



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



MAYRA MACHADO DE MEDEIROS FERRO

**ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DOS BEGOMOVÍRUS
Tomato mottle leaf curl virus INFECTANDO TOMATE (*Solanum
lycopersicum*) E *Sida mottle Alagoas virus* EM *Sida* spp. NO BRASIL**

Rio Largo - AL
2015

MAYRA MACHADO DE MEDEIROS FERRO

**ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DOS BEGOMOVÍRUS
Tomato mottle leaf curl virus INFECTANDO TOMATE (*Solanum
lycopersicum*) E *Sida mottle Alagoas virus* EM *Sida* spp. NO BRASIL**

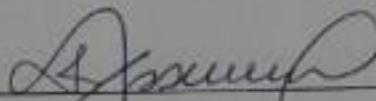
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Proteção de Plantas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Proteção de Plantas.

Orientadora: Prof. Dra. Iraildes Pereira Assunção
Coorientador: Dr. Roberto Ramos Sobrinho

Rio Largo - AL
2015

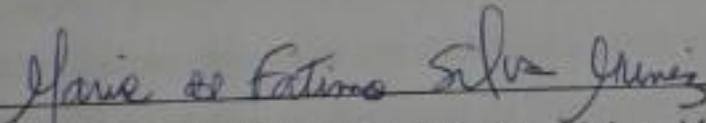
ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DOS BEGOMOVÍRUS
Tomato mottle leaf curl virus INFECTANDO TOMATE (*Solanum lycopersicum*) E *Sida mottle Alagoas virus* EM *Sida* spp. NO BRASIL

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

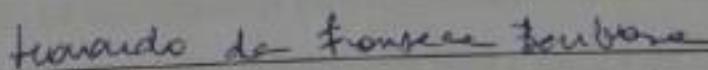


Prof. Dra. Iraildes Pereira Assunção - Universidade Federal de Alagoas (Orientadora)

Banca Examinadora:



Prof. Dra. Maria de Fátima Silva Muniz - Universidade Federal de Alagoas (Examinador)



Dr. Leonardo da Fonseca Barbosa - Pós-doutorando PNPDI Intitucional /CAPES/ CECA-UFAL (Examinador)

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus queridos pais, Benedito Ferro e Rosangela Ferro, pelo amor, incentivo e apoio em todas as horas;

Aos meus irmãos Mayara Ferro e Madson Ferro por sempre estarem ao meu lado;

A todos familiares e amigos que contribuíram para meu crescimento;

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

Ao Dr. Roberto Ramos pela amizade, pelos ensinamentos, orientação e apoio durante minha trajetória no mestrado. Serei sempre grata;

A Dra. Sarah Cavalcanti e o Dr. Leonardo Barbosa pela amizade e pelos ensinamentos;

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

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

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

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

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

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

Obrigada!

RESUMO

O tomateiro (*Solanum lycopersicon*) é uma cultura de grande importância em regiões tropicais e subtropicais. Os begomovírus estão entre os patógenos mais prejudiciais que infectam essa cultura, sendo considerado fator limitante em áreas produtoras de tomate. Os begomovírus são transmitidos por mosca-branca, são fitovírus de DNA circular de fita simples, com hospedeiros selvagens/não-cultivados desempenhando um papel epidemiológico relevante, atuando como reservatórios desses vírus. Recentemente, tem sido demonstrado que begomovírus brasileiros que infectam tomate são segregados biogeograficamente, com diferentes espécies virais predominantes em diferentes áreas de tomateiro. O presente estudo teve como objetivo determinar a diversidade e estrutura genética de populações de begomovírus infectando tomateiro e *Sida* spp. em diferentes áreas produtoras de tomate no Nordeste do Brasil. Amostras foliares de tomate e *Sida* spp. (associadas aos campos de cultivo de tomate) foram coletadas em três diferentes estados do Nordeste do Brasil em 2014. DNA total foi extraído e usado como molde para amplificação dos genomas virais por círculo rolante. Estes genomas foram clonados e sequenciados comercialmente por *primer walking*. Para atribuir corretamente taxonomia aos novos isolados, foram utilizadas comparações pareadas do genoma completo com outros begomovírus previamente relatados. Alinhamentos múltiplos de sequências nucleotídicas foram preparados para o conjunto de dados DNA-A, CP e Rep de cada uma das espécies virais. Foram realizadas análises filogenéticas, de variabilidade genética, de recombinação e de pressão de seleção. Um total de 30 clones correspondentes ao DNA-A foi obtido. Comparações pareadas indicaram a presença de apenas duas espécies de begomovírus: *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV) a partir de amostras de tomate; e *Sida mottle Alagoas virus* (SiMoAV) em plantas de *Sida* spp. Árvores filogenéticas bayesianas mostraram que isolados de ToMoLCV e SiMoAV estavam estruturados segundo região geográfica, sendo confirmado pelos altos valores de *Fst* [$Fst_{(ToMoLCV)} = 0,51$ e $Fst_{(SiMoAV)} = 0,75$]. As populações de ToMoLCV e SiMoAV apresentaram alta variabilidade genética, com o gene *Rep* sendo o mais variável. Eventos de recombinação foram detectados apenas entre os isolados de ToMoLCV, com breakpoints ocorrendo na Região Comum e Rep. A seleção negativa ou purificadora foi identificada como a principal força seletiva atuando na CP e Rep das populações de ToMoLCV e SiMoAV. O presente estudo confirmou que ToMoLCV é o principal begomovírus infectando plantas de tomate no Nordeste do Brasil, e mostrou que *Sida* spp. parecem não contribuir para epidemias de ToMoLCV em tomate.

Palavras-chave: geminivírus, plantas não-cultivadas, variabilidade genética, estruturação de população.

ABSTRACT

Tomato (*Solanum lycopersicon*) is an important crop in tropical and subtropical regions. Begomoviruses are among the most damaging pathogens infecting this crop, being considered limiting factor in tomato fields. Begomoviruses are whitefly-transmitted, single-stranded DNA plant viruses, with wild/non-cultivated hosts playing a crucial epidemiological role, acting as begomovirus reservoirs. Recently, it has been shown that Brazilian begomoviruses infecting tomatoes are biogeographically segregated, with different viral species being prevalent in different tomato-growing areas. The present study aimed to determine the diversity and genetic structure of begomovirus populations infecting tomato and *Sida* spp. in different tomato fields in northeastern Brazil. Foliar samples of tomato and *Sida* spp. near tomato fields were collected in three different states in northeastern Brazil in 2014. Total DNA was extracted and used as a template for rolling-circle amplification of begomovirus genomes. These genomes were cloned and sequenced commercially by primer walking. To properly assign taxonomy to the novel isolates, full-length genome pairwise comparisons with previously reported begomoviruses was used. Multiple sequence alignments were prepared for the full-length DNA-A, and for the CP and Rep coding sequences of each viral species. Phylogeny, genetic variability, recombination and selection pressure analyses were performed. A total of 30 clones of DNA-A genomic component was obtained. Pairwise comparisons indicated the presence of only two begomovirus species: *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV) from tomato samples; and *Sida mottle Alagoas virus* (SiMoAV) in *Sida* spp. plants. Bayesian phylogenetic trees showed that ToMoLCV and SiMoAV isolates were structured according to geographical region, which was confirmed by high *Fst* values [$Fst_{(ToMoLCV)} = 0.51$ and $Fst_{(SiMoAV)} = 0.75$]. ToMoLCV and SiMoAV populations showed high genetic variability, with the Rep gene of ToMoLCV being the most variable. Recombination events were detected only among ToMoLCV isolates, with recombination breakpoints occurring in the Common Region and Rep. Negative or purifying selection was identified as the major selective force acting on CP and Rep in both ToMoLCV and SiMoAV. The present study confirmed that ToMoLCV is the main begomovirus infecting tomato plants in northeastern Brazil, and showed that *Sida* spp. seems do not contribute to ToMoLCV outbreaks in tomato.

