yellow mosaic virus</i>	45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1	A família <i>Geminiviridae</i>	12
2.2	Organização genômica e papel desempenhado pelas proteínas dos <i>Begomovirus</i>	14
2.3	Replicação viral.....	17
2.4	Variabilidade e estrutura genética de populações de begomovírus.....	20
2.4.1	Mutação.....	20
2.4.2	Recombinação.....	21
2.4.3	Pseudorecombinação.....	23
2.5	Diversidade de begomovírus infectando plantas cultivadas e plantas daninhas no Brasil.....	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	Coleta do material vegetal.....	30
3.2	Extração de DNA, amplificação e clonagem dos genomas virais.....	30
3.3	Análise de sequências e demarcação de espécies.....	31
3.4	Análise filogenética.....	31
3.5	Estrutura genética e índices de variabilidade.....	31
3.6	Análises de recombinação.....	32
3.7	Análise de seleção.....	32
4	RESULTADOS	33
4.1	Demarcação da espécie.....	33
4.2	Filogenia.....	33
4.3	Diversidade genética.....	33
4.4	Recombinação.....	34
4.5	Análise de seleção.....	34
5	DISCUSSÃO	35
6	CONCLUSÕES	38
	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

Os begomovírus são fitovírus de DNA de fita simples (ssDNA) circular compostos por um ou dois componentes genômicos (DNA-A e DNA-B) encapsidados numa estrutura geminada icosaédrica, sendo transmitidos naturalmente pela “mosca-branca” *Bemisia tabaci* (BROWN et al., 2012). Begomovírus constituem um grupo importante de fitopatógenos pertencente à família *Geminiviridae*, afetando diversas culturas de importância econômica em todo o mundo. No Brasil, as culturas mais prejudicadas por begomovírus são os feijoeiros (*Phaseolus* spp.) e tomateiro (*Solanum lycopersicum*). Em feijões, as perdas podem chegar a 100%, e em tomate, redução de 60% na produtividade já foi observada (QUINTELA et al., 2008; MORALES, 2001; GIORDANO et al., 2005)

Além de plantas cultivadas, os begomovírus podem infectar plantas silvestres de diversas famílias botânicas, podendo servir como fonte de inóculo e como hospedeiros alternativos na ausência da espécie cultivada. 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), e podem ser fruto de frequentes eventos de recombinação e pseudorecombinação entre os begomovírus durante infecções mistas (AMBROZEVICIUS, et al, 2002, ZHOU et al.,1997; FONDONG et al., 2000).

Mutação, recombinação e pseudorecombinação são os principais motores responsáveis pela variabilidade genética nas populações de begomovírus, variabilidade que fornece oportunidades de adaptação às diversas condições ambientais encontradas nos campos de cultivo. Conhecer a estrutura e a diversidade genética das populações de begomovírus é crucial para a compreensão das interações vírus/insetos vetores/hospedeiros (GARCIA-ARENAL; FRAILE; MALPICA, 2003; ROOSSINCK, 1997; LIMA et al., 2013; ROCHA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014).

O objetivo do presente trabalho foi quantificar os diferentes mecanismos evolutivos atuando sobre a variabilidade e estrutura genética de populações do *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV), um begomovírus que infecta diversos hospedeiros não-cultivados associados à culturas de importância econômica no Brasil.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A família *Geminiviridae*

A família *Geminiviridae* é considerada uma das mais numerosas dentre os vírus de planta, contando com 325 espécies distribuídas em sete gêneros: *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus*, sendo que os três últimos gêneros foram incluídos recentemente à família (VARSANI et al., 2014). Essa divisão é baseada em características como gama de hospedeiros, tipo de inseto vetor, organização genômica e relacionamento filogenético (VARSANI et al., 2014). Os membros dessa família são caracterizados por apresentarem DNA de fita simples circular encapsidados em partículas geminadas de morfologia icosaédrica (BROWN et al., 2012). Dentre os geminivírus, o gênero *Begomovirus* (espécie tipo *Bean golden yellow mosaic virus* - BGYMV) é aquele que conta com o maior número de espécies (VARSANI et al., 2014). Este gênero inclui os mais importantes vírus nas regiões tropicais e subtropicais, como o *Bean golden mosaic virus* (BGMV), o *African cassava mosaic virus* (ACMV) e o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). Os begomovírus apresentam um ou dois componentes genômicos designados DNA-A e DNA-B, são transmitidos pela mosca-branca *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) e infectam plantas dicotiledôneas (STANLEY et al., 2005; FARIA et al., 2000).

Os begomovírus são encontrados basicamente no floema das plantas infectadas, entretanto, algumas espécies são capazes de infectar tecidos mais externos como as células do mesófilo (Revisado por NELSON e VAN BEL, 1997). Esta capacidade de colonizar o tecido epidérmico pode ser derivada de características genéticas adquiridas por algumas espécies, como por exemplo, o *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), que é capaz de infectar células do mesófilo e de liberar o *Bean golden mosaic virus* (BGMV, um vírus comumente restrito ao floema) a partir dos tecidos vasculares. Essa capacidade de infectar células do mesófilo parece estar associada menos com a proteína codificada pela ORF CP e mais com uma interação complexa entre a região não codificadora, a Trap, Ren além das proteínas de movimento. (MORRA; PETTY, 2000). O *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) também invade células do mesófilo e em infecções mistas com o *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), o ToYSV libera para o mesófilo o ToRMV que inicialmente é restrito ao floema (ALVES-JÚNIOR et al., 2009).

Baseado na organização genômica, diversidade genética e distribuição geográfica, os begomovírus são divididos em dois grupos: begomovírus do “Velho Mundo” (Europa, África, Ásia e Austrália) e do “Novo Mundo” (Américas). Os begomovírus do "Velho Mundo" apresentam um ou dois componentes genômicos e frequentemente estão associados a moléculas de ssDNA satélites denominados alfassatélites (anteriormente DNA-1) e betassatélites (anteriormente DNA β) (FAUQUET & STANLEY, 2005). SRIVASTAVA et al., (2015) amostraram uma nova molécula de DNA satélite (RecSat) em associação com *Tobacco leaf curl Yunnan virus* (TbLCYNV) infectando naturalmente plantas de tabaco. Análise de sequência demonstrou que o satélite é uma quimera com elementos de alfassatélites e betassatélites resultante de pelo menos três eventos de recombinação distintos, demonstrando assim a recombinação entre satélites distintos.

A maioria dos begomovírus encontrados no "Novo Mundo" apresenta dois componentes genômicos denominados DNA-A e DNA-B, com relatos de ocorrência de associação a alfassatélites (PAPROTKA; METZLER; JESKE, 2010b; ROMAY et al., 2010). Recentemente, um begomovírus desprovido do componente genômico B foi relatado causando *Tomato leaf curl disease* (ToLCD) no Peru e Equador. Esse vírus foi denominado *Tomato leaf deformation virus* (ToLDV) e provavelmente é resultado de eventos de recombinação e evolução convergente a partir do DNA-A do progenitor bissegmentado (MELGAREJO et al., 2013; SÁNCHEZ-CAMPOS et al., 2013). Trata-se, portanto, do primeiro relato de um begomovírus monopartido nativo do “Novo Mundo”.

Alfassatélites foram identificados no Brasil e na Venezuela associados aos begomovírus bissegmentados *Cleome leaf crumple virus* (CILCrV), *Euphorbia mosaic virus* (EuMV) e *Melon chlorotic mosaic virus* (MeCMV), sendo esses os primeiros relatos de alfassatélites associados a begomovírus ocorrendo naturalmente no “Novo Mundo” (PAPROTKA; METZLER; JESKE, 2010b; ROMAY et al., 2010). O primeiro begomovírus relatado em associação com um betassatélites foi o *Ageratum yellow vein virus* (AYVV). Desde então, vários outros begomovírus têm sido reportados e devido ao número crescente de relatos de betassatélites, um sistema de classificação e nomenclatura foi proposto para estes componentes, no qual já se observam listadas 51 espécies (BRIDDON et al., 2008).

Moléculas de DNA-satélite associadas a begomovírus monopartidos do “Velho Mundo” foram relatadas interferindo na replicação do vírus auxiliar, na maioria das vezes atenuando os sintomas, porém em alguns casos, induzindo o vírus auxiliar a produzir novos sintomas não observados em infecções virais na ausência dos satélites (ROOSSINCK, 1992). Complexos formados entre vírus e DNA Satélite quimérico pode interferir no vírus auxiliar prejudicando seu acúmulo ou induzindo sintomas diferentes daqueles produzidos unicamente pelo vírus, Srivastava et al., (2015). Briddon & Stanley (2006) afirmam que as funções dos satélites ainda não são claras, pois variam dependendo do vírus auxiliar. Entretanto parecem estar associados à virulência do patógeno, exercendo função na supressão do silenciamento gênico da planta, com a proteína β C1, codificada pelo betassatélite, sendo responsável por essa função (CUI et al., 2005). Foi demonstrado ainda que begomovírus distintos quando interagem com um mesmo DNA-satélite produzem os mesmos sintomas nas plantas infectadas (MANSOOR et al., 2003), indicando que os satélites de DNA podem atuar como fatores de patogenicidade. O método mais seguro para identificação de espécies de begomovírus tem sido a determinação da sequência completa de nucleotídeos do DNA-A. Devido à dificuldade inerente na identificação de espécies, o Grupo de Estudos de *Geminiviridae* do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) propôs o limite de $\geq 89\%$ de identidade de nucleotídeos entre sequências completas do DNA-A para espécies de *Begomovirus* (FAUQUET et al., 2008). Este limite foi redefinido para $\geq 91\%$ de identidade (BROWN, et al., 2015). Em 2004, Inoue-Nagata e colaboradores desenvolveram um método simples para clonagem de genomas completos de begomovírus baseado na amplificação dos componentes genômicos por círculo rolante (RCA – *rolling-circle amplification*) seguido por digestão com enzima de restrição e ligação ao vetor. Este método tem facilitado os procedimentos de clonagem e rápida realização de sequenciamento de um grande número de isolados. A utilização dessas técnicas tem permitido a realização de estudos de variabilidade genética, epidemiologia molecular, além de fornecer suporte a programas de melhoramento genético de espécies cultivadas.

2.2 Organização genômica e papel desempenhado pelas proteínas dos *Begomovirus*

O genoma da maioria dos *Begomovirus* do “Novo Mundo” apresenta dois componentes genômicos denominados DNA-A e DNA-B. Cada componente é

encapsidado separadamente em partículas geminadas sendo necessárias as duas moléculas de DNA para que a infecção ocorra. Ambos apresentam um comprimento semelhante de aproximadamente 2,6 Kb, não apresentando homologia de sequência, exceto por uma região com cerca de 200 pb, a região comum (RC). A RC é altamente conservada dentro de cada espécie viral, apresentando normalmente acima de 90% de identidade. Na RC estão localizadas a origem de replicação e os promotores da síntese dos mRNA's virais (LAZAROWITZ, 1992; LAZAROWITZ et al., 1992; FONTES et al., 1994b).

Dentro da RC localiza-se uma sequência de nove nucleotídeos (5'-TAATATTAC-3') conservada entre todos os geminivírus, onde se localiza o domínio funcional da origem de replicação (OROZCO; HANLEY-BOWDOIN, 1996). Entretanto, vale salientar que um nonanucleotídeo não usual (5'-TAGTATTAC-3') foi relatado no begomovírus *Malvaviscus yellow mosaic virus* (MYMV), obtido a partir de hospedeiros ornamentais da família *Malvaceae* (LIMA et al., 2011). Este nonanucleotídeo é clivado durante o início da replicação viral e se localiza num contexto de 30 nucleotídeos capazes de formar uma estrutura em forma de grampo. Embora a sequência de 30 nucleotídeos varie entre espécies de geminivírus, a estrutura em forma de grampo está sempre presente, sendo considerado um elemento conservado estruturalmente (FARIA & ZERBINI, 2000). A transcrição é bidirecional tanto no componente A, que codifica genes envolvidos na replicação e encapsidação viral, quanto no componente B, que codifica genes envolvidos na movimentação do vírus da planta (Figura 1; TIMMERMANS; DAS; MESSING, 1994; BROWN, 1997; FARIA et al., 2000).

No componente A, um gene é transcrito no sentido viral denominado *CP* que codifica para a proteína da capa proteica (CP), e quatro, no sentido complementar *Rep*, *TrAP*, *Ren* e *C4*, que codificam, respectivamente para a proteína associada à replicação [*Replication associated Protein* (Rep)], a proteína da transcrição [*Trans-Acting Protein* (TrAP)], uma proteína que aumenta a replicação do genoma viral [*Replication Enhancer* (REn)] e uma proteína envolvida na supressão do silenciamento gênico. (C4), (FARIA & ZERBINI, 2000).

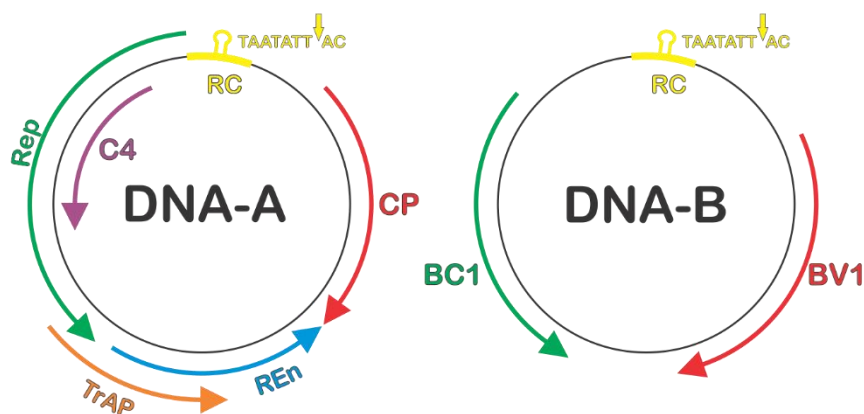


Figura 1. Representação esquemática do genoma do *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV), espécie-tipo do gênero *Begomovirus*. Os círculos representam o genoma viral, com dois componentes (DNA-A e DNA-B) de aproximadamente 2.600 nucleotídeos cada. Uma sequência de aproximadamente 200 nucleotídeos, denominada região comum (RC), 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 coloridas indicam os genes virais e o sentido em que ocorre a transcrição (viral – sentido horário e complementar – sentido anti-horário).