Key words: geminivirus, non-cultivated plants, 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>	17
Figura 2 - Matriz bidimensional representando porcentagem de identidade de comparações pareadas de sequências nucleotídicas do DNA-A coletadas nos estados da PB com amostras de begomovírus disponíveis no GenBank.....	47
Figura 3 - Análise filogenética de inferência Bayesiana baseada no DNA-A do ToMoLCV, mostrando a formação de dois grupos distintos. Grupo 1 = isolados obtidos em MG, PE, BA e PB; Grupo 2 = isolados obtidos no DF e PE.	48
Figura 4 - Análise filogenética de inferência Bayesiana baseada na ORF CP do ToMoLCV, mostrando a formação de dois grupos distintos. Grupo 1 = isolados obtidos em MG, BA e PB; Grupo 2 = isolados obtidos no DF e PE.....	49
Figura 5 - Análise filogenética de inferência Bayesiana baseada na ORF Rep do ToMoLCV, mostrando a formação de dois grupos distintos. Grupo 1 = isolados obtidos na PB; Grupo 2 = isolados obtidos na PB, MG, DF, PE e BA.....	50
Figura 6 - Análise filogenética de inferência Bayesiana baseada no DNA-A do SiMoAIV, mostrando a formação de dois grupos distintos de acordo com a origem geográfica. Grupo 1 = isolados obtidos na PB; Grupo 2 = isolados obtidos em AL.....	51
Figura 7 - Análise filogenética de inferência Bayesiana baseada na ORF CP do SiMoAIV, mostrando a formação de dois grupos distintos de acordo com a origem geográfica. Grupo 1 = isolados obtidos na PB; Grupo 2 = isolados obtidos em AL.....	52
Figura 8 - Análise filogenética de inferência Bayesiana baseada na ORF Rep do SiMoAIV, mostrando a formação de dois grupos distintos de acordo com a origem geográfica. Grupo 1 = isolados obtidos na PB; Grupo 2 = isolados obtidos em AL.....	53
Figura 9 - Análise reticulada baseada no DNA-A do ToMoLCV.....	54
Figura 10 - Análise reticulada baseada na ORF CP do ToMoLCV.....	55
Figura 11 - Análise reticulada baseada na ORF Rep do ToMoLCV.....	56
Figura 12 - Análise reticulada baseada no DNA-A do SiMoLCV.....	57
Figura 13 - Análise reticulada baseada no DNA-A do SiMoLCV.....	58
Figura 14 - Análise reticulada baseada no DNA-A do SiMoLCV.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Amostras de begomovírus provenientes do estado da Paraíba coletadas neste trabalho.....	41
Tabela 2 - Sequências de begomovírus acessadas no banco de dados não-redundante Genbank.....	43
Tabela 3 - Variabilidade genética dos begomovírus ToMoLCV e SiMoAIV infectando hospedeiros cultivados e não-cultivados.....	44
Tabela 4 - Eventos de recombinação detectados entre os ToMoLCV coletados para esse trabalho e os ToMoLCV acessados do Genbank.....	45
Tabla 5 - Sítios selecionados positiva e negativamente nas ORFs CP e Rep das subpopulações específicas de ToMoLCV e SiMoAIV	46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 A cultura do tomate.....	12
2.2 A família <i>Geminiviridae</i>	13
2.3 Organização genômica e papel desempenhado pelas proteínas dos <i>Begomovirus</i>	16
2.4 Replicação viral.	19
2.5 Variabilidade e estrutura genética de populações de begomovírus	21
2.5.1 Mutação.	21
2.5.2 Recombinação.....	22
2.5.3 Pseudorecombinação.....	24
2.6 Diversidade de begomovírus infectando plantas tomateiro e plantas não-cultivadas no Brasil.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Coleta do material vegetal.	30
3.2 Clonagem e sequenciamento do genoma completo de begomovirus.....	30
3.3 Análise de sequências e demarcação de espécies.	31
3.4 Análise filogenética.	31
3.5 Estrutura genética e índices de variabilidade.	32
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.....	34
4.4 Recombinação.	34
4.5 Análise de seleção.....	35
5 DISCUSSÃO	36
6 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicon*) (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é uma hortaliça pertencente à família Solanaceae sendo de elevada importância socioeconômica. O tomate possui propriedades alimentícias benéficas para a saúde humana, além de ser reconhecida como poderosa fonte geradora de emprego e renda em todos os segmentos de sua cadeia produtiva (SILVA; GIORDANO, 2000). Destaca-se entre as hortaliças cultivadas no Brasil em área plantada (65,2 mil hectares) e em produção (4,2 milhões de toneladas), sendo cultivado em todas as regiões brasileiras sob diferentes sistemas de manejo (IBGE, 2014).

A cultura do tomate exige constante manejo, pois está sujeita a vários problemas fitossanitários. Dentre as doenças que afetam o tomateiro, as de origem viral são aquelas que apresentam maior dificuldade no controle, além de serem responsáveis por perdas econômicas significativas em todo o mundo. Entre as viroses de maior importância econômica destacam-se as geminiviruses, que ocorrem em todas as regiões produtoras de solanáceas no Brasil (INOUE-NAGATA; ÁVILLA; VILLAS BÔAS, 2009).

A família Geminiviridae engloba vírus cujo genoma é constituído por DNA circular de fita simples, encapsidado por uma única proteína estrutural que confere à partícula uma estrutura icosaédrica geminada (STANLEY et al., 2005). A família é composta pelos gêneros *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus*, sendo que três desses gêneros foram incluídos mais recentemente na família (VARSANI et al., 2014). Essa divisão é baseada em características como gama de hospedeiros, tipo de inseto vetor, organização genômica e relacionamento filogenético (STANLEY et al., 2005). Os begomovírus possuem um (monossegmentados) ou dois (bissegmentados) componentes genômicos, são transmitidos pela mosca-branca *Bemisia tabaci* e infectam plantas dicotiledôneas. Os begomovírus bissegmentados são compostos por DNA-A e DNA-B. No DNA-A encontram-se os genes envolvidos na replicação e encapsidação da progênie viral, enquanto no DNA-B encontram-se os genes responsáveis pelos movimentos intra e intercelular (LAZAROWITZ, 1992). Ambos os componentes são requeridos para a infecção sistêmica do hospedeiro.

Na década de 1970, foi feito o primeiro relato de begomovírus em tomateiro no Brasil (COSTA, 1975). O vírus foi caracterizado e denominado como *Tomato golden mosaic virus* (TGMV). A partir da década de 1990, prejuízos causados por este grupo de vírus ganharam destaque no Brasil, sendo atualmente reconhecidas diversas espécies de begomovírus infectando o tomateiro (MORALES, 2006; NAVAS-CASTILLO; FIALLO-OLIVÉ;

SÁNCHEZ-CAMPOS, 2011; ROCHA et al., 2013). Este aumento na incidência ocorreu devido à introdução de uma nova espécie (biótipo B) de mosca-branca no Brasil (FRANÇA; VILLAS BÔAS; CASTELO-BRANCO, 1996).

Além de infectarem plantas cultivadas, os begomovírus também infectam outras hospedeiras como plantas não-cultivadas, principalmente aquelas pertencentes às famílias Malvaceae, Euphorbiaceae e Fabaceae (MORALES; ANDERSON, 2001). Alguns estudos demonstraram que begomovírus provenientes de plantas não-cultivadas podem ser transmitidos para espécies cultivadas através do inseto vetor (CASTILLO-URQUIZA et al., 2007; COTRIM et al., 2007).

A diversidade genética dos begomovírus que infectam plantas cultivadas e/ou não-cultivadas no Brasil é alta (AMBROZEVICIUS et al., 2002; CALEGARIO, 2004; CASTILLO-URQUIZA, 2008; LIMA et al., 2013; ROCHA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014) podendo ser resultante de eventos de recombinação e pseudorecombinação entre os begomovírus em infecções mistas (AMBROZEVICIUS, et al, 2002, ZHOU et al., 1997; FONDONG et al., 2000). A mutação, recombinação e pseudorecombinação são as principais fontes que determinam a variação e modificam a estrutura genética das populações dos vírus em plantas. Conhecer a estrutura e a diversidade genética das populações de begomovírus é crucial para a compreensão das interações vírus/vetor/hospedeiros (GARCIA-ARENAL; FRAILE; MALPICA, 2003; ROOSSINCK, 1997). Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo determinar a diversidade e estrutura genética de populações de begomovírus infectando tomateiro (*S. lycopersicum*) e espécies de *Sida* associadas a esta cultura em áreas produtoras na região Nordeste do Brasil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura do tomate

O tomate (*Solanum lycopersicon*) é uma hortaliça pertencente à família Solanaceae, gênero *Solanum* seção *Lycopersicon* (PERALTA et al., 2005). Além de possuir propriedades benéficas para a saúde humana, a cultura é reconhecida como poderosa fonte geradora de emprego e renda em todos os segmentos de sua cadeia produtiva (SILVA; GIORDANO, 2000), o que tornou a tomaticultura uma atividade agrícola de grande importância socioeconômica e amplamente difundida no mundo (LOPES; AVILA, 2005). É originário da parte ocidental da América do Sul, sendo domesticado no México e introduzido na Europa no século XVI. Mais tarde, disseminou-se da Europa para a Ásia meridional e oriental, África e Oriente Médio (NAIKA et al., 2006). No Brasil, a hortaliça foi provavelmente introduzida por imigrantes europeus no final do século XIX, tornando-se a segunda hortaliça em importância econômica, sendo atualmente cultivada na maioria dos estados (FILGUEIRA, 2003).

O tomate é uma das principais hortaliças do mundo, apresentando diferentes segmentos de produção para atender as demandas do mercado (SILVA; GIORDANO, 2000). No ano de 2013, a produção mundial de tomates foi de 163,9 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2015). No Brasil, os três principais estados produtores são Goiás, Minas Gerais e São Paulo. A produção nacional de tomate no ano de 2014 foi de 4,2 milhões de toneladas em uma área plantada de 65,2 mil hectares, sendo o estado de Goiás o maior produtor nacional com 1 milhão de toneladas (IBGE, 2014). A região Nordeste teve uma produção total de 684,4 mil toneladas em uma área plantada de 16,2 mil hectares (IBGE, 2014).

Dentre os fatores que interferem na produção do tomate destaca-se o ataque de pragas e patógenos, sendo considerada uma planta de difícil cultivo. A ocorrência de viroses atinge diretamente a qualidade dos frutos e podem causar perdas severas na produção (INOUE-NAGATA; ÁVILLA; VILLAS BÔAS, 2009). Devido à dificuldade de controle, as doenças causadas por vírus representam um dos problemas mais difíceis a serem enfrentados pelos produtores (COLARICCIO, 2004). As geminiviroses têm causado prejuízos aos produtores de tomate *in natura* e para processamento industrial em todas as regiões produtoras de tomate no Brasil (INOUE-NAGATA; ÁVILLA; VILLAS BÔAS, 2009).

2.2 A família *Geminiviridae*

A família *Geminiviridae* é considerada uma das mais numerosas dentre os vírus de planta, contando com mais de 325 espécies distribuídas em sete gêneros: *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus*. 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).

O gênero *Mastrevirus* inclui os geminivírus com um componente genômico, transmitidos por diversas cigarrinhas (Homoptera: Cicadellidae) a plantas monocotiledôneas. A espécie-tipo é o *Maize streak virus* (MSV), um vírus economicamente importante para a cultura do milho (*Zea mays*). No gênero *Curtovirus* estão os geminivírus com um componente genômico, transmitidos por diversas cigarrinhas (Homoptera: Cicadellidae) a plantas dicotiledôneas. O *Beet curly top virus* (BCTV) é a espécie-tipo. O gênero *Topocuvirus* possui uma única espécie, o *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV), com um componente genômico, transmitida pela cigarrinha *Micrutalis malleifera* (Homoptera: Auchenorrhyncha) a plantas dicotiledôneas (STANLEY et al., 2005). O gênero *Becurtovirus* possui duas espécies aceitas, o *Spinach curly top Arizona virus* (SpSCTV) e *Beet curly top Iran virus* (BCTIV), sendo esta última a espécie-tipo. O BCTIV é transmitido pela cigarrinha *Circulifer haematoceps* (Cicadellidae), existente no Mediterrâneo e Oriente Médio. O gênero *Turncurtovirus* possui uma única espécie, o *Turnip curly top virus* (TCTV), transmitida pela cigarrinha *Circulifer haematoceps*. O gênero *Eragrovirus* possui uma única espécie descrita, o *Eragrostis curvula streak virus* (ECSV), sendo que até o presente momento nenhum inseto vetor foi associado ao processo de transmissão (VARSANI et al., 2014).

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). Atualmente são reconhecidas mais de 200 espécies do gênero *Begomovirus* (BROWN et al., 2015), enfatizando assim a importância desse gênero dentro da família. O gênero *Begomovirus* inclui os mais importantes vírus nas regiões tropicais e subtropicais, como: *Bean golden mosaic virus* (BGMV), *African cassava mosaic virus* (ACMV) e *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 (NELSON; 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 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.

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, 2010; ROMAY et al., 2010). Recentemente, um begomovírus desprovido do componente genômico DNA-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, 2010; 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 monossegmentados 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; SLEAT; PALUKAITIS, 1992). Complexos formados entre vírus e DNA satélite quimérico podem 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.

Os begomovírus causam sintomas extremamente variáveis, dependendo principalmente da espécie viral, da planta hospedeira e da fase da cultura em que a infecção se estabeleceu. Porém, frequentemente observa-se mosaico amarelo, deformação do limbo foliar, redução do crescimento, entre outros (PICÓ; DIAZ; NUEZ, 1996; MORALES; ANDERSON, 2001). 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), o qual foi recentemente 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.

2.3 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 intergênica com cerca de 200 pb, a região comum (RC). A RC é altamente conservada entre dois componentes de uma determinada espécie viral (acima de 90% de homologia). A partir desta região os genes virais divergem nos sentidos virais e complementar (LAZAROWITZ, 1992; PILARTZ; JESKE, 2003). 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'-TAATATT↓AC-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 (TIMMERMANS; DAS; MESSING, 1994; BROWN, 1997; FARIA et al., 2000) (Figura 1).

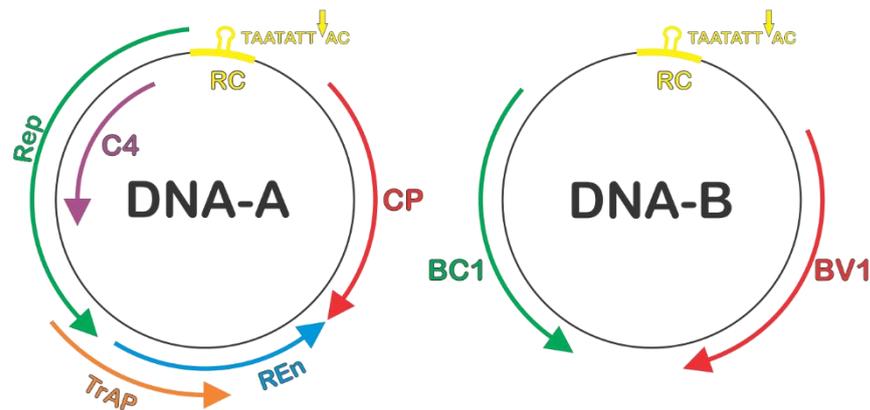


Figura 1. Representação esquemática do genoma do *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV), espécie-tipo do gênero *Begomovirus*. Os círculos representam o genoma viral, com dois componentes (DNA-A e DNA-B) de aproximadamente 2.600 nucleotídeos cada. Uma sequência de aproximadamente 200 nucleotídeos,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

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).

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 nucleicos 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; SUNTER; BISARO, 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 suprimir a resposta do hospedeiro à ação da Rep (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; BEJARANO, 2011; LOZANO-DURÁN 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; WEGE; JESKE, 2004).

2.4 Replicação viral

Ao se alimentar, o inseto vetor deposita as partículas virais nas células floemáticas do hospedeiro (STANLEY, 1995) e o genoma viral (ssDNA) se dissocia de forma espontânea do capsídeo (LAZAROWITZ, 1992; PALMER; RYBICKI, 1998). No interior da célula o ssDNA viral é transportado para o núcleo, onde é convertido em um intermediário de fita dupla (dsDNA) denominado forma replicativa (FR). A FR serve como molde para síntese dos novos componentes genômicos via mecanismo de círculo rolante e também para a transcrição dos genes virais (STANLEY, 2005). 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 (STANLEY, 1995; STENGER et al., 1991).

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, 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; LUTGEMEIER; PREISS, 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; 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; LUTGEMEIER; PREISS, 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; LUTGEMEIER; PREISS, 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).

2.5 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 (GARCÍA-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; FRAILE; MALPICA, 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).

2.5.1 Mutação

Assim como para todos os vírus, a evolução dos geminivírus depende primariamente de mutações. Há evidências de que a rápida evolução dos geminivírus é, ao menos em parte, dirigida por processos mutacionais que agem especificamente sobre ssDNA (HARKINS et al., 2009). O impacto das mutações pontuais tem sido estudado nesse grupo de vírus sob diferentes condições de seleção, como presença de um efeito gargalo, transferências sucessivas entre hospedeiros sem emprego do vetor, e inoculação de plantas resistentes (ISNARD et al., 1998).

Duffy; Holmes (2009) realizaram análises estruturadas no tempo de isolados de *East African cassava mosaic virus* (EACMV) para estimar a taxa de evolução dessa espécie de begomovírus. As taxas foram estimadas em $1,6 \times 10^{-3}$ e $1,33 \times 10^{-4}$ substituições/sítio/ano para o DNA-A e DNA-B, respectivamente. A região que codifica a proteína CP apresentou $1,37 \times 10^{-3}$ subs/sítio/ano e a região que codifica a proteína associada à replicação mostrou $1,24 \times 10^{-3}$ subs/sítio/ano. As regiões codificadoras presentes no DNA-B, ORFs BV1 e BC1, apresentaram $2,77 \times 10^{-4}$ e $3,45 \times 10^{-4}$, respectivamente. Os autores concluíram que as mutações

observadas refletem mais uma rápida dinâmica mutacional do que uma frequência de evolução adaptativa. Contudo, validaram esses altos níveis de heterogeneidade apenas para o DNA-A e a ORF AV1. Foi observado então que 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) e *Tomato yellow leaf curl China virus* (TYLCCNV) (GE et al., 2007; HARKINS et al., 2009). Dados obtidos por Rocha e colaboradores (2013), analisando begomovírus brasileiros bipartidos, mostraram altas frequências de mutação, e que as regiões do genoma que apresentam maiores valores são da região intergênica e do gene *CP*.

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

2.5.2 Recombinação

A recombinação pode ocorrer em genomas de DNA e RNA e desempenham um papel importante na evolução dos vírus de plantas (GARCÍA-ARENAL; FRAILE; MALPICA, 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). A existência de uma possível estratégia de replicação dependente de recombinação (RDR) em adição à replicação por círculo rolante (RCR) (JESKE;

LUTGEMEIER; PREISS, 2001) e a ocorrência de frequentes infecções mistas (AHMAD et al., 2011; PADIDAM; BEACHY; FAUQUET, 1999) explicam, em parte, a elevada frequência de recombinação nesse drupo de vírus.

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).

Um novo begomovírus com provável origem recombinante foi recentemente relatado infectando tomateiro na Argentina (VAGHI MEDINA; MARTIN; LÓPEZ LAMBERTINI, 2015). Esse novo vírus foi denominado Tomato mottle wrinkle virus (ToMoWrV), e possui sequências parentais provavelmente pertencente aos begomovírus *Soybean blistering mosaic virus* (SoBIMV) e *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV). No Brasil, diversos begomovírus infectando tomateiro e com provável origem recombinante têm sido relatados, o que reforça a ideia de que um complexo de espécies de begomovírus infectando este hospedeiro está em formação no Brasil (INOUE-NAGATA et al., 2006; ROCHA et al., 2013; SILVA et al., 2014). A ocorrência frequente de infecções mistas de begomovírus em tomateiro e outras espécies cultivadas e não-cultivadas é considerado fator crucial para o surgimento de novos begomovírus recombinantes (VAGHI MEDINA; MARTIN; LÓPEZ LAMBERTINI, 2015).

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 pareadas possíveis e identificaram cerca de 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).

2.5.3 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 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 também ocorre, apesar de serem mais difíceis (HOFER, et al. 1997a; UNSELD, 2000; GARRIDO-RAMIREZ; SUDARSHANA; GILBERTSON, 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; 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; GILBERTSON, 1996). Assim, o DNA-B passou a ser reconhecido com 100% de eficiência pela proteína Rep do ToMoV. Esse resultado evidencia a importância da pseudorecombinação e da recombinação na evolução de begomovírus e em sua adaptação a novos hospedeiros.

Pseudorecombinante viável 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). Pseudorecombinantes foram obtidos a partir de isolados de duas espécies de begomovírus, a estirpe severa da espécie *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) e uma estirpe da espécie *Tomato leaf curl Gujarat virus* (ToLCGV) que infecta tomate e causa severas perdas no norte da Índia. Ambos os pseudorecombinantes foram infecciosos em *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum* e *S. lycopersicum* (CHAKRABORTY et al., 2008). Silva e colaboradores (2014) demonstraram que dois begomovírus frequentemente encontrados no Sudeste do Brasil infectando tomateiro, o *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) e o *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) são capazes de formar pseudorecombinantes viáveis no seu hospedeiro natural. Além disso, foram mostrados possíveis eventos de recombinação ocorrendo entre esse vírus, sugerindo que ToRMV capturou o DNA-B de ToSRV após processo de recombinação ocorrendo no DNA-A.

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).