A função da capa proteica (CP) está relacionada com a proteção do genoma contra degradação, aquisição do vírus e transmissão por insetos vetores, infectividade e movimento sistêmico. A proteína CP é determinante da especificidade da transmissão do vírus e na interação entre o vírus e a planta hospedeira, parece ainda estar associada com o desenvolvimento de sintomas (GARDINER et al., 1998). Foi experimentalmente demonstrado que a troca do gene *CP* do *African cassava mosaic virus* (ACMV), um begomovírus transmitido por mosca-branca, pelo correspondente do *Beet curly top virus* (BCTV), um curtovírus transmitido por cigarrinha, resultou na alteração da especificidade do inseto vetor (BRIDDON et al., 1990).

O produto do gene *Rep* é uma enzima com propriedades de ligação a ácidos nucléicos e de endonucleases. A função da proteína Rep é de se ligar ao sítio de iniciação da replicação viral e cortar uma das fitas de DNA iniciando o processo (FONTES; LUCKOW; HANLEY-BOWDOIN, 1992). Rodríguez-Negrete e colaboradores (2013) sugerem que a Rep exibe atividade supressora dos mecanismos de silenciamento gênico da planta reduzindo a expressão das metiltransferases [metiltransferase 1 (MET1)], e junto com a proteína AC4 regula a crometilase (CMT3) reduzindo a metilação do DNA viral em sítios GC.

A proteína TrAP, codificada pelo gene *trap*, é um fator de transcrição, que atua nos promotores de genes de sentido viral (*CP* e *NSP*). Portanto os transcritos correspondentes a estes genes só são observados na célula após a expressão de *trap* (SUNTER & BISARO, 1992). Outra função da *trap* pode ser a de interagir com proteínas do hospedeiro relacionadas com a defesa, como a adenosina kinase (ADK) e SNF1 (SUNTER et al., 2001)

A proteína REn, codificada pelo gene *REn*, é um fator de amplificação da replicação viral. Embora não seja essencial para que a replicação ocorra, o acúmulo de DNA viral é muito maior quando esta proteína está presente (ZERBINI; CARVALHO; MACIEL-ZAMBOLIM, 2002). Estudos envolvendo mutações nesta proteína têm mostrado retardamento e atenuação de sintomas (ELMER et al., 1988; ETESSAMI et al., 1991). Há a possibilidade de que a REn direcione a Rep para o domínio de ligação Rep/DNA viral no local de clivagem no início da replicação (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999).

A C4 é responsável por contrariar a resposta do hospedeiro à ação da Rep (Revisado por ROJAS et al, 2005; STANLEY et al, 2005), além disso é um importante fator na determinação dos sintomas, estando comprometida no controle do ciclo celular, podendo se envolver com outras proteínas virais e interagir com proteínas envolvidas com o processo de ubiquinização pelo hospedeiro na tentativa de garantir o avanço da infecção, (CASTILLO et al., 2004; EINI et al., 2009; LOZANO-DURAN e BEJARANO, 2011; LOZANO-DURÁN, ROSAS-DÍAZ, GUSMAROLI, et al., 2011; SÁNCHEZ-DURÁN et al., 2011; ZHANG et al., 2011)

No componente B, no sentido viral o gene *NSP* codifica uma proteína que realiza o transporte do DNA através do envelope nuclear [*Nuclear Shuttle Protein* (NSP)], e no sentido complementar o gene *MP* codifica a proteína de movimento [*Movement Protein* (MP)] com funções de movimento célula-a-célula (FARIA; ZERBINI, 2000; ZERBINI; CARVALHO; MACIEL-ZAMBOLIN, 2002). Acredita-se que o transporte célula-a-célula é realizado por um complexo: MP – DNA – NSP (HEHNLE et al., 2004).

2.3 Replicação viral

No processo de infecção dos geminivírus, o inseto vetor deposita as partículas virais (ssDNA) nas células floemáticas do hospedeiro (LAZAROWITZ, 1992). O genoma viral se dissocia da CP de forma espontânea e é transportado até o núcleo das

células hospedeiras com o auxílio da proteína de tráfego. Uma vez dentro do núcleo, ocorre a replicação do genoma viral (LAZAROWITZ, 1992; STANLEY et al., 1995).

A replicação se inicia com a síntese de uma fita complementar de DNA gerando um intermediário de fita dupla denominado “forma replicativa” (FR). A maneira como esta conversão ocorre não é conhecida, no entanto evidências indiretas, como a necessidade de desestabilização local do dsDNA para o iniciação da replicação por círculo rolante em procariotos por “*strand-nicking enzymes*” indicam que é realizada por fatores do hospedeiro (STENGER et al., 1991; STANLEY et al., 1995; ZERBINI; CARVALHO; MACIEL-ZAMBOLIN, 2002). Essa forma replicativa acumula-se em grandes concentrações na célula infectada e atua como molde para a síntese de novos componentes genômicos e também para transcrição de genes virais (LAUFS et al., 1995; HEYRAUD-NITSCHKE et al., 1995; STANLEY, 1995).

A FR serve como molde para síntese dos novos componentes genômicos que ocorre por meio do mecanismo de “círculo rolante”, semelhante ao utilizado pelos bacteriófagos ϕ X174 e M13 (ZERBINI; CARVALHO; MACIEL-ZAMBOLIN, 2002). A origem de replicação viral (*ori*) está localizada na região comum (RC), onde se encontra a sequência conservada em forma de grampo (“*structurally-conserved element*”, SCE) denominada nonanucleotídeo (5'-TAATATTAC-3'), no qual ocorre a clivagem (TAATATT↓AC) realizada pela proteína Rep, que atua como uma endonuclease, iniciando assim o processo de replicação por círculo rolante. A replicação ocorre da mesma forma para o DNA-B (LAUFS et al., 1995; FARIA; ZERBINI, 2000; STANLEY et al., 2005).

Na região comum encontram-se as sequências específicas para ligação da proteína Rep (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). Após a ligação da Rep ao DNA viral e estabilização do complexo formado por Rep, Ren e fatores do hospedeiro, a proteína Rep cliva o nonanucleotídeo localizado na SCE, dando início à replicação por círculo rolante (GUTIERREZ, 1999). O reconhecimento pela proteína Rep é considerado vírus-específico (HARRISON; ROBINSON, 1999; RAMOS et al., 2003). Após o estágio inicial, os fatores necessários para completar a fase de círculo rolante são de origem celular (GUTIERREZ et al., 2004). O último estágio é a produção e a encapsidação do ssDNA genômico circular maduro em partículas virais (GUTIERREZ, 1999).

Há outro mecanismo para a replicação dos geminivírus, conhecido como Replicação Dependente de Recombinação (RDR), o qual foi proposto a partir da 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). Posteriormente, esses intermediários também foram observados nos geminivírus *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 geral entre esses vírus. Além disso, também já foram encontrados indícios que sugerem que DNA's satélites associados ao *Tomato leaf curl virus* (ToLCV), bem como a CLCuD (“*cotton leaf curl disease*”), também replicam via RDR, concomitantemente à via de círculo rolante (ALBERTER et al., 2005).

O início da RDR se dá quando uma molécula incompleta de ssDNA interage com um DNA circular covalentemente fechado (“*covalently closed circular*” cccDNA), em um sítio de recombinação homólogo. O ssDNA é então alongado tendo como molde o cccDNA, sintetizando-se assim um ssDNA completo, que então será molde para a síntese da fita complementar. Ainda não está bem esclarecido se o mecanismo é direcionado pelas proteínas do hospedeiro, ou se depende das proteínas virais. Contudo, há indícios de que TrAP e REn não são essenciais (JESKE et al., 2001). O modelo RDR explica diversos fenômenos biológicos relacionados aos geminivírus, como a rápida e frequente recombinação. Além disso, a RDR poderia fornecer vantagens adaptativas. Se a replicação viral normal for obstruída pela falta de nucleotídeos, digestão do DNA viral pelas enzimas do hospedeiro ou conflitos entre replicação e transcrição, as moléculas de DNA incompletas podem ser recuperadas pela recombinação homóloga e serem convertidas em genomas virais completos (JESKE et al., 2001).

Normalmente, os vírus infectam células vegetais já diferenciadas, ou seja, que não estão em processo de síntese de DNA, sendo assim capazes de ativar a transcrição dos genes da hospedeira que estão envolvidos na síntese das proteínas que necessitam. Esse processo resulta em sintomas severos causados por esses vírus. Outro fator relacionado à expressão de sintomas é a movimentação célula-a-célula do vírus, que leva a um desarranjo do transporte intercelular, levando ao surgimento de sintomas da infecção (FARIA; ZERBINI, 2000).

2.4 Variabilidade e estrutura genética de populações de begomovírus

A análise da diversidade e estrutura genética de populações é crucial para uma melhor compreensão da evolução e interação do vírus com as plantas hospedeiras. As principais fontes que determinam a variação e modificam a estrutura genética das populações dos vírus em plantas são: mutação, recombinação e pseudorecombinação (GARCIA-ARENAL; FRAILE; MALPICA, 2003). 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).

A geração de diversidade genética entre vírus de plantas fornecem novas oportunidades para adaptação a novos hospedeiros e a mudanças nas condições ambientais (ROOSSINCK, 1997). A ocorrência de eventos de recombinação e pseudorecombinação entre begomovírus bissegmentados e a alta taxa de mutação contribuem para o elevado grau de diversidade observado neste grupo de vírus (PADIDAM; SAWYER; FAUQUET, 1999; ANDRADE et al., 2006; DUFFY; HOLMES, 2009). A ocorrência de infecção mista facilita a ocorrência de recombinação, bem como de pseudorecombinação, contribuindo para a emergência de novas espécies de begomovírus (ZHOU et al., 1997; FONDONG et al., 2000).

2.4.1 Mutação

Assim como para todos os vírus, a evolução dos geminivírus depende primariamente de mutações. Há evidências de que a rápida evolução dos geminivírus é, ao menos em parte, dirigida por processos mutacionais que agem especificamente sobre ssDNA (HARKINS et al., 2009). O impacto das mutações pontuais tem sido estudado nesse grupo de vírus sob diferentes condições de seleção, como presença de um efeito gargalo (população inicial pequena do vírus, período curto de aquisição pelo vetor), transferências sucessivas entre hospedeiros sem emprego do vetor, e inoculação 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 $1,33 \times 10^{-4}$ subs/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 (DUFFY; HOLMES, 2009). 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 as taxas de evolução indicadas para essas duas espécies de begomovírus, entre 10^{-3} e 10^{-5} , corroboram em geral aquelas determinadas experimentalmente para *Mayze streak virus* (MSV), (HARKINS et al., 2009) e *Tomato yellow leaf curl China virus* (TYLCCNV); (GE et al., 2007). Os dados obtidos por Rocha e colaboradores (2013), analisando begomovírus brasileiros bipartidos, mostraram altas taxas de substituições de nucleotídeos por sitio por ano e que as regiões do genoma que apresentam maiores taxas são da região intergênica e do gene CP, corroborando os dados obtidos por Duffy e Holmes (2009).

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

A recombinação pode ocorrer em genomas de DNA e RNA e desempenham um papel importante na evolução dos vírus de plantas (GARCIA-ARENAL et al., 2001). Por recombinação, os vírus podem adquirir novas informações genéticas a partir de outros vírus ou ainda a partir do hospedeiro (PADIDAM; BEACHY; FAUQUET, 1999). Os vírus, através da recombinação, conseguem ainda resgatar características perdidas por mutações através de trocas genéticas com genomas do tipo selvagem (MAKINO et al, 1986).

A recombinação é um evento 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). A recombinação tem sido destacada 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).

Eventos de recombinação têm sido diretamente implicados na emergência de novas doenças e epidemias em plantas cultivadas. Essas incluem a epidemia devastadora do mosaico da mandioca (*Manihot esculenta*), causada pelo recombinante EACMV na Uganda e países vizinhos (PITA et al., 2001); as epidemias do complexo TYLCV na Bacia Ocidental do Mediterrâneo, com o surgimento dos recombinantes *Tomato yellow leaf curl Malaga virus* (TYLCMaV) e *Tomato yellow leaf curl Axarquia virus* (TYLCAxV) nos campos de tomate na Espanha; e as epidemias de *Cotton leaf curl virus* (CLCuV) no Paquistão causadas por um complexo de espécies incluindo diversos begomovírus recombinantes (IDRIS; BROWN, 2002; MONCI et al., 2002).

Recentemente, Serfraz e colaboradores (2015) relataram no Paquistão um novo begomovírus denominado *Okra enation leaf curl virus* (OELCuV). Esse begomovírus aparece associado com *Ageratum conizoides simthomless alphassatelite* (AConSLA), formando o complexo *Okra enation leaf curl disease* (OELCuD). Os autores sugerem que o esse novo begomovírus é resultado de recombinação entre *Bhendi yellow vein mosaic virus* (BYVMV) e *Cotton leaf curl Multan virus* (CLCuMV), mais precisamente na região que codifica a proteína Rep.

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

Os mecanismos precisos que controlam a recombinação em begomovírus permanecem desconhecidos (PADIDAM; 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).

Diversos tipos de recombinantes podem surgir, o que reforça a importância da recombinação como fonte de diversidade genética em begomovírus. O potencial observado por esses vírus para gerar novos variantes genéticos através da recombinação poderia explicar em parte a sua capacidade de adaptação e surgimento na natureza (FARGETTE et al, 2006).

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).

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).