2.6 Diversidade de *Begomovirus* infectando tomateiro e plantas invasoras no Brasil

Os begomovírus têm emergido como um dos principais fitopatógenos, particularmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (MORALES, 2006), prejudicando importantes culturas como feijão (*Phaseolus vulgaris*), mandioca (*Manihot esculenta*), algodão (*Gossypium* sp.), tabaco (*Nicotiana tabacum*) e tomate (GRAHAM; MARTIN; ROYE, 2010). No Brasil, o feijoeiro e tomateiro são as culturas mais severamente afetadas (FARIA; MAXWELL, 1999; ZERBINI et al., 2005). 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).

Na década de 1970, foi feito o primeiro relato de begomovírus em tomateiro no Brasil (COSTA, 1975). O vírus foi caracterizado e denominado como *Tomato golden mosaic virus* (TGMV). Além do TGMV, cinco outros vírus transmitidos por mosca-branca foram identificados, porém sem causar danos de importância econômica (MATYIS et al., 1975). Segundo Bedford et al. (1994), isso provavelmente acontecia porque o biótipo A de *B. tabaci*, o único biótipo presente no Brasil naquela época, colonizava o tomateiro com baixa eficiência. Entretanto, em 1998, RIBEIRO et al. relataram a ocorrência de pelo menos seis espécies novas em plantas exibindo sintomas de mosaico amarelo, severa deformação foliar e epinastia. A análise de sequência de nucleotídeos de um segmento do genoma de isolados coletados entre 1994 e 1999 demonstrou a existência de sete possíveis novas espécies no Brasil (RIBEIRO et al., 2003).

Em 1996, foi identificado no Triângulo Mineiro, um begomovírus causando mosaico e deformação foliar em tomateiro (REZENDE et al., 1996; ZERBINI et al., 1996). A caracterização biológica, molecular e a comparação da sequência completa de nucleotídeos do DNA-A e DNA-B comprovou se tratar de uma nova espécie, o *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) (RIBEIRO et al., 2003; FERNANDES et al., 2006). No mesmo ano, outra espécie nova de begomovírus foi isolada de tomateiro na Zona Metalúrgica de Minas Gerais, a nova espécie foi designada *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) (AMBROZEVICIUS et al., 2002; RIBEIRO et al., 2003). Isolados desse vírus foram identificados na Bahia, Espírito Santo, Pernambuco e Rio de Janeiro (RIBEIRO et al., 2003). A identidade de sequência entre ToCMoV e ToRMV é de 86 e 60% para o DNA-A e o DNA-B, respectivamente, o que demonstra que eles são bem distintos quanto a composição do genoma (CALEGARIO et al., 2007). Em São João de Bicas, Minas Gerais, um novo isolado de begomovírus (MG-Bi2) foi identificado causando sintomas severos em tomateiro. O isolado foi caracterizado biológica e molecularmente, demonstrando tratar-se de uma nova espécie designada *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) (CALEGARIO et al., 2007).

O surgimento deste complexo de espécies de begomovírus em tomateiro no Brasil coincidiu com a introdução e disseminação do biótipo B de *B. tabaci* (AMBROZEVICIUS et al., 2002; RIBEIRO et al., 2003). Desde então, pelo menos 11 espécies de begomovírus foram descritas infectando tomate naturalmente no campo: *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), *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., 2010; RIBEIRO et al., 2003; ALBUQUERQUE et al., 2012).

Algumas dessas espécies encontram-se amplamente distribuídas pelo país, enquanto outras estão restritas a certas regiões. Por exemplo, o ToSRV já foi relatado nos estados de Goiás, Minas Gerais, Pernambuco, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo (REZENDE et al., 1997; LIMA et al., 2006; CASTILLO-URQUIZA et al., 2007; COTRIM et al., 2007; FERNANDES et al., 2008). Por outro lado, o ToYSV foi relatado apenas em Minas Gerais (CALEGARIO et al., 2007). Na região Nordeste, predomina o *Tomato mottle leaf curl virus* (TMoLCV) nos estados da Bahia e Pernambuco (FERNANDES et al., 2008). Isolados de ToYVSV e ToSRV tornaram-se predominantes em campos de tomate ao longo dos anos, sendo detectado na maioria das amostras coletadas em uma série de estudos (FERNANDES et al., 2008). Segundo Castillo-urquiza et al., (2008), os outros vírus são sempre detectados, embora em um menor número de amostras.

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

Acredita-se que a emergência dos begomovírus que infectam tomateiro no Brasil seja resultado da transferência horizontal de vírus nativos que infectam plantas não-cultivadas pelo biótipo B da mosca-branca. Uma vez presentes no novo hospedeiro, esses vírus evoluíram rapidamente via recombinação e pseudorecombinação, dando origem às espécies atualmente detectadas no campo (CASTILLO-URQUIZA et al., 2008).

Estudos de caracterização biológica de alguns dos vírus de tomate (ToRMV, ToCMoV e ToYSV) demonstraram que espécies de plantas não-cultivadas como *Nicandra physaloides*, *Solanum nigrum* e *Datura stramonium* são hospedeiros alternativos destes vírus (FERNANDES et al., 2006; RIBEIRO et al., 2007; CALEGARIO et al., 2007). Em 2006, ANDRADE e colaboradores realizaram comparação das sequências e análise filogenética dos componentes genômicos do ToYSV e observaram uma estreita relação com begomovírus isolados de *Sida* sp., *Sida mottle virus* (SiMoV), *Sida yellow mosaic virus* (SiYMV) e *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV).

Em 2010, Silva; Santos; Nascimento realizaram ensaios de inoculação de begomovírus via mosca-branca e enxertia com o objetivo de verificar a transmissão a partir de tomateiros infectados para quatro espécies de plantas não-cultivadas (*Amaranthus spinosus*, *A. viridis*, *Ageratum conizoides* e *Bidens pilosa*) e verificação de seu retorno para o tomateiro. Os resultados revelaram que houve transmissão dos begomovírus do tomateiro para as quatro espécies de plantas não-cultivadas via transmissão pelo inseto vetor. Por enxertia, apenas *B. pilosa* foi infectada. O retorno do vírus das plantas não-cultivadas para o tomateiro foi também observado em ambos os casos. Apesar de as espécies de begomovírus presentes em tomateiro não terem sido identificadas, esses resultados sugerem que plantas não-cultivadas podem constituir uma importante fonte de inóculo atuando como hospedeiras alternativas dos begomovírus presentes em tomateiro. Esta hipótese é reforçada pela observação de que begomovírus infectando *Crotalaria* spp., *Euphorbia heterophylla*, *N. physaloides*, e *Sida* spp. foram transmitidos com sucesso para plantas de tomate, em particular o ToSRV, um begomovírus comumente encontrado infectando tomateiro (BARRETO et al., 2013). Neste trabalho foi confirmado que *Crotalaria* spp., *E. heterophylla* e *Sida* spp. estavam infectadas com ToSRV, demonstrando que as plantas não-cultivadas são fontes potenciais de ToSRV para tomate no Brasil.

Rocha et al. (2013) trabalhando com espécies de begomovírus infectando tomateiro, hospedeiros não-cultivados e espécies de begomovírus 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 os vírus deste tipo de hospedeiro são geneticamente mais variáveis do que os predominantemente encontrados em tomateiro.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta do material vegetal

Amostras foliares de tomateiro (cultivares SM16 e Fascínio) e *Sida* spp. (associadas aos campos de cultivo de tomate) apresentando sintomas indicativos de infecção por begomovírus (amarelecimento, mosaico, deformação foliar e nanismo) foram coletadas no estado da Paraíba (PB) em maio de 2014 (Tabela 1). Um total de 140 amostras foram coletadas, sendo 100 provenientes de tomateiro e 40 de *Sida*. Para cada amostra as seguintes informações foram anotadas: espécie de planta, data de coleta, coordenadas de GPS do local de coleta e sintomas (descrição e imagem digital da amostra no momento da coleta). O material vegetal foi armazenado como exsiccatas no Laboratório de Fitopatologia Molecular e Virologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas.

3.2 Clonagem e sequenciamento do genoma completo de begomovírus

O DNA total foi extraído a partir de cada amostra vegetal segundo protocolo de Doyle; Doyle (1987). Os genomas virais foram amplificados utilizando-se a enzima DNA polimerase do bacteriófago phi29, do Kit TempliPhi (GE Healthcare), de acordo com o método descrito por Inoue-Nagata et al. (2004). Alíquotas das amplificações foram submetidas, individualmente, a clivagens com enzimas de restrição (*Apa*I, *Bam*HI, *Hind*III e *Sac*I), para linearizar o genoma. Os produtos das reações foram então analisados em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio (5 µg/mL) e visualizados sob luz UV. Alíquotas das reações de clivagem contendo fragmentos de aproximadamente 2600 nucleotídeos (nt), correspondente a uma cópia de cada componente genômico, foram utilizadas para ligação no vetor pBluescript KS+ (Stratagene) previamente linearizado com a mesma enzima e defosforilado. O produto da reação de ligação foi utilizado para transformação de células ultracompetentes de *Escherichia coli* estirpe DH5α pelo método de choque térmico (SAMBROOK, et al., 2001). Colônias contendo os possíveis plasmídeos recombinantes foram repicadas para meio LB líquido contendo ampicilina (Ampicilin, sodium salt USB®) e incubadas a 37°C sob agitação orbital de 180 rpm durante 12h. Após incubação, as culturas foram submetidas à extração de DNA plasmidial com KIT illustra™ plasmidPrep Mini Spin (GE Healthcare), 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 componentes genômicos virais completos foram montados utilizando-se o programa *CodonCode Aligner* v. 4.1.1 (www.codoncode.com). As sequências obtidas foram inicialmente analisadas com o algoritmo BLASTn (ALTSCHUL et al., 1990) e o banco de dados de nucleotídeos não-redundante GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) para determinar as espécies virais com as quais elas compartilham maior identidade de sequência. As sequências similares a partir do GenBank foram utilizadas para demarcação de espécie dos novos isolados de begomovírus utilizando-se o programa *Sequence Demarcation Tool* v. 1.2 (MUHIRE et al., 2013). Sequências adicionais foram obtidas a partir do GenBank para análises posteriores (Tabela 2).

3.4 Análise filogenética

Alinhamentos múltiplos de sequências nucleotídicas foram preparados para os conjuntos de dados DNA-A, CP e Rep dos isolados de *Sida mottle Alagoas virus* (SiMoAIV) e *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV) utilizando-se o algoritmo MUSCLE (EDGAR, 2004) e ajustados manualmente no pacote MEGA6 (TAMURA et al., 2013). Inferência Bayesiana para o DNA-A, CP e Rep foi realizada no *web portal* CIPRES (MILLER et al., 2010) usando MrBayes v. 3.2.3 (RONQUIST et al., 2012). O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi determinado para cada conjunto de dados usando MrModeltest 2.3 (POSADA; BUCKLEY, 2004) de acordo com o *Akaike Information Criterion* (AIC). Os modelos evolutivos GTR+I, GTR+I, HKY+I, GTR+I, SYM+G e GTR+I foram utilizados para os conjuntos de dados DNA-A, CP e Rep de SiMoAIV e ToMoLCV, respectivamente. Análises foram rodadas para cada conjunto de dados por 10 milhões de gerações usando quatro cadeias e amostrando a cada 1.000 gerações, para um total de 10.000 árvores. As primeiras 2.500 árvores foram descartadas como uma fase de *burn-in*. Probabilidades posteriores (RANNALA; YANG, 1996) foram determinadas a partir de uma árvore consenso *majority-rule* gerada com as 7.500 árvores remanescentes. As árvores foram visualizadas e editadas nos programas FigTree v. 1.4 (ztree.bio.ed.ac.uk/software/figtree) e Inkscape (<https://inkscape.org/pt/>).

3.5 Estrutura genética e índices de variabilidade

Inferências sobre a estrutura genética das subpopulações foram baseadas no índice de fixação F de Wright (WRIGHT, 1949), calculado usando o programa DnaSP v. 5.10 (ROZAS et al., 2003). A estruturação das subpopulações de SiMoAIV e ToMoLCV foi testada de acordo com a localização geográfica dos hospedeiros e ano de coleta. A média das diferenças de nucleotídeos por sítio (π) foi estimada para os conjuntos de dados DNA-A, CP e Rep em cada população/subpopulação de SiMoAIV e ToMoLCV utilizando-se DnaSP v. 5.10.

3.6 Análises de recombinação

Possíveis locais (*breakpoints*) de recombinação no DNA-A dos isolados de SiMoAIV e ToMoLCV foram determinados utilizando-se os métodos RDP, Geneconv, Boot-scan, Maximum Chi Square, Chimaera, SisterScan e 3Seq implementados no pacote RDP v. 4.0 (MARTIN et al., 2015). 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 quatro 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 evidência de pressão de seleção positiva ou negativa, os conjuntos de dados para CP e Rep de SiMoAIV e ToMoLCV foram analisados utilizando-se os métodos baseados em ML disponível no servidor DataMonkey (www.datamonkey.org): *Single-Likelihood Ancestor Counting* (SLAC) e *Robust Inference of Selection* (PARRIS) (KOSAKOVSKY-POND; FROST, 2005; SCHEFFLER et al., 2006). Para evitar erros nos resultados de análises de seleção causados por recombinação, somente sequências detectadas como não recombinantes foram utilizadas. O método SLAC foi usado para estimar a taxa média de substituições não-sinônimas por substituições sinônimas (dN/dS) baseada nas árvores filogenéticas inferidas pelo *Genetic Algorithm Recombination Detection* (GARD) (KOSAKOVSKY-POND; FROST, 2005).

4 RESULTADOS

4.1 Demarcação de espécie

Um total de 30 clones foi obtido a partir das amostras de tomate e plantas de *Sida* coletadas em Boqueirão, estado da Paraíba. Análise BLAST_n mostrou que todos os componentes genômicos correspondiam ao DNA-A. Usando comparações pareadas e o critério de $\geq 91\%$ de identidade para sequências completas de DNA-A, estabelecido pelo *Geminiviridae Study Group* do *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) para demarcação de espécies dentro do gênero *Begomovirus* (BROWN et al., 2015), os 30 clones obtidos aqui foram classificados em duas espécies distintas (Figura 2). Os 17 clones obtidos a partir de amostras de tomate foram identificados como pertencentes à espécie *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV), com porcentagem de identidade de nucleotídeos variando entre 92-96 % com isolados de ToMoLCV presentes no GenBank (números de acesso JF803250 e KC706615). Entre os isolados de ToMoLCV descritos neste trabalho, a identidade nucleotídica variou entre 94,5-100 % (Figura 2). Os 13 clones obtidos a partir de *Sida* spp. corresponderam ao begomovírus *Sida mottle Alagoas virus* (SiMoAIV), com porcentagem de identidade nucleotídica variando entre 91-92 % com isolados de SiMoAIV presentes no GenBank (números de acesso JX871384 e JX871385). Entre os isolados de SiMoAIV descritos aqui, a identidade nucleotídica variou entre 95,5-100 % (Figura 2).

4.2 Filogenia

Análise filogenética baseada na sequência de nucleotídeos dos conjuntos de dados DNA-A, CP e Rep das subpopulações de ToMoLCV e SiMoAIV incluiu isolados obtidos aqui e outros disponíveis no GenBank (Tabelas 1 e 2). As árvores filogenéticas bayesianas para os conjuntos DNA-A e CP do ToMoLCV foram similares, com formação de dois grupos principais (Figuras 3 e 4). O Grupo 1 possui todos os isolados obtidos neste trabalho e alguns isolados proveniente dos estados da Bahia (BA) e Minas Gerais (MG) (Figuras 3 e 4). Similarmente, o Grupo 2 abrangiu isolados provenientes de regiões geográficas distantemente localizadas [Pernambuco (PE) e Distrito Federal (DF)]. Quando comparadas com a filogenia para Rep, dois grupos principais ainda são formados, porém com algumas incongruências topológicas (Figura 5). Alguns isolados pertencentes ao Grupo 1 para as filogenias DNA-A e CP agruparam no Grupo 2 para árvore de Rep, sugerindo possíveis eventos de recombinação entre os isolados de ToMoLCV. Essa hipótese ganha força através da análise reticulada. A

formação de dois grupos principais em todas as árvores filogenéticas sugere estruturação populacional para os isolados de ToMoLCV, o que foi confirmado baseado no alto valor observado para o teste de diferenciação F_{st} segundo região geográfica ($F_{st_{geografia}} = 0,51$).

As filogenias para o DNA-A, CP e Rep do SiMoAIV foram bastante similares (Figuras 6-8). Podem ser observados dois grupos principais (Grupos 1 e 2). O Grupo 1 foi constituído por todos os isolados obtidos de amostra da PB, enquanto o Grupo 2 de isolados provenientes do estado de Alagoas, sugerindo estruturação populacional entre os isolados de SiMoAIV. Esta hipótese foi confirmada pelo alto valor observado para o teste de diferenciação F_{st} segundo região geográfica e data de coleta ($F_{st_{geografia/data}} = 0,75$). Nenhuma evidência filogenética de recombinação foi observada.

4.3 Diversidade genética

O índice de diversidade nucleotídica (π) para os isolados de ToMoLCV foi maior para o gene Rep, tanto na população total quanto na subpopulação proveniente da PB, quando comparados com os índices para o DNA-A e CP (Tabela 3). Em todos os conjuntos de dados (DNA-A, CP e Rep), o valor de π foi maior para a população total em relação à subpopulação da PB. Para os isolados de SiMoAIV, os valores observados de π foram similares para todos os conjuntos de dados dentro das subpopulações, porém a variabilidade foi maior para a população total em relação à subpopulação da PB (Tabela 3). Quando comparados os índices de diversidade nucleotídica entre as duas espécies de begomovírus, pode ser observado que o conjunto de dados Rep da população total do ToMoLCV continua sendo o mais variável, provavelmente devido eventos de recombinação ocorrendo nessa região. Entretanto, para o gene CP, a variabilidade foi maior para os isolados de SiMoAIV em ambas as subpopulações total e da PB (Tabela 3).

4.4 Recombinação

A análise reticulada para os conjuntos de dados DNA-A, CP e Rep revelou forte evidência de eventos de recombinação contribuindo para o processo evolutivo de isolados de ToMoLCV, porém não para os isolados de SiMoAIV (Figuras 9-14), como já observado nas árvores filogenéticas. A formação de rede foi mais evidente para o DNA-A e o gene Rep do ToMoLCV (Figuras 9 e 11), onde possíveis eventos de recombinação podem estar associados a isolados relatados no presente trabalho (isolados 46PB, 108PB e 117PB) e isolados

provenientes de MG (KC706616 e KC706615), BA (JF803250) e PE (JF803251). Para adicionalmente investigar possíveis eventos de recombinação, conjuntos de dados para o DNA-A de ToMoLCV e SiMoAIV foram analisados utilizando o pacote RDP4. Como evidenciado pela análise reticulada, apenas eventos de recombinação ocorrendo em isolados de ToMoLCV foram detectados (Tabela 4). Pelo menos dois eventos independentes de recombinação foram detectados, com pontos (*breakpoints*) de recombinação ocorrendo na Região Comum (CR) e Rep (Tabela 4). Juntos, estes resultados reforçam a importância da recombinação no processo evolutivo de espécies pertencentes ao gênero *Begomovirus*.

4.5 Análise de seleção

A análise dos conjuntos de dados para as regiões genômicas codificando os genes CP e Rep das subpopulações de ToMoLCV e SiMoAIV provenientes da PB mostrou que a pressão de seleção negativa ou purificadora é a principal força seletiva agindo sobre essas subpopulações. A razão das taxas de substituições não-sinônimas por substituições sinônimas (*dN/dS*), estimadas pelo método SLAC, foi bem menor que um para todos os conjuntos de dados (Tabela 5). PARRIS não identificou nenhum sítio sob pressão de seleção positiva nos conjuntos de dados analisados, reforçando que seleção negativa é a mais importante força seletiva atuando sobre as subpopulações de ToMoLCV e SiMoAIV (Tabela 5).