Embora a pseudorecombinação seja comum entre estirpes de uma mesma espécie de begomovírus, a formação de pseudorecombinantes viáveis entre espécies distintas é mais difícil (HOFER, et al. 1997a; UNSELD, 2000; GARRIDO-RAMIREZ et al, 2000).

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

Outro pseudorecombinante foi obtido entre o DNA-A do *Abutilon mosaic virus* (AbMV) e o DNA-B do *Sida golden mosaic Costa Rica virus* (SiGMCRV), porém o pseudorecombinante recíproco não foi infeccioso (HOFER et al., 1997b). Similarmente, um pseudorecombinante viável foi formado pelo DNA-A de um isolado de *Sida golden mosaic virus* (SiGMV) de Honduras [SiGMV-(Ho_{yv})] e o DNA-B do SiGMCRV. Entretanto, dentre os pseudo-recombinantes recíprocos formados pelo DNA-A do SiGMCRV combinado ao DNA-B de três isolados de SiGMV-[Ho_{yv}] que possuíam pequenas diferenças na composição de nucleotídeos, apenas um mostrou-se viável, porém pouco eficiente, e não foi capaz de infectar a planta a partir da qual foi originalmente isolado (UNSELD et al., 2000).

Pseudorecombinantes infecciosos foram formados entre o DNA-A do TGMV e o DNA-B do ToYSV, que possuem iterons similares. A não formação do pseudorecombinante recíproco sugere que a proteína Rep do TGMV tem maior versatilidade em termos de reconhecimento de componentes de DNA heterólogos comparada à do ToYSV (ANDRADE et al., 2006).

A viabilidade de pseudorecombinantes indica que fatores envolvidos na replicação e movimento são intercambiáveis entre espécies altamente relacionadas ou entre estirpes de uma mesma espécie. A assimetria entre pseudorecombinantes recíprocos indica que a pseudorecombinação entre begomovírus é um fenômeno complexo que envolve interações entre fatores do vírus e do hospedeiro (HILL et al., 1998).

2.5 Diversidade de begomovírus infectando plantas cultivadas e plantas daninhas no Brasil

As begomoviroses são doenças de grande importância econômica em diversas espécies vegetais cultivadas em regiões tropicais e subtropicais, como feijão (*Phaseolus vulgaris*), mandioca (*Manihot esculenta*), algodão (*Gossypium* sp.), tabaco (*Nicotiana tabacum*) e tomate (*Solanum lycopersicum*), resultando em perdas significativas (GRAHAM et al., 2010).

No Brasil, as culturas mais prejudicadas por begomovírus são feijoeiro e tomateiro. Em feijão, os begomovírus provocam perdas econômicas que podem variar de 30% a 100%, dependendo da cultivar, estágio de infecção da planta, população do vetor, presença de hospedeiros alternativos e condições ambientais (QUINTELA et al., 2008; MORALES, 2010). Em estudos da infecção de plantas de tomate por begomovírus foi observada uma redução de aproximadamente 60% na produtividade, sendo essa redução causada principalmente pela redução significativa do número médio de frutos por planta (GIORDANO et al., 2005).

Begomovírus que infectam feijoeiro (*Phaseolus* spp.) são distribuídos através das Américas, sendo sua incidência 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). Estudos moleculares demonstraram que vírus distintos causavam o mosaico dourado do feijoeiro no Brasil, na América Central e Caribe (FARIA et al., 1994). A denominação atual para a espécie viral encontrada no Brasil é o BGMV, enquanto a espécie encontrada na América Central e Caribe manteve o BGYMV.

Ramos-Sobrinho e colaboradores (2014) analisando populações do BGMV e MaYSV em hospedeiros cultivados (*Phaseolus vulgaris* e *P. lunatus*) e não-cultivado (*Macroptilium lathyroides*), observaram que para cada espécie de begomovírus a variação é similar nos hospedeiros cultivados e não-cultivado, o que parece indicar que os hospedeiros não afetam a variabilidade genética desses vírus. Neste trabalho, os autores também observaram um alto grau de variabilidade nas populações de MaYSV, em comparação com as populações de BGMV, mas atribuem esse fato aos numerosos eventos de recombinação em MaYSV. Foi sugerido ainda que a distribuição geográfica dos hospedeiros influencia na estrutura genética de subpopulações do BGMV, mas não de MaYSV.

O primeiro relato de geminivírus em tomateiro no Brasil ocorreu em 1975, no qual o agente etiológico foi caracterizado como *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), como sendo transmitido pela “mosca-branca” (COSTA, 1975). Nos anos seguintes, observou-se aumento na incidência e perdas de produção causadas por este grupo de vírus em outras regiões produtoras. A presença de begomovírus foi posteriormente observada infectando tomateiros nos Estados de Minas Gerais (ZERBINI et al., 1996), São Paulo (FARIA et al., 1997) e em outros Estados produtores de tomate (BEZERRA et al., 1996; RIBEIRO et al., 1996; FARIA et al., 2000). No Submédio do Vale São Francisco, infecção por begomovírus em tomateiro causaram perdas estimadas em até 100% em algumas áreas (LIMA; HAJI, 1998).

A incidência da infecção por begomovírus em tomateiro tem aumentado significativamente devido a introdução do Biótipo B da *Bemisia tabaci* no início da década de 1990. Desde então, onze espécies definidas de begomovírus foram descritas: *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato mild mosaic virus* (ToMIMV), *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV), *Tomato mottle leaf curl virus* (TMoLCV), *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV), *Tomato interveinal chlorosis virus* (ToICV) e *Tomato golden vein virus* (TGVV) (FLORES et al., 1960; MATYIS et al., 1975; FERNANDES et al., 2006; RIBEIRO et al., 2007; CALEGARIO et al., 2007; FERNANDES et al., 2008; CASTILLO-URQUIZA et al., 2008; ALBUQUERQUE et al., 2012; RIBEIRO et al., 2003;).

Segundo Castillo-Urquiza et al. (2008) amostras de tomateiro e plantas daninhas coletadas nos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais indicaram a prevalência do

ToYVSV e de uma nova espécie denominada *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV). Além disso, mais cinco novas espécies foram identificadas, duas infectando tomateiro [*Tomato mild mosaic virus* (ToMIMV) e *Tomato leaf distortion virus* (ToLDV)] 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)]. Rocha et al. (2013) trabalhando com espécies de begomovírus infectando tomateiro, hospedeiros não-cultivados e espécies podendo infectar ambos os tipos de hospedeiros concluiu, com base em evidências de recombinação, que as espécies identificadas no tomateiro tem prováveis parentais nos hospedeiros não-cultivados e que as vírus deste tipo de hospedeiro são geneticamente mais variáveis do que os predominantemente encontrados em tomateiro.

Em pimentão, o primeiro relato de begomovírus no Brasil foi feito por Lima et al. (2001), que verificaram um total de 43,8% de infecção nas amostras da cultivar S-59 e o híbrido Tango coletadas nos municípios de Curaçá (Bahia) e Petrolina (Pernambuco) no Submédio do Vale São Francisco, causando, em média, 20% de perda na produção.

Paprotka et al. (2010) estudaram a diversidade genética de begomovírus presentes em acessos de batata-doce naturalmente infectados num Banco de Germoplasma brasileiro. Duas novas espécies foram identificadas, *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*, “pegadas” de recombinações anteriores em seus genomas, ressaltando o risco do surgimento de novos begomovírus no material propagado vegetativamente no Banco de Germoplasma.

Além de plantas cultivadas, muitas espécies de plantas invasoras têm sido relatadas como hospedeiras de *Begomovirus* em vários países, inclusive no Brasil (IDRIS et al., 2003; JOVEL et al., 2004; VARSANI et al., 2009; FIALLO-OLIVE et al., 2010; MUBIN et al., 2010). As espécies relatadas geralmente pertencem a Malvaceae, Euphorbiaceae e Fabaceae (MORALES & ANDERSON, 2001; ASSUNÇÃO, 2006). Alguns estudos demonstraram casos em que *Begomovirus* provenientes de plantas invasoras podem ser transmitidos para espécies cultivadas

através do inseto-vetor ou mediante inoculação via extrato vegetal tamponado (FRISCHMUTH et al., 1997; MORALES; ANDERSON, 2001).

No Brasil, diversos trabalhos foram realizados com o objetivo de caracterizar molecularmente isolados de begomovírus que infectam plantas silvestres e/ou daninhas, sobretudo em associação às culturas do feijoeiro e do tomateiro (RIBEIRO et al., 1998; FARIA; MAXWELL, 1999; CASTILLO-URQUIZA et al., 2008; LIMA et al., 2013; ROCHA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). 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; LIMA et al., 2013; ROCHA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014).

Ambrozevicius e colaboradores (2002) analisando a variabilidade genética de begomovírus infectando tomateiros e algumas plantas daninhas associadas na região Sudeste do Brasil, observaram que os isolados de begomovírus obtidos a partir de plantas de tomate e espécies daninhas aproximavam-se filogeneticamente, sugerindo que os hospedeiros naturais têm um importante papel como reservatório de espécies de begomovírus, e que os vírus de tomate podem ter evoluído a partir de plantas daninhas, devido principalmente a recombinações e pseudorecombinações. O *Sida mottle virus* (SiMoV), obtido originalmente de plantas de *Sida rhombifolia* coletadas em Viçosa, MG (FERNANDES et al., 1999), foi também encontrado em plantas de tomateiro na Zona Metalúrgica no estado de Minas Gerais (CALEGARIO, 2004), dando suporte a hipótese de que begomovírus de tomate podem ter evoluído a partir de begomovírus infectando hospedeiros silvestres

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 yellow 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, 2010a).

Um novo begomovírus, *Abutilon mosaic Brazil virus* (AbMBV), foi identificado infectando *Abutilon* sp. no estado da Bahia. Análises filogenéticas demonstraram que

ambos os componentes genômicos são distintos da espécie clássica, *Abutilon mosaic virus* (AbMV) originária do oeste da Índia. Além disso, inoculação via biobalística comprovou sua transmissão para *Malva parviflora*, a qual desenvolveu sintomas característicos de clareamento de nervuras e mosaico (PAPROTKA; METZLER; JESKE, 2010a).

Silva et al. (2011; 2012) observaram uma alta diversidade de espécies em begomovírus infectando hospedeiras leguminosas silvestres tais como *Macroptilium spp.*, enquanto uma única espécie viral foi detectado na espécie não-cultivada *Cleome affinis*.

Almeida (2012) identificou a presença de infecção por begomovirus bipartidos em três espécies de Malváceas: *Sidastrum micranthum*, algodão (*Gossypium hirsutum*) e *Malvaviscus arboreus*. Amostra de *S. micranthum* apresentando 69% de identidade de nucleotídeos com *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV), sugerindo assim uma nova espécie de begomovírus. Já amostras de algodão apresentaram 78% de identidade (DNA-A) com *Tomato mosaic comum virus* (ToCMV) e 64% (DNA-B) com *Cabbage leaf curl virus* (CabLCV) e *Rhyncosia rugose golden mosaic virus* (RhRGMV). Na planta ornamental *Malvaviscus arboreus*, a sequência nucleotídica do DNA-A e do DNA-B apresentaram porcentagem de identidade de 78% e 74% com *Abutilon mosaic Bolivia virus* (AbMBoV), respectivamente. Estes resultado evidenciam que novas espécies de begomovírus estão ocorrendo em plantas daninhas, cultivadas e ornamentais pertencente à família *Malvaceae* no Brasil. O que pode ser corroborado pelo trabalho de Tavares et al., (2012), os quais identificaram quatro novas espécies de begomovírus infectando diferentes espécies de *Sida*, para as quais os seguintes nomes foram propostos: *Sida yellow net virus* (SiYNV) obtido de *Sida micrantha*, *Sida mottle Alagoas virus* (SiMoAV) obtido de *S. urens* e *Sida sp.*, *Sida yellow blotch virus* (SiYBV) e *Sida yellow mosaic Alagoas virus* (SiYMAV) obtidos de *S. urens*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta do material vegetal

Amostras foliares de *Euphorbia heterophylla* (família Euphorbiaceae) apresentando sintomas típicos de infecção por begomovírus como mosaico, amarelecimento, nanismo e deformação foliar foram coletadas no estado da Paraíba (PB) em maio de 2014 (Tabela 1). Para cada amostra os seguintes dados foram obtidos: espécie de planta, data da coleta, coordenadas de GPS do local de coleta e sintomas (descrição e imagem digital da amostra no momento da coleta). As amostras foram herborizadas e estocadas em temperatura ambiente. Dezenove sequências obtidas em Santo Antônio de Goiás (GO) em 2012 foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Murilo Zerbini e o Dr. Roberto Ramos (Tabela 2). Outras vinte sequências foram obtidas a partir do banco de dados não-redundante de nucleotídeos Genbank (Tabela 3).

3.2 Extração de DNA, amplificação e clonagem dos genomas virais

O DNA total foi extraído a partir do material vegetal herborizado de acordo com Doyle e Doyle (1987). Os componentes genômicos virais presentes nas amostras foram amplificados utilizando-se a enzima DNA polimerase do bacteriófago phi29 de acordo com o método descrito por Inoue-Nagata et al. (2004). Alíquotas das amplificações foram submetidas, individualmente, a clivagens com a enzima de restrição *HindIII*. Os produtos das reações de digestão foram então analisados em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídeo (5 µg/mL) e visualizados sob luz UV. Alíquotas das reações de clivagem contendo fragmentos de ~2600 nucleotídeos, correspondentes a uma cópia de cada componente genômico, foram utilizadas para ligação ao vetor pBluescript KS+ (Stratagene) previamente linearizado com a mesma enzima e defosforilado. Os produtos das reações de ligação foram utilizados 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), e o padrão eletroforético do DNA

plasmidial digerido com a enzima utilizada para clonagem foi utilizado para confirmação da 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

Os genomas virais completos foram montados utilizando-se o programa *CodonCode Aligner* v. 4.1.1 (www.codoncode.com). As sequências obtidas foram inicialmente comparadas, através do algoritmo BLASTn (ALTSCHUL et al., 1990) e a base de dados de nucleotídeos do GenBank, a fim de se determinar com quais espécies virais elas compartilham maior identidade. As sequências similares do GenBank (Tabela 3) foram utilizadas para classificação dos isolados obtidos nesse trabalho utilizando-se o programa *Sequence Demarcation Tool* v. 1.0 (MUHIRE et al., 2013).

3.4 Análise filogenética

Alinhamentos múltiplos de sequências nucleotídicas foram preparados para o DNA-A e para as sequências das regiões genômicas codificando as proteínas Rep e CP utilizando-se o algoritmo MUSCLE (EDGAR, 2004) e ajustadas manualmente no pacote MEGA6 (TAMURA et al 2013). Árvores filogenéticas de Máxima Verossimilhança foram inferidas para os conjuntos de dados DNA-A, Rep e CP utilizando-se o programa RAxML v. 7.0.3 (STAMATAKIS, 2006) assumindo *General Time Reversible* (GTR) como modelo de substituição de nucleotídeos e modelo Gamma (G) para distribuição da heterogeneidade. A robustez de cada ramo foi estimada a partir de 1000 repetições e as árvores foram visualizadas e editadas nos programas FIGTREE (ztree.bio.ed.ac.uk/software/figtree), Inkscape (<https://inkscape.org/pt/>) e CorelDraw (CorelDRAW® Graphics Suite X7 Copyright © 1989-2014 Corel Corporation).

3.5 Estrutura genética e índices de variabilidade

Inferências sobre a estrutura genética das subpopulações foram baseadas no índice de fixação F de Wright (WRIGHT, 1951), calculado usando o programa DnaSP v. 5.10 (ROZAS et al., 2003). A estrutura das subpopulações foi testada de acordo com a localização geográfica dos hospedeiros. A média das diferenças de nucleotídeos por

sítio (π) foi estimada para os conjuntos de dados DNA-A, Rep e CP em cada população/subpopulação utilizando-se DnaSP v. 5.10.

3.6 Análises de recombinação

Possíveis locais (*breakpoints*) de recombinação no DNA-A foram determinados utilizando-se os métodos RDP, Geneconv, Boot-scan, Maximum Chi Square, Chimaera, SisterScan e 3Seq implementados no pacote RDP v. 3.44, (MARTIN et al., 2010). Os alinhamentos foram analisados 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 três diferentes métodos foram considerados confiáveis. Evidência de evolução em rede foi avaliada utilizando-se o método Neighbor-Net implementado no programa SplitsTree v. 4.10 (HUSON; BRYANT, 2006).

3.7 Análise de seleção

Para detectar sítios sob pressão de seleção positiva e negativa, os conjuntos de dados para Rep e CP foram analisados utilizando-se o método baseado em ML disponível no servidor DataMonkey (www.datamonkey.org): *Single-Likelihood Ancestor Counting* (SLAC; SERGEI et al, 2005).

4 RESULTADOS

4.1 Demarcação de espécie

Usando análise de comparações pareadas e o critério de $\geq 91\%$ de identidade para sequências completas do componente genômico DNA-A (BROWN et al., 2013), os dez isolados obtidos neste trabalho foram classificados em uma única espécie de begomovírus: *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV; Figura 2). A porcentagem de identidade de nucleotídeos variou entre 96,4-100% entre os isolados de EuYMV.

4.2 Filogenia

Análise filogenética mostrou que as árvores de ML para os conjuntos de dados DNA-A, CP e Rep são bastante similares, porém com algumas incongruências topológicas. Na filogenia para o DNA-A, pode-se observar a formação de dois grupos principais (Grupos 1 e 2), correlacionados com a origem geográfica dos isolados [Grupo 1 com isolados a partir da região Centro-Oeste (CO), e Grupo 2 com isolados predominantemente da região Nordeste (NE)] (Figura 3). Estruturação biogeográfica foi então confirmada pelo alto valor observado de *Fst* (0,65). Entretanto, um isolado, proveniente de Florestal estado de Minas Gerais (número de acesso KC706530) agrupou com isolados do NE (Figura 3), o que pode estar relacionado com possíveis eventos de migração atuando no processo evolutivo de subpopulações do EuYMV nestas regiões. Quando analisadas as filogenias para os conjuntos de dados CP e Rep, pode-se observar que o isolado de Florestal agrupa-se com isolados provenientes da região CO para a região genômica CP (Figura 4), enquanto na filogenia para o gene Rep, pode-se observar além do isolado de Florestal, pelo menos três outros isolados provenientes do CO agrupando com isolados do NE (Figura 5). Esses resultados podem indicar para possíveis eventos de recombinação entre os isolados de EuYMV, hipótese que ganha maior força através da análise reticulada (ver abaixo).

4.3 Diversidade genética

Os índice de diversidade nucleotídica (π) para os isolados de EuYMV foi maior, em todos os conjuntos de dados (DNA-A, CP e Rep), quando comparada a população

total com as subpopulações baseadas em localização geográfica, sendo a subpopulação do CO ligeiramente mais diversa que a do NE (Tabela 4). Quando analisada a variabilidade dentro das subpopulações, pode ser observado que π apresenta valores semelhantes para os conjuntos de dados DNA-A, CP e Rep, indicando que a diversidade nucleotídica está uniformemente distribuída ao longo do genoma.

4.4 Recombinação

Análise reticulada para os conjuntos de dados DNA-A, CP e Rep mostrou evidência de eventos de recombinação influenciando a evolução de isolados de EuYMV (Figuras 6, 7 e 8). A formação de rede é mais evidente entre alguns isolados compondo a subpopulação do NE e isolados a partir do CO, como já evidenciado pela análise filogenética. É também evidente a atuação de eventos de mutação sobre os isolados de EuYMV após os possíveis eventos de recombinação, indicando que estes eventos podem não ser recentes (Figuras 6, 7 e 8). Detecção de possíveis eventos de recombinação no conjunto de dados de DNA-A mostrou um único evento, com pontos de recombinação Região Comum (RC) e interface Trap e Ren do isolado FJ619507, proveniente do estado de Goiás (Tabela 5), e para o qual análise reticulada evidenciou uma possível origem recombinante (mais evidente no gene Rep; Figura 8).

4.5 Análise de seleção

A análise dos conjuntos de dados para as regiões genômicas codificando os genes CP e Rep do EuYMV mostraram que a pressão de seleção negativa ou purificadora é a principal força seletiva agindo sobre essas populações. Utilizando o programa SLAC, nenhum sítio foi identificado sob pressão de seleção positiva para a ORF CP, porém 13 sítios foram identificados sob pressão de seleção negativa. Para o conjunto de dados Rep, um sítio foi identificado sob pressão de seleção positiva (sítio 39), e 16 sob seleção negativa (Tabela 6). A razão de taxa de substituições não-sinônimas sobre substituições sinônimas (dN/dS) foi de 0,12 para CP e 0,29 para Rep, confirmando a seleção purificadora.

5 DISCUSSÃO

Costa e Bennett (1950) descreveram um vírus induzindo sintomas de mosaico em plantas de *Euphorbia prunifolia* 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). Recentemente, foi realizada caracterização molecular de um begomovírus infectando *Euphorbia heterophylla* no Brasil, 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 um isolado de EuMV do México, sendo portanto considerado como uma espécie nova: *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV; FERNANDES et al., 2011). Desta forma, é provável que plantas da família Euphorbiaceae venham sendo descritas no Brasil como hospedeiras de begomovírus desde 1950. A partir desses resultados, pode-se afirmar que a espécie EuYMV encontrada em *E. heterophylla* no Brasil é distinta dos begomovírus que infectam hospedeiros da mesma família nas Américas Central e do Norte, e que essa espécie provavelmente se originou dessa região, podendo ter descendido de isolados de EuMV.

A maioria dos isolados de EuYMV descritos até o momento foram obtidos a partir de plantas do gênero *Euphorbia*. Entretanto, essa espécie já foi relatada infectando naturalmente *Macroptilium atropurpureus*, *Sida santaremensis*, *Crotalaria juncea* e *Solanum lycopersicum* no Brasil (BARRETO et al, 2013; TAVARES et al, 2012; SILVA et al, 2011). Apesar desse begomovírus 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.

Rocha et al, (2013) trabalhando com begomovírus que infectam tomateiros e plantas daninhas observaram que populações eram estruturadas segundo localização geográfica, e que tais populações apresentavam alta variabilidade genética. Estruturação biogeográfica foi observada em populações do begomovírus *Bean golden mosaic virus* (BGMV) infectando diferentes espécies de leguminosas (RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Resultados semelhantes foram obtidos aqui, onde subpopulações do EuYMV foram estruturadas segundo região geográfica de coleta. Esta estruturação pode estar

relacionada com a proximidade geográfica a partir de onde os isolados de EuYMV foram obtidos, o que permitiria maiores taxas de fluxo gênico, mediado pelo inseto vetor, em populações fisicamente mais próximas. Vale ressaltar que isolados no Grupo 1 são provenientes de diferentes espécies hospedeiras, indicando que essa estruturação populacional deve ser realmente baseada em geografia e não em espécie de planta hospedeira. Juntos, esses trabalhos corroboram as afirmações de Brown et al. (2012) de que a estruturação de populações (e filogenia) dos begomovírus baseia-se principalmente na localização geográfica, e não na espécie de hospedeiro.

Os principais mecanismos evolutivos determinando a distribuição da variabilidade genética em populações virais são mutação e recombinação (GARCIA-ARENAL; FRAILE; MALPICA, 2003). Foi observado anteriormente que os altos índices de variabilidade genética observados em algumas populações de begomovírus estão diretamente relacionados à ocorrência de eventos frequentes de recombinação (LIMA et al., 2013; ROCHA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). No presente trabalho, a maior variabilidade genética para a população total de EuYMV pode estar relacionada com o fato de as subpopulações estarem estruturadas de acordo com origem geográfica e, portanto, os valores observados referem-se à variabilidade interpopulacional. Quando analisadas as subpopulações individuais, a do Centro-Oeste apresenta índices ligeiramente maiores que a do Nordeste. Entretanto, vale salientar que a subpopulação do Centro-Oeste é composta por um número três vezes maior de isolados, e evidência de recombinação foi observada apenas em isolados representados nesta subpopulação, o que poderia explicar a maior variabilidade genética. Em comparação com outras espécies de begomovírus, as subpopulações de EuYMV analisadas neste trabalho mostraram índices de diversidade genética similares a outras populações onde evidência de recombinação não foi detectada (SILVA et al., 2011, LIMA et al., 2012; ROCHA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Silva et al., (2011) observaram o valor de 0,0572 no índice de diversidade nucleotídica para o DNA-A de uma população do *Macrotidium yellow spot virus* (MaYSV), o que representa um alto índice em relação aos valores observados para EuYMV relatado aqui. Vale ressaltar que os altos índices de variabilidade genética presentes em MaYSV são devido eventos frequentes de recombinação ocorrendo principalmente em Rep (LIMA et al., 2012; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014), o que não foi observado para as populações de EuYMV.

Estudos têm demonstrado que sítios recombinantes não são aleatoriamente distribuídos ao longo do genoma dos begomovírus, com *breakpoints* de recombinação sendo mais frequentemente detectados no gene Rep e Região Comum (*hotspots*), e menos frequentemente localizados nas demais regiões genômicas [CP, Trap e Rep (*coldspots*)] (STANLEY, 1995; FAUQUET et al., 2005; GARCIA-ANDRES et al., 2007; LEFEUVRE et al., 2007; SILVA et al., 2012; ROCHA et al., 2013; LIMA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Para os isolados de EuYMV, recombinação parece não influenciar grandemente na variabilidade genética observada. Resultados semelhantes foram observados para populações do BGMV infectando diferentes hospedeiras leguminosas no Brasil, enquanto que para populações do MaYSV, recombinação parece ser o mecanismo evolutivo diretamente ligado com os altos índices de diversidade genética observado nestes isolados (RAMOS-SOBRINHO et al., 2014).

Mudanças na sequência nucleotídica dos genes como as causadas por mutações aleatórias podem provocar alterações na conformação da proteína de modo que podem também alterar sua função (BURNS & BOTTINO, 1991; SUZUKI et al., 1991; NUSSBAUM et al., 2002). Hoëhnlé et al. (2001) demonstraram que a troca de apenas três aminoácidos da sequência da proteína CP de *Abutilon mosaic virus* (AbMV) tornou impossível a transmissão do isolado mutante pelo inseto vetor. Ramos-Sobrinho e colaboradores (2014) trabalhando com BGMV e MaYSV demonstraram ser a seleção purificadora a principal pressão seletiva sobre as ORFs CP e Rep das populações desses vírus, estando de acordo com muitos outros trabalhos em populações de begomovírus (GARCÍA-ANDRES et al, 2007; LIMA et al, 2013; ROCHA et al, 2013; SANZ et al., 1999; SILVA et al., 2012, 2011). Resultados semelhantes foram obtidos neste trabalho que observou a seleção purificadora como principal força seletiva atuando sobre os sítios nos genes Rep e CP de EuYMV.

6 CONCLUSÕES

- O begomovírus *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV) apresenta ampla gama de hospedeiros, porém é mais comumente encontrado associado à plantas de *Euphorbia heterophylla*;
- Subpopulações de EuYMV apresentam-se estruturadas de acordo com a origem geográfica;
- A variabilidade genética presente nas subpopulações de EuYMV deve ser resultado principalmente de mutações;
- A principal força seletiva atuando sobre as regiões genômicas CP e Rep de EuYMV é a seleção negativa ou purificadora;

Tabela 1. Isolados de begomovírus obtidos a partir de amostras do estado da Paraíba coletadas para esse trabalho.