5 DISCUSSÃO

O primeiro relato de begomovírus infectando tomateiro no Brasil foi realizado na década de 1970 (COSTA, 1975). Entretanto, somente a partir da década de 1990, prejuízos causados por este grupo de vírus à cultura do tomateiro tornaram-se evidentes, sendo atualmente reconhecidas diversas espécies de begomovírus infectando este hospedeiro (MORALES, 2006; NAVAS-CASTILLO et al., 2011; ROCHA et al., 2013). Acredita-se que a emergência dos begomovírus infectando tomateiro no Brasil seja resultado da transferência de vírus nativos, a partir de plantas silvestres, pela mosca-branca Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1; conhecida como biótipo B) no início de 1990 (BEDFORD et al., 1994). Recentemente, um amplo trabalho com begomovírus infectando tomateiros e plantas não-cultivadas na região Sudeste do Brasil demonstrou que populações brasileiras de begomovírus em tomateiro estão estruturadas biogeograficamente, e que tais populações apresentam alta variabilidade genética, porém com subpopulações infectando plantas não-cultivadas apresentando-se mais variáveis que subpopulações infectando o tomateiro (ROCHA et al., 2013). Resultados semelhantes foram observados para begomovírus em outras culturas, onde begomovírus infectando hospedeiras leguminosas cultivadas e não-cultivadas apresentaram estruturação segundo localização geográfica e alta variabilidade genética (RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Similarmente, neste trabalho foi observado que populações de begomovírus infectando tomateiro e espécies de *Sida* no Nordeste do Brasil apresentam estruturação biogeográfica e alta variabilidade genética.

ToMoLCV foi o único begomovírus encontrado infectando tomateiro no estado da PB, Brasil, em 2014. Estudos anteriores demonstraram que para cada região de cultivo de tomate, espécies distintas de begomovírus podem ser predominantes (FERNANDES et al., 2008; ROCHA et al. 2013). Entre 2003 e 2004, foi observado que ToSRV e TGVV eram as espécies prevalentes na região Centro-Oeste do Brasil, e ToMoLCV na região Nordeste (FERNANDES et al., 2008). Foi demonstrado ainda que entre 2005 e 2010, ToCmMV, ToCMoV, ToSRV e ToYVSV eram as espécies prevalente na região Sudeste (ROCHA et al., 2013). Interessantemente, mesmo após mais de dez anos, ToMoLCV parece ser o begomovírus prevalente em campos de cultivo de tomate do Nordeste. Entretanto, como o presente estudo foi limitado a apenas um estado desta região, mais sequências completas de begomovírus infectando tomateiro em diferentes áreas produtoras são necessárias para confirmar essa hipótese.

Hospedeiros malváceos ornamentais e silvestres, principalmente membros dos gêneros *Abutilon* e *Sida*, são conhecidos por sustentar uma grande diversidade de espécies de begomovírus (JOVEL et al., 2004; CASTILLO-URQUIZA, et al., 2008; ARANHA et al., 2011; TAVARES et al., 2012), com algumas espécies cultivadas também sendo infectadas por este grupo de vírus (BRIDDON, 2003; ARANHA et al., 2011; ALBUQUERQUE et al., 2013). No Brasil, *Sida* spp. têm sido frequentemente descritas como hospedeiras de várias espécies de begomovírus, podendo desempenhar um importante papel epidemiológico como fonte de begomovírus para espécies cultivadas, especialmente tomateiro (CASTILLO-URQUIZA et al., 2008; TAVARES et al., 2012). No presente trabalho, somente SiMoAIV foi encontrado infectando as diferentes espécies de *Sida*. Estes resultados sugerem que os hospedeiros silvestres avaliados podem não estar contribuindo para epidemias de begomovírus na cultura do tomateiro, já que não foram encontradas evidências de ToMoLCV em amostras de *Sida*, nem SiMoAIV em tomate. Entretanto, é possível que esses begomovírus possam estar presentes em baixas concentrações em seu hospedeiro não usual (por exemplo, ToMoLCV infectando *Sida* spp., e SiMoAIV infectando tomate), e por isso, não foram detectados pelo método de clonagem utilizado aqui.

Mecanismos evolutivos como mutação e recombinação, e a interrelação entre espécie viral/hospedeiro/biótipo de mosca-branca são fatores importantes na determinação da estrutura populacional dos begomovírus (NAVAS-CASTILLO et al., 2011; LIMA et al., 2013; ROCHA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Estudos recentes demonstraram que populações brasileiras de begomovírus em tomateiro e espécies leguminosas estão estruturadas biogeograficamente (ROCHA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Resultados similares foram observados para ToMoLCV e SiMoAIV infectando tomateiro e espécies não-cultivadas da família Malvaceae.

Isolados de ToMoLCV agruparam em dois clados principais de acordo com área de amostragem, fornecendo evidência de estruturação biogeográfica. Evidência filogenética foi confirmada pelo alto valor observado do índice de fixação ($F_{st_{geografia}} = 0,51$). Resultados semelhantes foram encontrados para outras populações de begomovírus em tomateiro, onde valores de $F_{st} > 0,25$ foram relacionados com diferentes populações de begomovírus, mostrando assim altos níveis de diferenciação genética segundo região geográfica (ROCHA et al., 2013). Alto valor de diferenciação genética ($F_{st_{geografia}} = 0,75$) foi também observado para os isolados de SiMoAIV, confirmando assim os resultados filogenéticos para subdivisão de população. É interessante notar que, apesar de a distância entre isolados do SiMoAIV ser bem menor [195 km entre Boqueirão (PB) e Maragogi (AL)] quando comparada com a distância

entre isolados do ToMoLCV [700 km entre Juazeiro (BA) e Jaíba (MG)], nenhuma evidência de migração foi encontrada. Contudo, como pequeno número de isolados de SiMoAIV foi obtido, mais sequências precisam ser obtidas para confirmar estes resultados.

Os principais mecanismos evolutivos determinando a distribuição de variabilidade genética em populações virais são mutação e recombinação (GARCIA-ARENAL; FRAILE; MALPICA, 2003). Estudos mostram 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 estudo, altos índices de variabilidade genética foram observados nas subpopulações de ToMoLCV e SiMoAIV, principalmente para o conjunto de dados Rep da população total do ToMoLCV ($\pi_{\text{total}} = 0.0661$), sendo muito superiores a índices já publicados para outras populações de begomovírus em tomate, onde o maior valor observado foi para uma população do ToCmMV ($\pi = 0.0143$) (GONZÁLES-AGUILERA et al., 2012; ROCHA et al., 2013). Esta alta variabilidade no gene *Rep* do ToMoLCV pode ser explicada principalmente pelos eventos de recombinação ocorrendo nessa região. Quando comparada a variabilidade para o gene *CP*, onde nenhuma evidência de recombinação foi encontrada, pode-se observar que esta variação em ToMoLCV é bem menor ($\pi_{\text{total}} = 0,0234$ e $\pi_{\text{PB}} = 0,0041$), reforçando a ideia de que recombinação é o principal fator envolvido com os altos índices de variabilidade em Rep. Quando comparadas as variabilidades para todas as subpopulações (total e PB), nota-se que os índices são bem maiores para as populações totais em ambos ToMoLCV e SiMoAIV. Estes resultados podem estar relacionados ao fato de as populações desses vírus estarem estruturadas, e com isso, os valores de variabilidade observados para as populações totais na verdade refletem a variação interpopulacional.

Recombinação é um dos principais mecanismos evolutivos atuando sobre populações de begomovírus (SILVA et al., 2012; ROCHA et al., 2013; LIMA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). 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, e menos frequentemente localizados nas demais regiões genômicas (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). Recombinação, além de mutação, foi detectada como sendo um importante mecanismo atuando na evolução dos isolados de ToMoLCV, estando diretamente relacionada com os altos índices de

variabilidade observados para o gene *Rep*. Entretanto, recombinação parece não ser importante para evolução dos isolados de SiMoAIV, com mutação sendo o principal mecanismo evolutivo envolvido na diversificação desse begomovírus. Estudos anteriores demonstraram a natureza recombinante de isolados do ToMoLCV, revelando que isolados de ToMoLCV do Centro-Oeste surgiram a partir de recombinação entre o ToMoLCV de PE e o *Tomato chlorotic mottle virus* (ALBUQUERQUE et al., 2012).

Seleção negativa ou purificadora têm sido relatada como a principal força seletiva atuando sobre populações de begomovírus infectando espécies cultivadas e não-cultivadas (SILVA et al., 2011; LIMA et al. 2013; ROCHA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Similarmente, seleção purificadora foi a principal força seletiva atuando sobre os genes *CP* e *Rep* dos begomovírus ToMoLCV e SiMoAIV. O fato da *Rep* de isolados de begomovírus (incluindo ToMoLCV) apresentar diferentes eventos de recombinação que geram alto grau de variabilidade, e que seleção purificadora atua fortemente nessa região, indica que essa força seletiva deve atuar para preservar a sequência de aminoácidos codificada pelo gene *Rep*. Este gene em geminivírus inclui regiões ou motivos conservados de grande importância para o processo de replicação viral (ILYINA; KOONIN, 1992; NASH et al., 2011). Portanto, manutenção da integridade dessas regiões é crucial para o sucesso da replicação, e conseqüentemente, infecção viral.

6 CONCLUSÕES

- ToMoLCV é o begomovírus predominante em tomateiro no Nordeste do Brasil.
- Espécies de *Sida* parecem não contribuir para epidemias de ToMoLCV em tomateiro.
- As populações de ToMoLCV e SiMoAIV apresentam-se estruturada segundo origem geográfica.
- Mutação, recombinação e seleção negativa ou purificadora são os principais mecanismos evolutivos atuando sobre as populações de ToMoLCV e SiMoAIV.

Tabela 1. Amostras de begomovírus provenientes do estado da Paraíba coletadas neste trabalho.