Código	Coordenadas Geográficas		Especie/Acrônimo	Isolado	Hospedeiro	Local	Data
3PB-1H	-7°29'8'' S	-36°9'45'' W	<i>Euphorbia Yellow Mosaic Virus</i> /EuYMV	BR:Boq3:14	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Boqueirão – PB	Maio, 2014
5PB-1H	-7°29'8'' S	-36°9'45'' W	<i>Euphorbia Yellow Mosaic Virus</i> /EuYMV	BR:Boq4:14	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Boqueirão – PB	Maio, 2014
7PB-1H	-7°29'8'' S	-36°9'45'' W	<i>Euphorbia Yellow Mosaic Virus</i> /EuYMV	BR:Boq6:14	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Boqueirão – PB	Maio, 2014
8PB-II	-7°29'8'' S	-36°9'45'' W	<i>Euphorbia Yellow Mosaic Virus</i> /EuYMV	BR:Boq7:14	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Boqueirão – PB	Maio, 2014
9PB-1H	-7°29'8'' S	-36°9'45'' W	<i>Euphorbia Yellow Mosaic Virus</i> /EuYMV	BR:Boq8:14	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Boqueirão – PB	Maio, 2014
10PB-1H	-7°29'8'' S	-36°9'45'' W	<i>Euphorbia Yellow Mosaic Virus</i> /EuYMV	BR:Boq9:14	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Boqueirão – PB	Maio, 2014
14PB-1H	-7°29'8'' S	-36°9'45'' W	<i>Euphorbia Yellow Mosaic Virus</i> /EuYMV	BR:Boq12:14	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Boqueirão – PB	Maio, 2014
18PB-II	-7°29'8'' S	-36°9'45'' W	<i>Euphorbia Yellow Mosaic Virus</i> /EuYMV	BR:Boq15:14	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Boqueirão – PB	Maio, 2014
20PB-II	-7°29'8'' S	-36°9'45'' W	<i>Euphorbia Yellow Mosaic Virus</i> /EuYMV	BR:Boq16:14	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Boqueirão – PB	Maio, 2014
23PB-1H	-7°29'8'' S	-36°9'45'' W	<i>Euphorbia Yellow Mosaic Virus</i> /EuYMV	BR:Boq18:14	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Boqueirão – PB	Maio, 2014

Fonte: dados da pesquisa 2015

Tabela 2. Isolados de begomovírus provenientes do estado de Goiás.

Código	Coordenadas Geográficas		Especie/Acrônimo	Isolado	Hospedeiro	Local	Data
GO-32	-16°30'22.5"S	-49°17'06.8"W	<i>Euphorbia Yellow Mosaic Virus</i> /EuYMV	BR:Sag7:12	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Sto. Antônio de Goiás – GO	Dez, 2012
GO-33	-16°30'22.5"S	-49°17'06.8"W	<i>Euphorbia Yellow Mosaic Virus</i> /EuYMV	BR:Sag8:12	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Sto. Antônio de Goiás – GO	Dez, 2012
GO-34	-16°30'22.5"S	-49°17'06.8"W	<i>Euphorbia Yellow Mosaic Virus</i> /EuYMV	BR:Sag9:12	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Sto. Antônio de Goiás – GO	Dez, 2012
GO-35	-16°30'22.5"S	-49°17'06.8"W	<i>Euphorbia Yellow Mosaic Virus</i> /EuYMV	BR:Sag10:12	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Sto. Antônio de Goiás – GO	Dez, 2012
GO-41	-16°30'22.5"S	-49°17'06.8"W	<i>Euphorbia Yellow Mosaic Virus</i> /EuYMV	BR:Sag11:12	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Sto. Antônio de Goiás – GO	Dez, 2012
GO-42	-16°30'22.5"S	-49°17'06.8"W	<i>Euphorbia Yellow Mosaic Virus</i> /EuYMV	BR:Sag12:12	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Sto. Antônio de Goiás – GO	Dez, 2012
GO-43	-16°30'22.5"S	-49°17'06.8"W	<i>Euphorbia Yellow Mosaic Virus</i> /EuYMV	BR:Sag13:12	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Sto. Antônio de Goiás – GO	Dez, 2012
GO-44	-16°30'22.5"S	-49°17'06.8"W	<i>Euphorbia Yellow Mosaic Virus</i> /EuYMV	BR:Sag14:12	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Sto. Antônio de Goiás – GO	Dez, 2012
GO-50	-16°30'22.5"S	-49°17'06.8"W	<i>Euphorbia Yellow Mosaic Virus</i> /EuYMV	BR:Sag15:12	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Sto. Antônio de Goiás – GO	Dez, 2012
GO-51	-16°30'22.5"S	-49°17'06.8"W	<i>Euphorbia Yellow Mosaic Virus</i> /EuYMV	BR:Sag16:12	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Sto. Antônio de Goiás – GO	Dez, 2012
GO-52	-16°30'22.5"S	-49°17'06.8"W	<i>Euphorbia Yellow Mosaic Virus</i> /EuYMV	BR:Sag17:12	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Sto. Antônio de Goiás – GO	Dez, 2012
GO-53	-16°30'22.5"S	-49°17'06.8"W	<i>Euphorbia Yellow Mosaic Virus</i> /EuYMV	BR:Sag18:12	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Sto. Antônio de Goiás – GO	Dez, 2012
GO-54	-16°30'22.5"S	-49°17'06.8"W	<i>Euphorbia Yellow Mosaic Virus</i> /EuYMV	BR:Sag19:12	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Sto. Antônio de Goiás – GO	Dez, 2012
GO-56	-16°30'22.5"S	-49°17'06.8"W	<i>Euphorbia Yellow Mosaic Virus</i> /EuYMV	BR:Sag20:12	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Sto. Antônio de Goiás – GO	Dez, 2012
GO-57	-16°30'22.5"S	-49°17'06.8"W	<i>Euphorbia Yellow Mosaic Virus</i> /EuYMV	BR:Sag21:12	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Sto. Antônio de Goiás – GO	Dez, 2012

Tabela 2. Isolados de begomovírus provenientes do estado de Goiás. (conclusão)

Código	Coordenadas Geográficas		Especie/Acrônimo	Isolado	Hospedeiro	Local	Data
GO-58	-16°30'22.5"S	-49°17'06.8"W	<i>Euphorbia Yellow Mosaic Virus</i> /EuYMV	BR:Sag22:12	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Sto. Antônio de Goiás – GO	Dez, 2012
GO-59	-16°30'22.5"S	-49°17'06.8"W	<i>Euphorbia Yellow Mosaic Virus</i> /EuYMV	BR:Sag23:12	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Sto. Antônio de Goiás – GO	Dez, 2012
GO-59	-16°30'22.5"S	-49°17'06.8"W	<i>Euphorbia Yellow Mosaic Virus</i> /EuYMV	BR:Sag23.1:12	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Sto. Antônio de Goiás – GO	Dez, 2012
GO-61	-16°30'22.5"S	-49°17'06.8"W	<i>Euphorbia Yellow Mosaic Virus</i> /EuYMV	BR:Sag24:12	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Sto. Antônio de Goiás – GO	Dez, 2012

Fonte: dados da pesquisa 2015

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

Especie/Acrônimo/Isolado	Nº de acesso no Genbank	Hospedeiro	Local	Data
<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i> EuYMV / BR:GO:LEA:08	FJ619507	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Santo Antônio de Goiás – GO	2008
<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i> EuYMV / Brazil:GO:Luziania 8675:2009	JF756676	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Luziania – GO	2009
<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i> EuYMV / Brazil:GO:São Miguel do Passa Quatro AB404:2002	JF756675	<i>Euphorbia heterophylla</i>	São Miguel do Passa Quatro – GO	2002
<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i> EuYMV / Brazil:GO:Morrinhos 9027:2009	JF756674	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Morrinhos – GO	2009
<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i> EuYMV / Brazil:DF:Taquara 8880:2009	JF756673	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Taquara – DF	2009

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

Espécie/Acrônimo/Isolado	Nº de acesso no Genbank	Hospedeiro	Local	Data
<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i> EuYMV / Brazil:GO:Itaberai:5082A:2007	JF756671	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Itaberai – GO	2007
<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i> EuYMV / Brazil:DF:Taquara:ABA3:2002	JF756670	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Taquara – DF	2002
<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i> EuYMV / Brazil:DF:Planaltina:AB5818:2007	JF756669	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Planaltina – DF	2007
<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i> EuYMV / Brazil:Mato Grosso do sul:2:2007	FN435997	<i>Euphorbia sp.</i>	Mato Grosso do Sul	2007
<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i> EuYMV / Brazil:Mato Grosso do sul:1:2007	FN435995	<i>Euphorbia sp.</i>	Mato Grosso do Sul	2007
<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i> EuYMV / BR:3539AB1:09	JX415200	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Acreuna – GO	2009
<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i> EuYMV / BR:768Tom8a:08	JX415192	<i>Solanum lycopersicum</i>	Luziania – GO	2008
<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i> EuYMV / BR:768Cro3b:08	JX415191	<i>Crotalaria juncea</i>	Luziania – GO	2008
<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i> EuYMV / BR:GO:Luz768c:03	JX415186	<i>Crotalaria sp.</i>	Luziania – GO	2003
<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i> EuYMV / BR:GO:Luz768b:03	JX415185	<i>Crotalaria sp.</i>	Luziania – GO	2003
<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i> EuYMV / BR:GO:Luz768a:03	JX415184	<i>Crotalaria sp.</i>	Luziania – GO	2003
<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i> EuYMV / BR:Flo166:08	KC706530	<i>Euphorbia sp.</i>	Florestal –MG	2008
<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i> EuYMV / BR:Vic9:10	JX871379	<i>Sida santaremensis</i>	Viçosa – MG	2010
<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i> EuYMV / BR:Car2:09	JN419000	<i>Macroptilium atropurpureum</i>	Caruaru –PE	2009

Fonte: dados da pesquisa 2015

Tabela 4. Diversidade genética em populações do *Euphorbia yellow mosaic virus* infectando hospedeiras não-cultivadas no Brasil.

População	Nº de sequências	DNA-A π	CP π	Rep π
EuYMV (Total)	49	0,0189 (\pm 0,0009)	0,0198 (\pm 0,0014)	0,0173 (\pm 0,0008)
EuYMV (Nordeste)	12	0,0059 (\pm 0,0024)	0,0074 (\pm 0,0023)	0,0045 (\pm 0,0021)
EuYMV(Centro-oeste)	36	0,0137 (\pm 0,0012)	0,0123 (\pm 0,0013)	0,0143 (\pm 0,0012)

Fonte: dados da pesquisa 2015

Tabela 5 – Eventos de recombinação detectados entre os isolados de *Euphorbia yellow mosaic virus*.

Número de eventos de recombinação	<i>Breakpoint</i> na sequência recombinante		Parentais			Métodos de detecção ^a								
	Começo	Fim	Sequência recombinante	Menor parental	Maior Parental	R	G	B	M	C	S	P	L	3s
1	2591	1241	EuYMV_FJ619507	EuYMV_JX415200	Desconhecido	NS	NS	NS	3,95x10 ¹¹	1,19x10 ¹²	2,097x10 ⁸	NS	NS	NS

NS = Não significante

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

Fonte: dados da pesquisa 2015

Tabela 6 – Sítios sob pressão de seleção positiva e negativa nas ORF's CP e Rep dos isolados de *Euphorbia yellow mosaic virus*.

Conjunto de dados	Sítio sob seleção Positiva	Sítios sob seleção Negativa
EuYMV – CP	-	12, 15, 66, 70, 81, 99, 126, 130, 159, 176, 194, 208, 223
EuYMV – Rep	39	4, 103, 119, 162, 173, 181, 216, 238, 248, 255, 256, 271, 297, 311, 319, 323

Fonte: dados da pesquisa 2015

Figura 2. Matriz bidimensional representando a porcentagem de identidade de comparações pareadas de seqüências nucleotídicas do DNA-A dos isolados da Paraíba e Goiás com isolados de begomovírus disponíveis no GenBank.

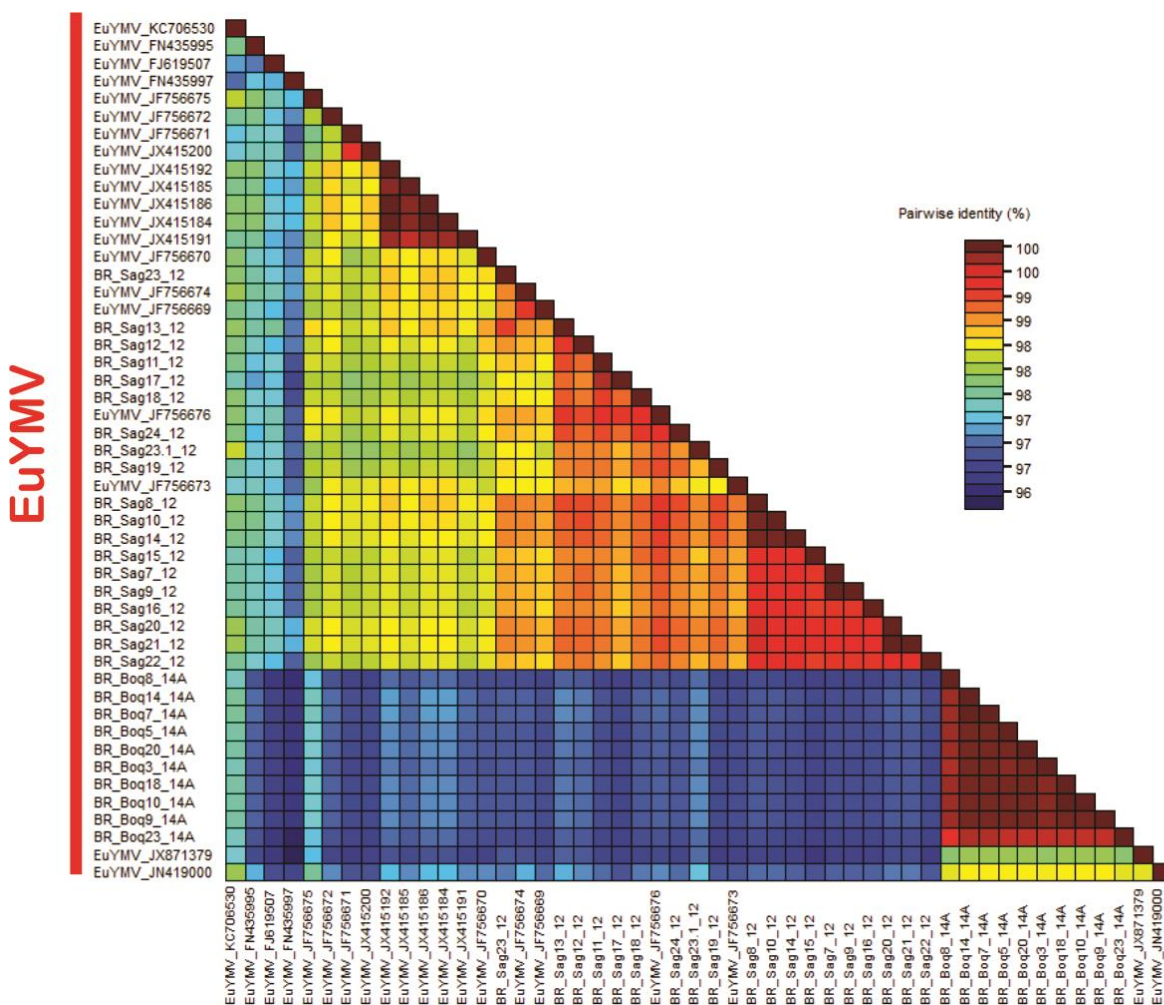


Figura 3. Análise filogenética de máxima verossimilhança baseada no DNA-A, mostrando a formação de dois grupos distintos de acordo com a origem geográfica. Grupo 1 = isolados obtidos no Centro-Oeste, grupo 2 = isolados obtidos no Nordeste.

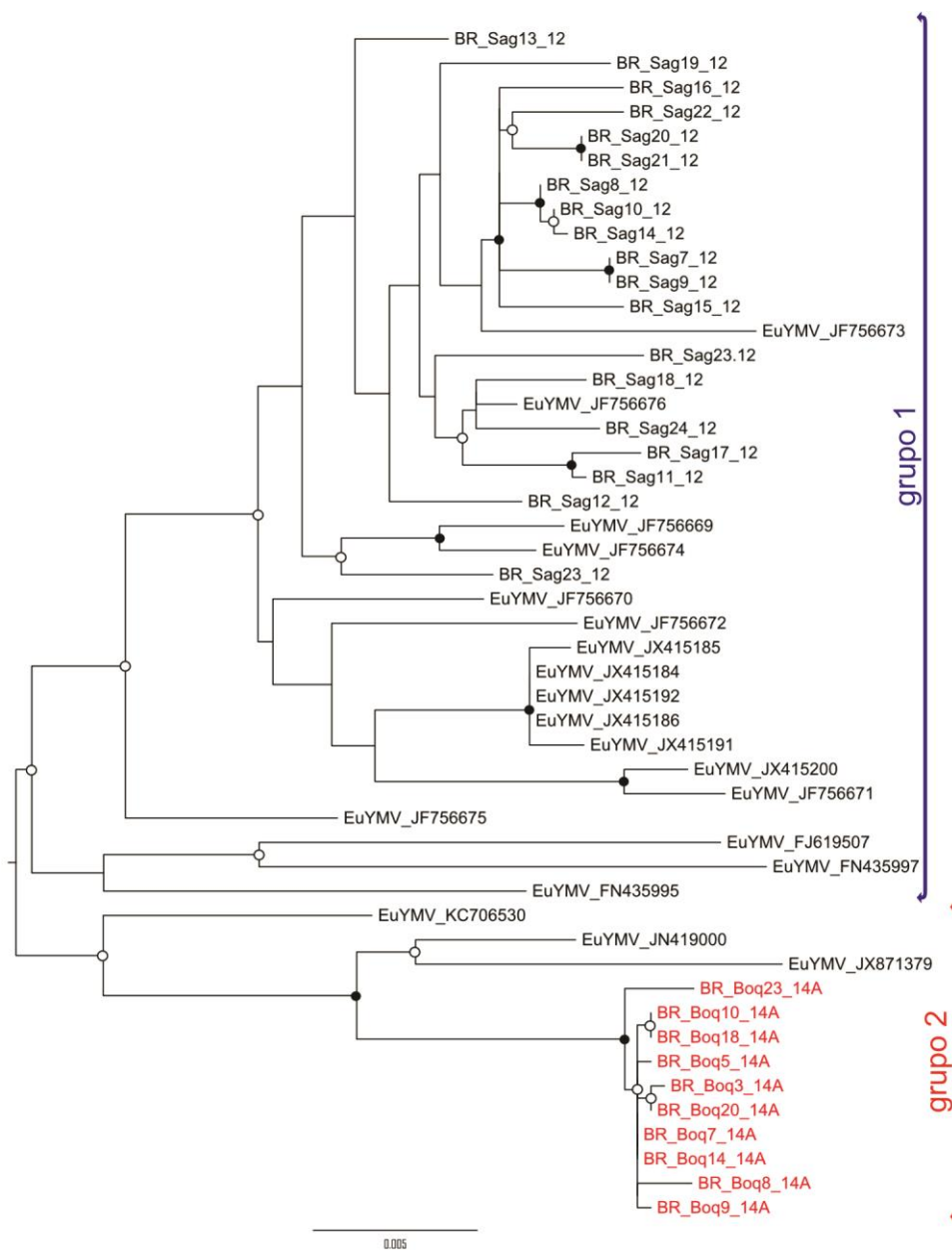


Figura 4. Análise filogenética de máxima verossimilhança baseada na ORF CP, mostrando a formação de dois grupos distintos de acordo com a origem geográfica. Grupo 1 = isolados obtidos no Centro-Oeste, grupo 2 = isolados obtidos no Nordeste.

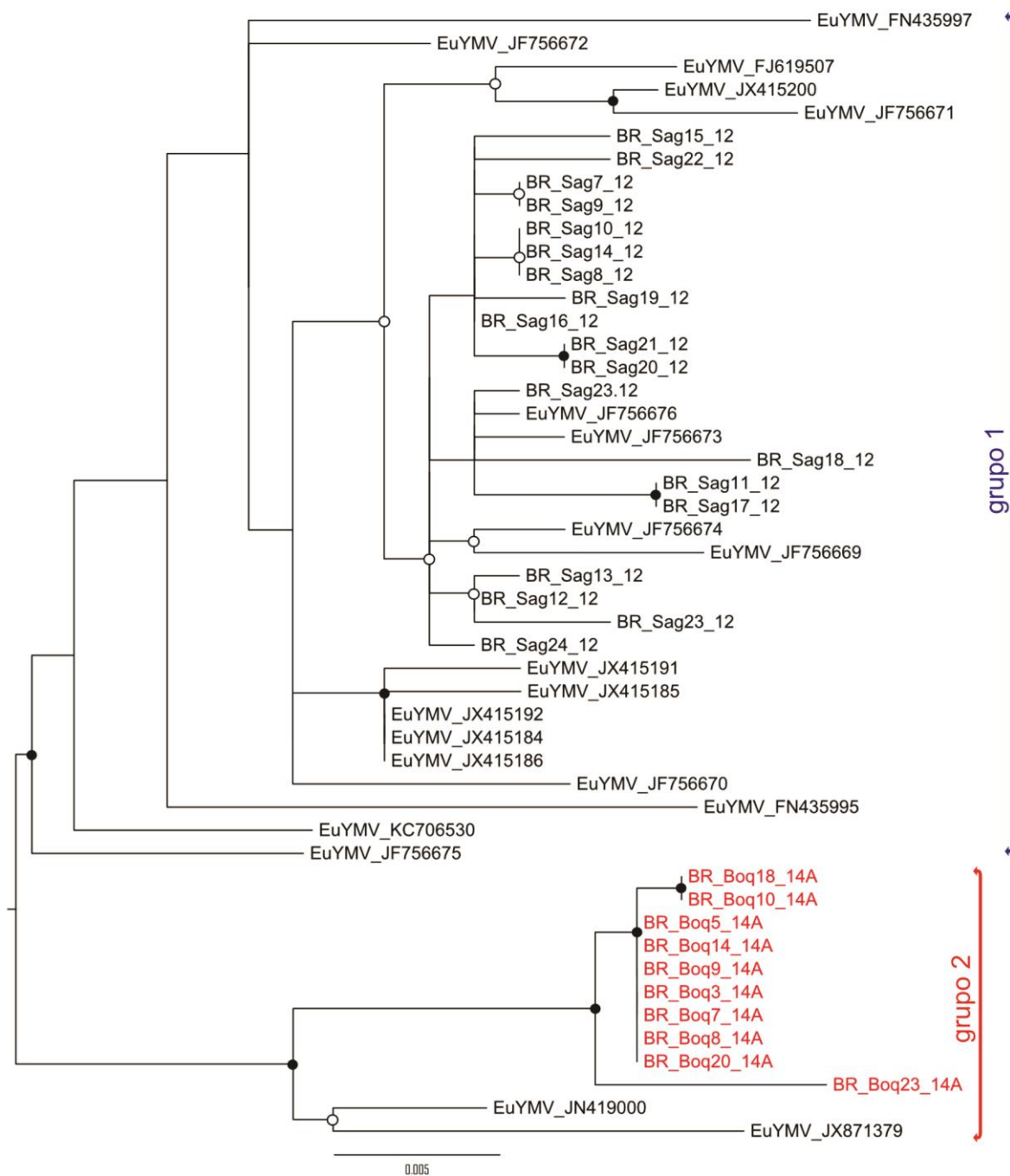


Figura 5. Análise filogenética de máxima verossimilhança baseada na ORF Rep, mostrando a formação de dois grupos distintos de acordo com a origem geográfica. Grupo 1 = isolados obtidos no Centro-Oeste, grupo 2 = isolados obtidos no Nordeste.

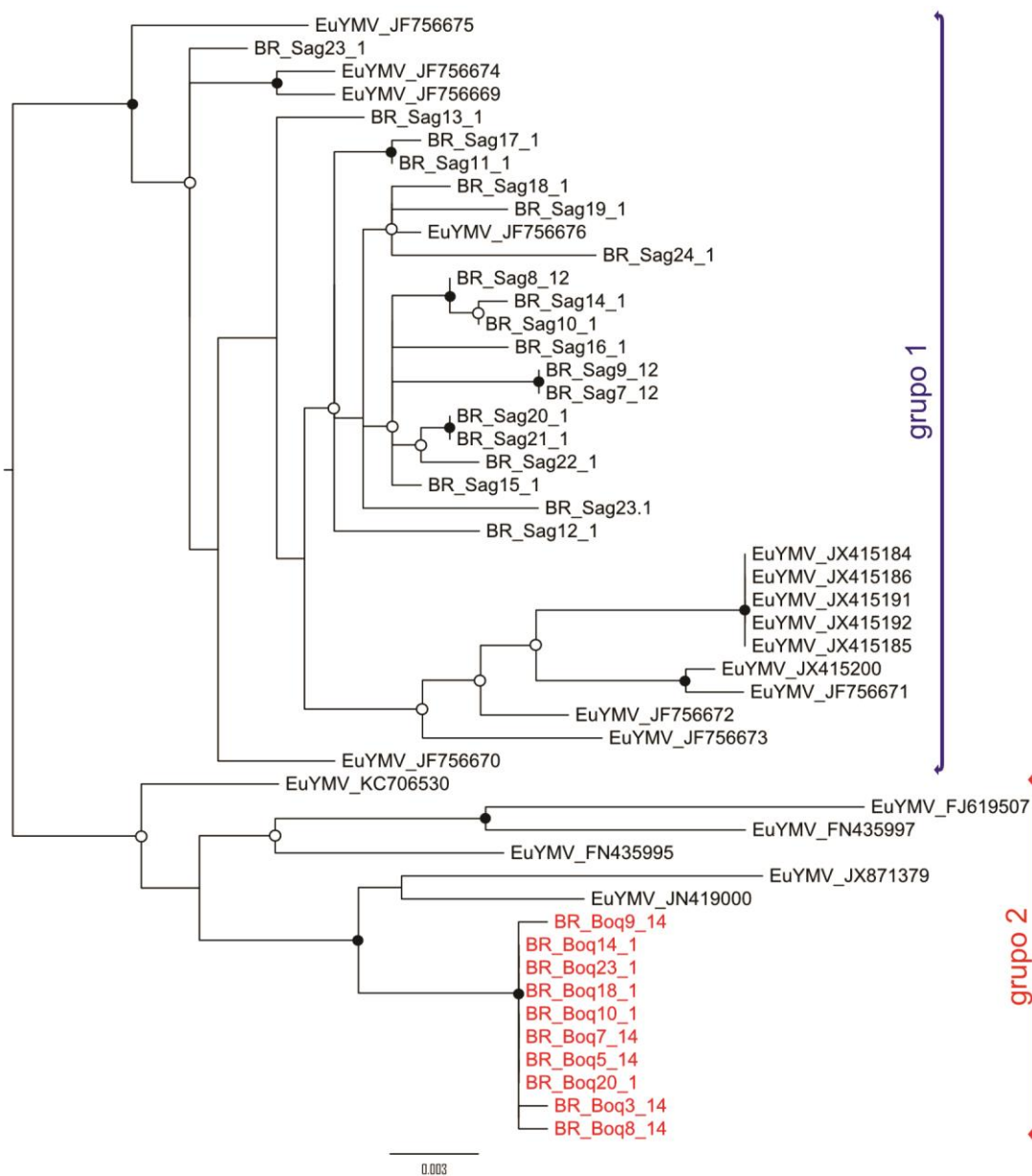


Figura 6 – Análise reticulada baseada no DNA-A. Isolados obtidos no estado da Paraíba (linha vermelha).