Código	Coordenadas Geográficas		Especie/Acrônimo	Isolado	Hospedeiro	Local	Data
44PB	-7°29'8" S	-36°9'45" W	<i>Tomato mottle leaf curl virus/ToMoLCV</i>	BR:Boq44:14A	<i>Solanum lycopersicum</i>	Boqueirão – PB	Maio, 2014
45PB	-7°29'8" S	-36°9'45" W	<i>Tomato mottle leaf curl virus/ToMoLCV</i>	BR:Boq45:14A	<i>Solanum lycopersicum</i>	Boqueirão – PB	Maio, 2014
46PB	-7°29'8" S	-36°9'45" W	<i>Tomato mottle leaf curl virus/ToMoLCV</i>	BR:Boq46:14A	<i>Solanum lycopersicum</i>	Boqueirão – PB	Maio, 2014
80PB	-7°29'8" S	-36°9'45" W	<i>Tomato mottle leaf curl virus/ToMoLCV</i>	BR:Boq80:14A	<i>Solanum lycopersicum</i>	Boqueirão – PB	Maio, 2014
83PB	-7°29'8" S	-36°9'45" W	<i>Tomato mottle leaf curl virus/ToMoLCV</i>	BR:Boq83:14A	<i>Solanum lycopersicum</i>	Boqueirão – PB	Maio, 2014
84PB	-7°29'8" S	-36°9'45" W	<i>Tomato mottle leaf curl virus/ToMoLCV</i>	BR:Boq84:14A	<i>Solanum lycopersicum</i>	Boqueirão – PB	Maio, 2014
85PB	-7°29'8" S	-36°9'45" W	<i>Tomato mottle leaf curl virus/ToMoLCV</i>	BR:Boq85:14A	<i>Solanum lycopersicum</i>	Boqueirão – PB	Maio, 2014
103PB	-7°29'8" S	-36°9'45" W	<i>Tomato mottle leaf curl virus/ToMoLCV</i>	BR:Boq103:14A	<i>Solanum lycopersicum</i>	Boqueirão – PB	Maio, 2014
105PB	-7°29'8" S	-36°9'45" W	<i>Tomato mottle leaf curl virus/ToMoLCV</i>	BR:Boq105:14A	<i>Solanum lycopersicum</i>	Boqueirão – PB	Maio, 2014
106PB	-7°29'8" S	-36°9'45" W	<i>Tomato mottle leaf curl virus/ToMoLCV</i>	BR:Boq106:14A	<i>Solanum lycopersicum</i>	Boqueirão – PB	Maio, 2014
108PB	-7°29'8" S	-36°9'45" W	<i>Tomato mottle leaf curl virus/ToMoLCV</i>	BR:Boq108:14A	<i>Solanum lycopersicum</i>	Boqueirão – PB	Maio, 2014
109PB	-7°29'8" S	-36°9'45" W	<i>Tomato mottle leaf curl virus/ToMoLCV</i>	BR:Boq109:14A	<i>Solanum lycopersicum</i>	Boqueirão – PB	Maio, 2014
116PB	-7°29'8" S	-36°9'45" W	<i>Tomato mottle leaf curl virus/ToMoLCV</i>	BR:Boq116:14A	<i>Solanum lycopersicum</i>	Boqueirão – PB	Maio, 2014
117PB	-7°29'8" S	-36°9'45" W	<i>Tomato mottle leaf curl virus/ToMoLCV</i>	BR:Boq117:14A	<i>Solanum lycopersicum</i>	Boqueirão – PB	Maio, 2014
137PB	-7°29'8" S	-36°9'45" W	<i>Tomato mottle leaf curl virus/ToMoLCV</i>	BR:Boq137:14A	<i>Solanum lycopersicum</i>	Boqueirão – PB	Maio, 2014
141PB	-7°29'8" S	-36°9'45" W	<i>Tomato mottle leaf curl virus/ToMoLCV</i>	BR:Boq141:14A	<i>Solanum lycopersicum</i>	Boqueirão – PB	Maio, 2014
142PB	-7°29'8" S	-36°9'45" W	<i>Tomato mottle leaf curl virus/ToMoLCV</i>	BR:Boq142:14A	<i>Solanum lycopersicum</i>	Boqueirão – PB	Maio, 2014

Tabela 1. Amostras de begomovírus provenientes do estado da Paraíba coletadas para esse trabalho. (conclusão)

5PB	-7°29'8'' S	-36°9'45'' W	<i>Sida mottle Alagoas virus</i> /SiMoAV	BR:Boq5:14A	<i>Sida</i> spp.	Boqueirão – PB	Maio, 2014
7PB	-7°29'8'' S	-36°9'45'' W	<i>Sida mottle Alagoas virus</i> /SiMoAV	BR:Boq7:14A	<i>Sida</i> spp.	Boqueirão – PB	Maio, 2014
8PB	-7°29'8'' S	-36°9'45'' W	<i>Sida mottle Alagoas virus</i> /SiMoAV	BR:Boq8:14A	<i>Sida</i> spp.	Boqueirão – PB	Maio, 2014
9PB	-7°29'8'' S	-36°9'45'' W	<i>Sida mottle Alagoas virus</i> /SiMoAV	BR:Boq9:14A	<i>Sida</i> spp.	Boqueirão – PB	Maio, 2014
11PB	-7°29'8'' S	-36°9'45'' W	<i>Sida mottle Alagoas virus</i> /SiMoAV	BR:Boq11:14A	<i>Sida</i> spp.	Boqueirão – PB	Maio, 2014
14PB	-7°29'8'' S	-36°9'45'' W	<i>Sida mottle Alagoas virus</i> /SiMoAV	BR:Boq14:14A	<i>Sida</i> spp.	Boqueirão – PB	Maio, 2014
26PB	-7°29'8'' S	-36°9'45'' W	<i>Sida mottle Alagoas virus</i> /SiMoAV	BR:Boq26:14A	<i>Sida</i> spp.	Boqueirão – PB	Maio, 2014
28PB	-7°29'8'' S	-36°9'45'' W	<i>Sida mottle Alagoas virus</i> /SiMoAV	BR:Boq28:14A	<i>Sida</i> spp.	Boqueirão – PB	Maio, 2014
29PB	-7°29'8'' S	-36°9'45'' W	<i>Sida mottle Alagoas virus</i> /SiMoAV	BR:Boq5:14A	<i>Sida</i> spp.	Boqueirão – PB	Maio, 2014
32PB	-7°29'8'' S	-36°9'45'' W	<i>Sida mottle Alagoas virus</i> /SiMoAV	BR:Boq32:14A	<i>Sida</i> spp.	Boqueirão – PB	Maio, 2014
33PB	-7°29'8'' S	-36°9'45'' W	<i>Sida mottle Alagoas virus</i> /SiMoAV	BR:Boq33:14A	<i>Sida</i> spp.	Boqueirão – PB	Maio, 2014
38PB	-7°29'8'' S	-36°9'45'' W	<i>Sida mottle Alagoas virus</i> /SiMoAV	BR:Boq38:14A	<i>Sida</i> spp.	Boqueirão – PB	Maio, 2014
39PB	-7°29'8'' S	-36°9'45'' W	<i>Sida mottle Alagoas virus</i> /SiMoAV	BR:Boq39:14A	<i>Sida</i> spp.	Boqueirão – PB	Maio, 2014

Tabela 2. Sequências de begomovírus acessadas no banco de dados não-redundante Genbank.

Espécie/Acrônimo/Isolado	Nº de acesso no Genbank	Hospedeiro	Local	Data
<i>Tomato mottle leaf curl virus</i> ToMoLCV / BR:Jai56:08	KC706616	<i>Solanum lycopersicum</i>	Jaíba – MG	2008
<i>Tomato mottle leaf curl virus</i> ToMoLCV / BR:Jai13:08	KC706615	<i>Solanum lycopersicum</i>	Jaíba – MG	2008
<i>Tomato mottle leaf curl virus</i> ToMoLCV / PE[BR:Juaz2586:04]	JF803250	<i>Solanum lycopersicum</i>	Juazeiro – BA	2004
<i>Tomato mottle leaf curl virus</i> ToMoLCV / PE[BR:Bez2665:04]	JF803251	<i>Solanum lycopersicum</i>	Bezerras - PE	2004
<i>Tomato mottle leaf curl virus</i> ToMoLCV / DF[BR:Turv2904:04]	JF803249	<i>Solanum lycopersicum</i>	Turvânia – DF	2004
<i>Tomato mottle leaf curl virus</i> ToMoLCV / DF[BR:Turv2911:04]	JF803248	<i>Solanum lycopersicum</i>	Turvânia – DF	2004
<i>Tomato mottle leaf curl virus</i> ToMoLCV / DF[BR:PA2143:04]	JF803247	<i>Solanum lycopersicum</i>	Ponte Alta – DF	2004
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i> ToClMoV/ BR:Flo210:08	KC706560	<i>Solanum lycopersicum</i>	Florestal -MG	2008
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i> ToClMoV/ [Brazil] isolate BA-Se1	AF490004	<i>Solanum lycopersicum</i>	Seabra - BA	1996
<i>Tomato mottle leaf curl virus</i> ToMoLCV / DF[BR:PADFM:04]	JF803246	<i>Solanum lycopersicum</i>	Ponte Alta – DF	2004
<i>Sida mottle Alagoas virus</i> SiMoAV / BR:Mar1:10	JX871386	<i>Sida</i> sp.	Maragogi - AL	2010
<i>Sida mottle Alagoas virus</i> SiMoAV / BR:Mar2:10	JX871387	<i>Sida</i> sp.	Maragogi - AL	2010
<i>Sida mottle Alagoas virus</i> SiMoAV / BR:Mar3:10	JX871388	<i>Sida</i> sp.	Maragogi - AL	2010
<i>Sida mottle Alagoas virus</i> SiMoAV / BR:Vsa1:10	JX871384	<i>Sida urens</i>	Viçosa - AL	2010
<i>Sida mottle Alagoas virus</i> SiMoAV / BR:Vsa2:10	JX871385	<i>Sida urens</i>	Viçosa - AL	2010
<i>Sida yellow blotch virus</i> SiYBIV/ BR:Chp1:10	JX871382	<i>Sida urens</i>	Chã-preta - AL	2010
<i>Sida yellow net virus</i> SiYNV/ BR:Vic2:10	JX871376	<i>Sida micrantha</i>	Viçosa - MG	2010

Tabela 3. Variabilidade genética dos begomovírus ToMoLCV e SiMoAIV infectando hospedeiros cultivados e não-cultivados.