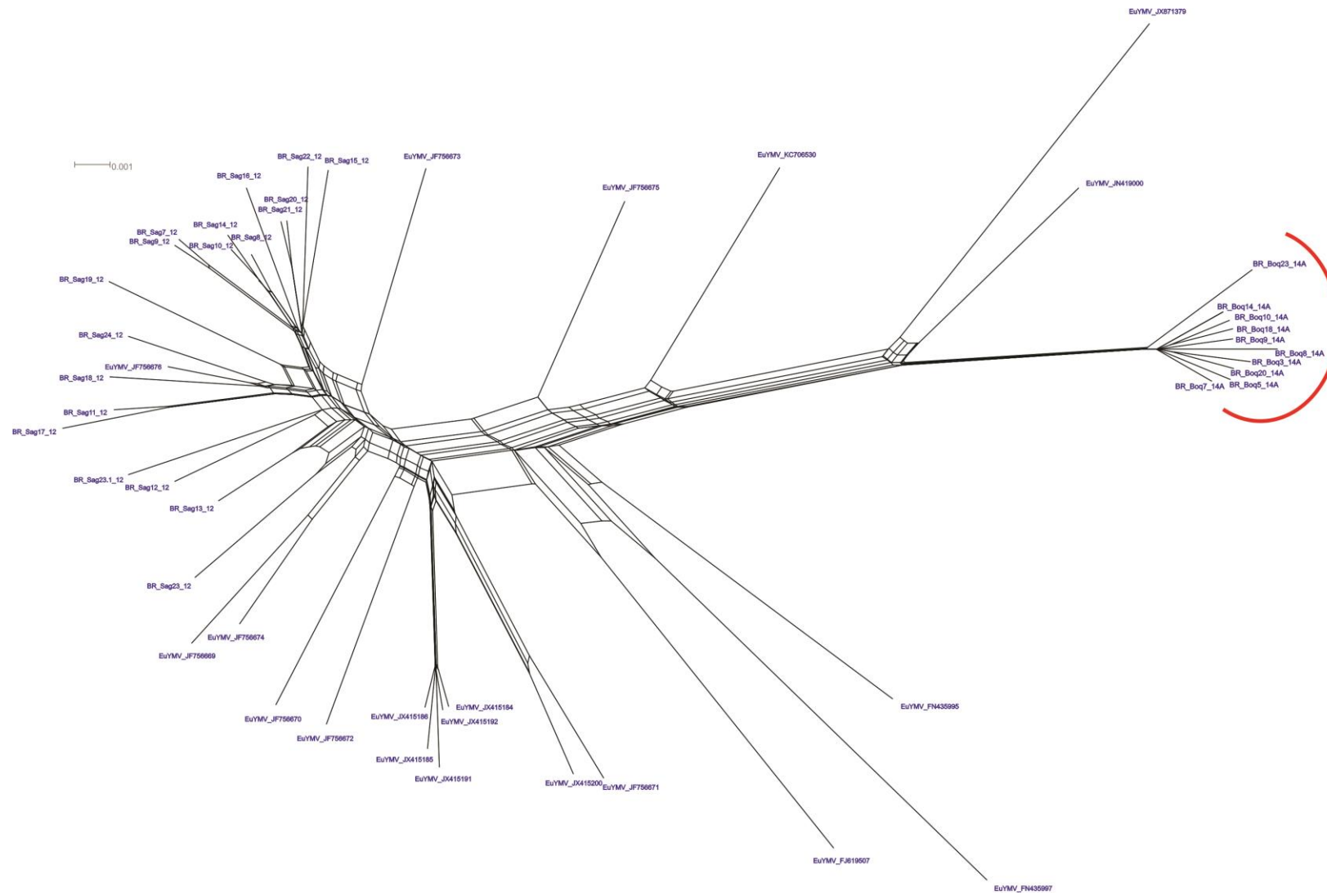


Figura 7 – Análise reticulada baseada na ORF CP. Isolados obtidos no estado da Paraíba (linha vermelha).

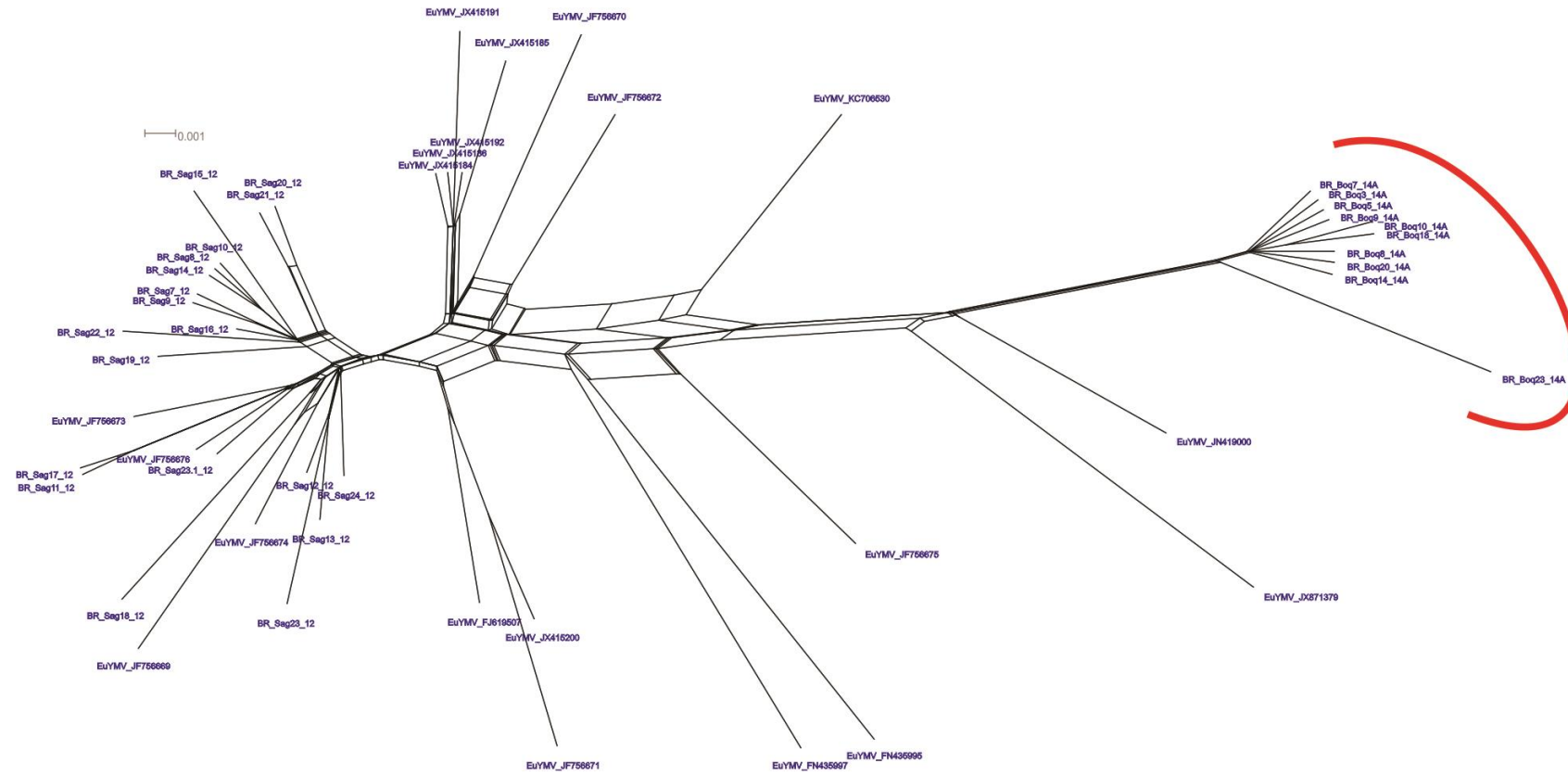
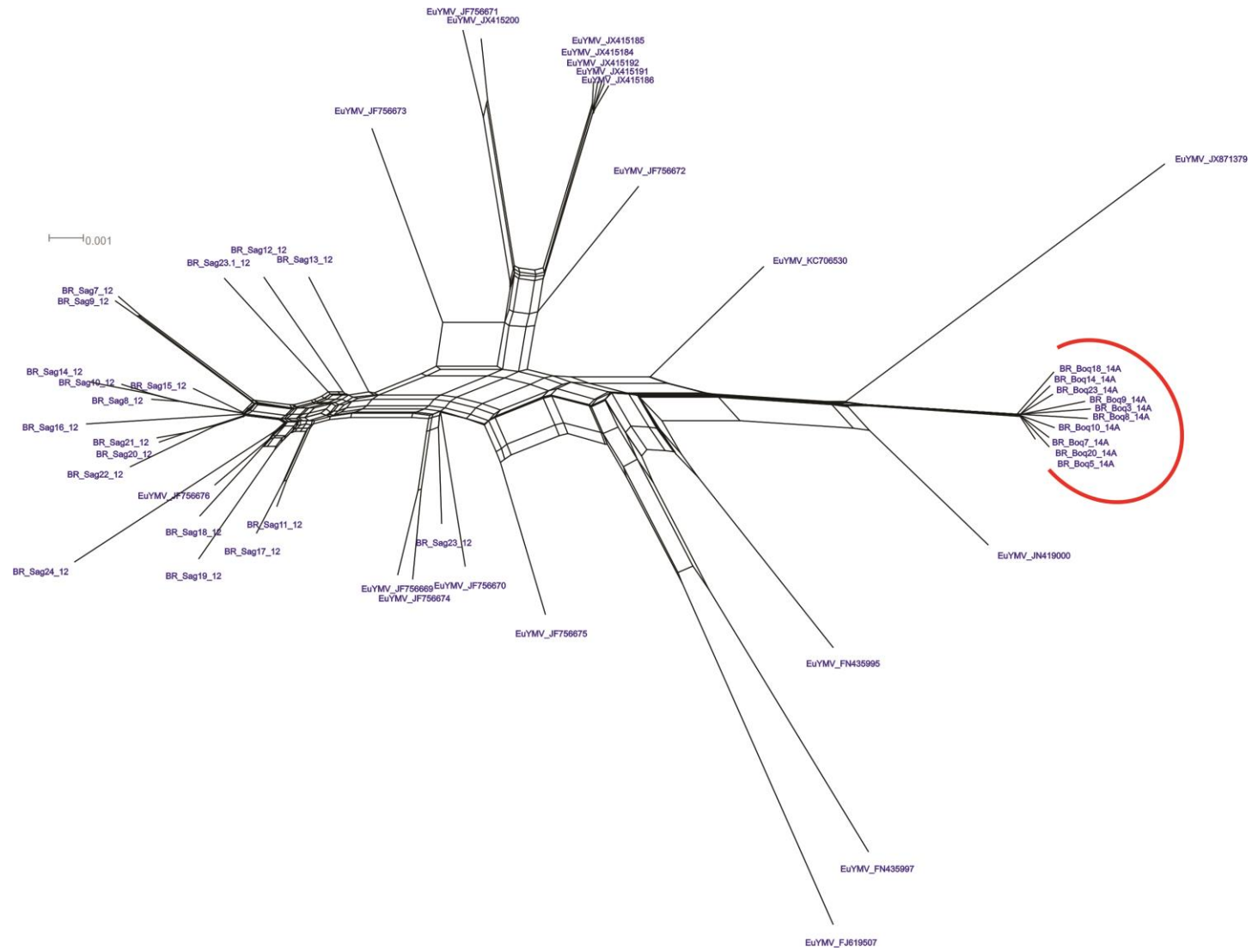


Figura 8 – Análise reticulada baseada na ORF Rep. Isolados obtidos no estado da Paraíba (linha vermelha).



REFERÊNCIAS

- ALBERTER, B.; REZAIAN, M.A.; JESKE, H. Replicative intermediates of Tomato leaf curl virus and its satellite DNAs. **Virology**, v.331, p.441-448. 2005.
- ALBUQUERQUE, L.C. et al. Further characterization of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. **Archives of Virology**, New York, v. 157, p. 747–752, 2012.
- ALMEIDA, M.M.S. **Caracterização molecular de begomovírus de malváceas** (Tese), Universidade de Brasília, Dep. de Fitopatologia, Brasília, 2012. 72p.
- ALTSCHUL S.F., et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. (1990) 215: 403-410.
- ALVES-JÚNIOR M., et al. Synergism and negative interference during co-infection of tomato and *Nicotiana benthamiana* with two bipartite begomoviruses. **Virology** 387 (2009) 257–266
- 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**, London, v. 87, p. 3687-3696, 2006.
- ARGUELLO-ASTORGA, G. et al. High-frequency reversion of geminivirus replication protein mutants during infection. **Journal of Virology**, Washington, v. 81, p. 11005-11015, 2007.
- 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. **Journal Phytopathology** 103 (5), 436-444 (2013)
- BEZERRA, I.C. et al. Survey of geminivirus infection in tomato producing areas in Federal District. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA VIII. São Lourenço, MG, 1996. 289 p.
- BRIDDON, R. W. et al. 1990. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. **Virology**, 177, 85-94.
- BRIDDON, R.W.; STANLEY, J. Subviral agents associated with plant single-stranded DNA viruses. **Virology**, v. 344, p. 198-210, 2006.
- BRIDDON, R.W. et al. Recommendations for the classification and nomenclature of the DNA-β satellites of begomoviruses. **Archives of Virology**, New York, v. 153, p. 763-781, 2008.

BROWN J.K. (2013). 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.

Disponível em:

<http://talk.ictvonline.org/files/ictv_official_taxonomy_updates_since_the_8th_report/m/plant-official/4838.aspx>. Acesso em 13 de Fevereiro de 2015.

BROWN J.K., et al. (2012) 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**, London, UK, pp 351-373

BROWN, J.K. The biology and molecular epidemiology of the Geminiviridae subgroup III. **Plant Microbe Interactions**. New York. v. 2, p. 125-195, 1997.

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. **Brazilian Journal of Agricultural Research**, Brasília, v. 42, p. 1335-1343, 2007.

CASTILLO AG, et al. (2004) Interaction between a geminivirus replication protein and the plant simulation system. **J Virol** 78: 2758–2769

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

CASTILLO-URQUIZA G.P. et al. 2010. Genetic structure of tomato-infecting begomovirus populations in two tomato-growing regions of Southeastern Brazil. In: 6TH INTERNATIONAL GEMINIVIRUS SYMPOSIUM AND 4TH INTERNATIONAL SSDNA COMPARATIVE VIROLOGY WORKSHOP, **Program and Abstracts**. 2010, Guanajuato, Mexico.

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

COSTA, A.S. Three whitefly-transmitted virus diseases of beans in São Paulo, Brazil. **FAO Plant Protection Bulletin**, Lanham, v. 13, p.121-130, 1965.

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, New York, p. 27-49, 1975.

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

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

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

EINI O, DOGRA S, SELTH LA, DRY IB, RANGLES JW, REZAIAN MA (2009) Interaction with a host ubiquitin-conjugating enzyme is required for the pathogenicity of a geminiviral DNA beta satellite. **Mol Plant Microbe Interact** 22: 737-746

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

ETESSAMI, P. et al. 1991. Mutational analysis of complementary-sense genes of African cassava mosaic virus DNA A. **J Gen Virol**, 72 (Pt 5), 1005-12

FARGETTE, D. et al. Molecular ecology and emergence of tropical plant viruses. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 44, p. 235-260, 2006.

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

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

FARIA, J.C. et al. A new geminivirus associated with tomato in the State of São Paulo, Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, p. 423, 1997.

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**. Passo Fundo, v. 8, p. 27-57, 2000.

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

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

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

- FAUQUET, C.M. et al. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. **Archives of Virology**, New York, v. 153, p. 783-821, 2008.
- FERNANDES, F. et al. (2011). 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.
- FERNANDES, A.V. et al. Cloning and molecular characterization of A components of two new *Sida rhombifolia*-infecting geminiviruses. **Virus Reviews and Research**, Belo Horizonte, v. 4, p. 148, 1999.
- FERNANDES, J.J. et al. Biological and molecular properties of Tomato rugose mosaic virus (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. **Plant Pathology**, v. 55, p. 513-522, 2006.
- FERNANDES, F.R. et al. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. **Virus Genes**, v. 36, p. 251-258, 2008.
- 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.
- FLORES, E.; SILBERSCHMIDT, K.; KRAMER, M. Observações de “clorose infecciosa” das malváceas em tomateiros do campo. **O Biológico** 26:65-69. 1960.
- FONTES, E.P.B.; LUCKOW, V.A.; HANLEY-BOWDOIN, L. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. **Plant Cell**, Rockville, v. 4, p. 597-608, 1992.
- FONTES, E.P.B. et al. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 269, p. 8459-8465, 1994a.
- FONTES, E.P.B. et al. Geminivirus replication origins have a modular organization. **Plant Cell**, Rockville, v. 6, p. 405-416, 1994b.
- FONDONG, V.N. et al. Evidence of synergism between African cassava mosaic virus and a new double-recombinant geminivirus infecting cassava in Cameroon. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 287-297, 2000.
- 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.
- GARCIA-ANDRES, S. et al. Frequent occurrence of recombinants in mixed infections of tomato yellow leaf curl disease-associated begomoviruses. **Virology**, New York, v. 365, p. 210-219, 2007.

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

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

GARDINER, W. et al. Genetic analysis of *Tomato golden mosaic virus*: The coat protein is not required for systemic spread or symptom development. **EMBO Journal**, Oxford, v. 7, p. 899-904, 1998.

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

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

GILBERTSON, R.L. et al. Análise molecular do movimento de vírus nas plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 1, 1993b.

GIORDANO, L.B. et al. Efeito da infecção precoce por Begomovirus com genoma bipartido em características de frutos de tomate industrial. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 815-818, 2005.

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

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

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

HANLEY-BOWDOIN, L. et al. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 18, p. 71-106, 1999.

HARKINS, G.W. et al. Experimental evidence indicating that mastreviruses probably did not co-diverge with their hosts. **Virology Journal**, London, v. 6, p.1-14, 2009.

HARRISON, B.D.; ROBINSON, D.J. Natural genomic and antigenic variation in white-fly transmitted geminiviruses (begomoviruses). **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, p. 369-398, 1999.

- HEHNLE, S., WEGE, C.; JESKE, H.. 2004. Interaction of DNA with the movement proteins of geminiviruses revisited. **J Virol**, 78, 7698-706.
- HEYRAUD-NITSCHKE, F. et al. Determination of the origin cleavage and joining domain of geminivirus Rep proteins. **Nucleic Acids Research**, Bethesda, v. 23, p. 910– 916, 1995.
- HILL, J.E. et al. Asymmetric infectivity of pseudorecombinants of cabbage leaf curl virus and squash leaf curl virus: Implications for bipartite geminivirus evolution and movement. **Virology**, New York, v. 250, p. 283-292, 1998.
- HOËHNLE, M. et al. Exchange of Three Amino Acids in the Coat Protein Results in Efficient Whitefly Transmission of a Nontransmissible Abutilon Mosaic Virus Isolate. **Virology** 290,164±171 (2001)
- 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. Nucleotide sequence of a new bipartite geminivirus isolated from the common weed *Sida rhombifolia* in Costa Rica. **Virology**, New York, v. 78, p. 1785-1790, 1997b.
- HUSON, D. H.; BRYANT, D. (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Mol Biol Evol** 23, 254–267
- HOU, Y.M.; GILBERTSON, R.L. Increased pathogenicity in a pseudorecombinant bipartite geminivirus correlates with intermolecular recombination. **Journal of Virology**, v. 70, p. 5430-5436, 1996.
- ICTV. 2013. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>> Acesso em 26 de fevereiro de 2015.
- IDRIS A.M., et al. (2003) Two newly described begomoviruses of *Macroptilium lathyroides* and common bean. **Phytopathology** 93:774-783
- IDRIS, A.M.; BROWN, J.K. Molecular analysis of Cotton leaf curl virus-Sudan reveals an evolutionary history of recombination. **Virus Genes**, Norwell, v. 24, p. 249-256, 2002.
- INOUE-NAGATA, A.K. et al. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase. **Journal of Virological Methods**, London, v. 116, p. 209-211, 2004.
- 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**, London, v. 79, p. 3091-3099, 1998.
- JARAMILLO, S.; LASTRA, R. Purification and properties of the geminivirus Euphorbia mosaic virus. **Journal of Phytopathology**, v. 115, p. 193-203, 1986.

JESKE, H., LUTGEMEIER, M.; PREISS, W.. DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of Abutilon mosaic virus. **EMBO Journal**, v.20, p.6158-6167. 2001.

JOVEL, J. et al. Sida micranthamosaic is associated with a complex infection of begomoviruses different from Abutilon mosaic virus. **Arch Virol**, v. 149, p. 829-841, 2004.

LAUFS, J. et al. In vitro cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, p. 3879–3883, 1995.

LAZAROWITZ, S.G. Geminiviruses: genome structure and gene function. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 11, p. 327-349, 1992.

LAZAROWITZ, S.G. et al. Sequence-specific interaction with the viral AL1 protein identifies a geminivirus DNA replication origin. **Plant Cell**, Rockville, v. 4, p. 799-809, 1992.

LEFEUVRE, P. et al. Begomovirus 'melting pot' in the south-west Indian Ocean islands: Molecular diversity and evolution through recombination. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 3458-3468, 2007.

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

LIMA ATM, et al. (2011) *Malvaviscus* yellow mosaic virus, a weed-infecting begomovirus carrying a nanovirus-like nonanucleotide and a modified stem-loop structure. **Phytopathology** 101:S104 (Abstract)

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

LIMA, M.F. et al. Distribuição de geminivírus nas culturas do tomate e pimentão em doze municípios do Submédio do Vale de São Francisco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 81-85, 2001.

LOZANO-DURÁN R, BEJARANO ER (2011) Geminivirus C2 protein might be the key player for geminiviral co-option of SCF-mediated ubiquitination. **Plant Signal Behav** 6: 999–1001

LOZANO-DURÁN R., et al. (2011) Geminiviruses subvert ubiquitination by altering CSN-mediated derubylation of SCF E3 ligase complexes and inhibit jasmonate signaling in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell** 23: 1014–1032

MAKINO, S. et al. High frequency RNA recombination of murine coronaviruses. **J. Virol.** v. 57, p. 729–737, 1986.

MANSOOR, S. et al. Geminivirus disease complexes: an emerging threat. **Trends in Plant Science**, v. 8, p. 128-134, 2003.

MARTIN, D. P. et al. 2011. Recombination in Eukaryotic Single Stranded DNA Viruses. **Viruses**, 3, 1699-1738.

MARTIN, D. P. et al. (2010). RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. **Bioinformatics** 26, 2462–2463.

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**, 2013, 87, 5397-5413

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

MORALES, F.J.; 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.

MORRA, M.R.; PETTY, I.T.D. Tissue Specificity of Geminivirus Infection Is Genetically Determined. **The Plant Cell Online**, New York, v. 12, p. 2259-2270, 2000.

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

MUHIRE B., et al. (2013) A genome-wide pairwise-identity-based proposal for the classification of viruses in the genus Mastrevirus (family Geminiviridae). **Arch Virol** 158:DOI 10.1007/s00705-00012-01601-00707

NELSON, R.S.; VAN BEL, A.J.E. (1997). The mystery of virus trafficking into, through and out of vascular tissue. **Prog. Bot.** 59, 477–533

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

OLIVEIRA, C.L.D; NAGATA, A.K.I. (2010). **Caracterização de um novo begomovírus, Euphorbia yellow mosaic virus, no Brasil ; Characterization of Brazilian begomovirus Euphorbia yellow mosaic virus**. (TESE). Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

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.

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.; SAWYER, S.; FAUQUET, C.M. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. **Virology**, New York, v. 265, p. 218-224, 1999.

PAPROTKA, T. et al. Genomic diversity of sweet potato geminiviruses in a Brazilian germplasm bank. **Virus Research**, Amsterdam, v. 149, p. 224-233, 2010.

PAPROTKA, T.; METZLER, V.; JESKE, H. The complete nucleotide sequence of a new bipartite begomovirus from Brazil infecting *Abutilon*. **Archives of Virology**, New York, v. 155, p. 813-816, 2010a.

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, 2010b.

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

PREISS, W.; JESKE, H. (2003). Multitasking in Replication Is Common among Geminiviruses. **The Journal of Virology**, 77(5), 2972.

QUINTELA, E.D.; MORAES, M.M.D.; ROSA, A.S. Controle de Adultos e Ninfas da Mosca-Branca *Bemisia Tabaci* Biótipo B com Chlorantraniliprole + Thiamethoxan. **Embrapa Arroz e Feijão**, Santo Antônio de Goiás, p. 1-4, 2008.

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** (2014), 95,2540–2552

RIBEIRO, S.G. et al. Occurrence of geminivirus in tomato plants in Bahia. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA VIII (**Resumos**). São Lourenço, MG: SBV, p. 290, 1996.

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

RIBEIRO, S.G. et al. 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.

- ROCHA, C. S. et al. (2013). Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly evolving, and segregated based on geographical location. **J Virol** 87, 5784–5799
- 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.
- ROOSSINCK, M. J. Mechanisms of plant virus evolution. **Annu. Rev. Phytopathol.** v. 35, p. 191–209, 1997.
- ROOSSINCK M.J., SLEAT D., PALUKAITIS P.. Satellite RNAs of plant viruses: structures and biological effects. **Microbiol Rev.** 1992; 56:265–79
- ROZAS, J., SANCHEZ-DELBARRIO, J. C., MESSEGUER, X. & ROZAS, R.(2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19, 2496–2497.
- SAMBROOK J.; RUSSEL D. (2001) **Molecular Cloning -A Laboratory Manual** (3^a ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- 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** 173 (2013) 286– 293.
- SÁNCHEZ-DURÁN M.A., et al. (2011) Interaction between geminivirus replication protein and the SUMO conjugating enzyme is required for viral infection. **J Virol** 85: 9789–9800
- SANZ, A. I. et al. F.(1999). Genetic variability of natural populations of cotton leaf curl geminivirus, a single-stranded DNA virus. **J Mol Evol** 49, 672–681.
- SERFRAZ, S. et al. S. Recombination Among Begomoviruses on Malvaceous Plants Leads to the Evolution of Okra Enation Leaf Curl Virus in Pakistan. **J Phytopathol**, 2015, (in print)
- SERGEI L.; KOSAKOVSKY P.; SIMON D. W. F. (2005) Not So Different After All: A Comparison of Methods for Detecting Amino Acid Sites Under Selection **Molecular Biology and Evolution** 22(5): 1208-1222
- 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.

SRIVASTAVA, A. et al. Characterization of a novel begomovirus associated with yellow mosaic disease of three ornamental species of *Jatropha* grown in India. **Virus Research**, **2015**, *201*, 41-49

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

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*, p. 301–326, **Elsevier**, London, 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.; SUNTER, J. L.; BISARO, D. M. 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. 1991. 764p.

TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, FILIPSKI A, and KUMAR S (2013) **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0**. *Molecular Biology and Evolution* **30**: 2725-2729.

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.

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.

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

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.

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.

ZHANG Z, et al (2011) BSCTV C2 attenuates the degradation of SAMDC1 to suppress DNA methylation-mediated gene silencing in Arabidopsis. **Plant Cell** 23: 273–28

ZERBINI, F.M. et al. A new bipartite geminivirus infecting tomatoes in Minas Gerais, Brazil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, p. S1, 1996.

ZERBINI, F.M.; CARVALHO, M.G.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. Introdução à **Virologia Vegetal**. Viçosa: Ed. UFV, 2002.145p.

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.

WRIGHT, S. (1949). The genetical structure of populations. **Ann Eugen** 15, 323–354