População	No. de seqüências	DNA-A π^* (SD)†	CP π (SD)	Rep π (SD)
ToMoLCV (total)	25	0.0482 (± 0.0056)	0.0234 (± 0.0039)	0.0661 (± 0.0062)
ToMoLCV (Paraíba)	17	0.0219 (± 0.0054)	0.0041 (± 0.0005)	0.0385 (± 0.0101)
SiMoAIV (total)	18	0.0519 (± 0.0055)	0.0471 (± 0.0059)	0.0479 (± 0.0037)
SiMoAIV (Paraíba)	13	0.0288 (± 0.0031)	0.0221 (± 0.0024)	0.0334 (± 0.0038)

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

† Desvio padrão.

Tabela 4. Eventos de recombinação detectados entre os ToMoLCV coletados para esse trabalho e os ToMoLCV acessados do Genbank.

Eventos	Breakpoints		Recombinantes	Parentais		Programas ^a	P-Value
	Começo	Fim		Menor	Maior		
1	96	1726	108PBA1 117PBA1 46PBA2	137PBA1	JF803251_ToMoLCV	RGBMCS3	4.97E-32
2	2036	2600	KC706615_ToMoLCV KC706616_ToMoLCV JF803250_ToMoLCV	JF803251_ToMoLCV	Unknown	RGBMCS3	9.77E-21

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

Tabela 5. Sítios selecionados positiva e negativamente nas ORFs CP e Rep das subpopulações específicas de ToMoLCV e SiMoAIV.

População	No de haplótipos	Métodos	
		dN/dS†	PARRIS
ToMoLCV CP§	6	0,2746	NS*
ToMoLCV Rep§	13	0,2872	NS
SiMoAIV CP	10	0,1271	NS
SiMoAIV ReP	8	0,1939	NS

§ Subpopulação sem sequências detectadas como recombinantes.

† Valor calculado usando o método SLAC.

* NS= não significativo ($P > 0.1$).

Figura 2. Matriz bidimensional representando porcentagem de identidade de comparações pareadas de seqüências nucleotídicas do DNA-A coletadas nos estados da PB com amostras de begomovírus disponíveis no GenBank.

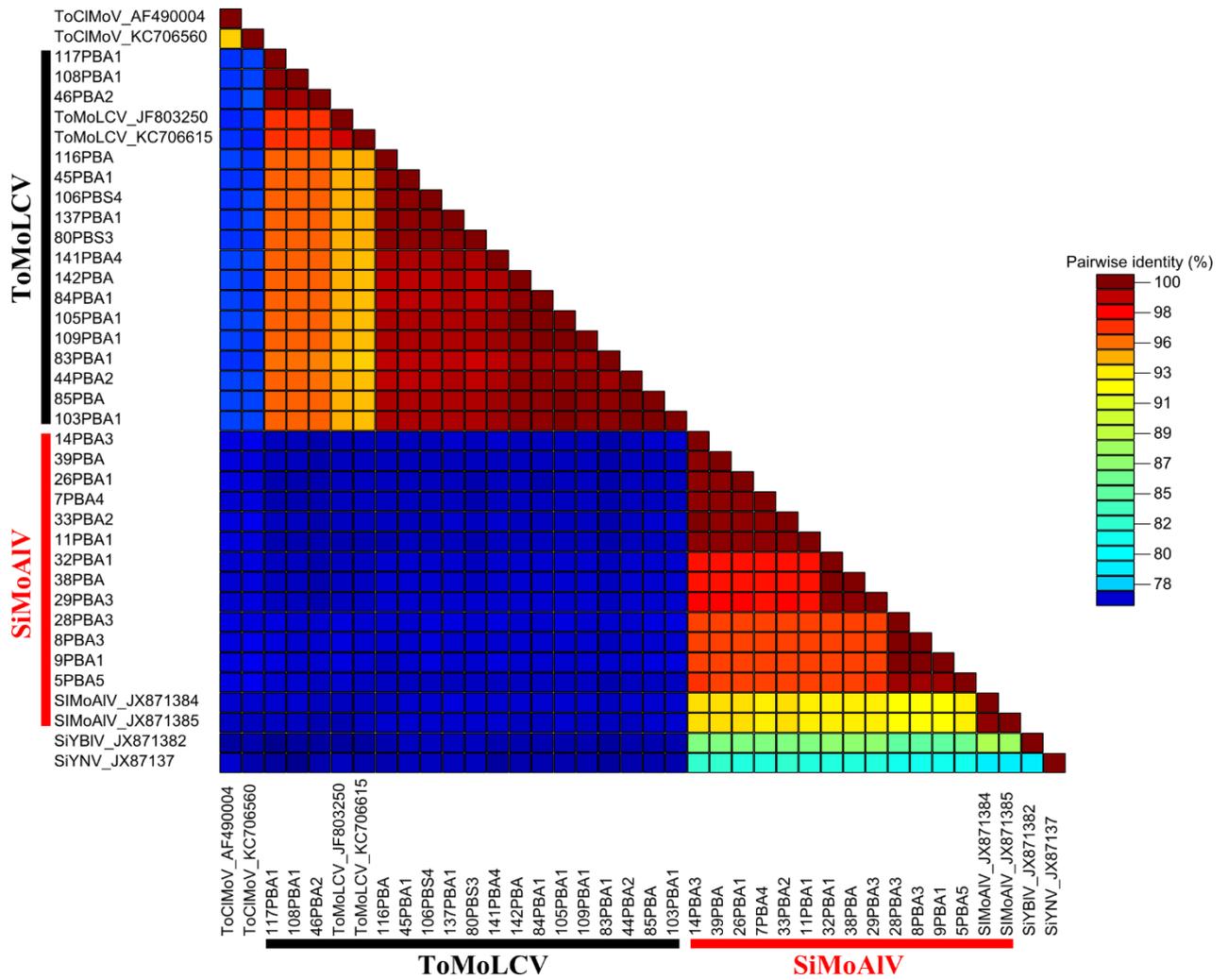


Figura 3. Análise filogenética de inferência Bayesiana baseada no DNA-A do ToMoLCV, mostrando a formação de dois grupos distintos. Grupo 1 = isolados obtidos em MG, PE, BA e PB; Grupo 2 = isolados obtidos no DF e PE.

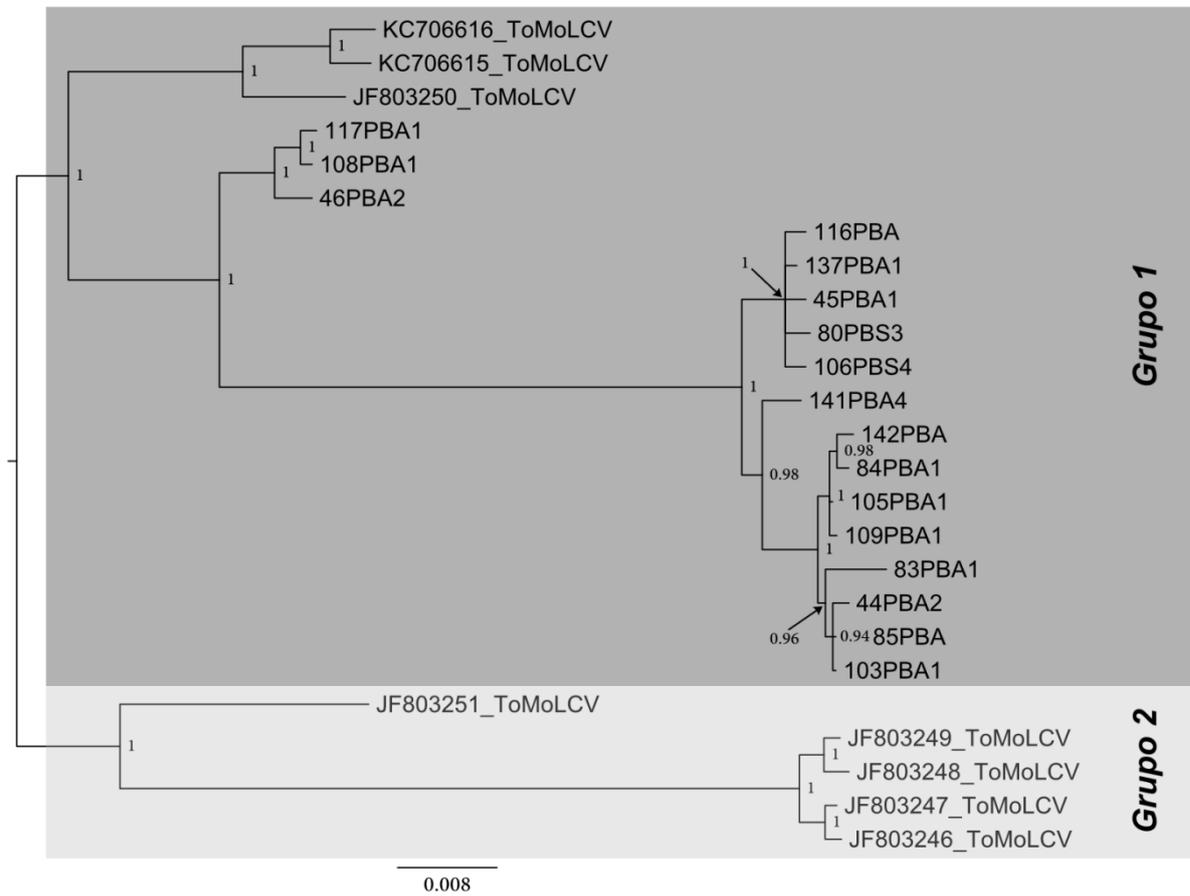


Figura 4. Análise filogenética de inferência Bayesiana baseada na ORF CP do ToMoLCV, mostrando a formação de dois grupos distintos. Grupo 1 = isolados obtidos em MG, BA e PB; Grupo 2 = isolados obtidos no DF e PE.

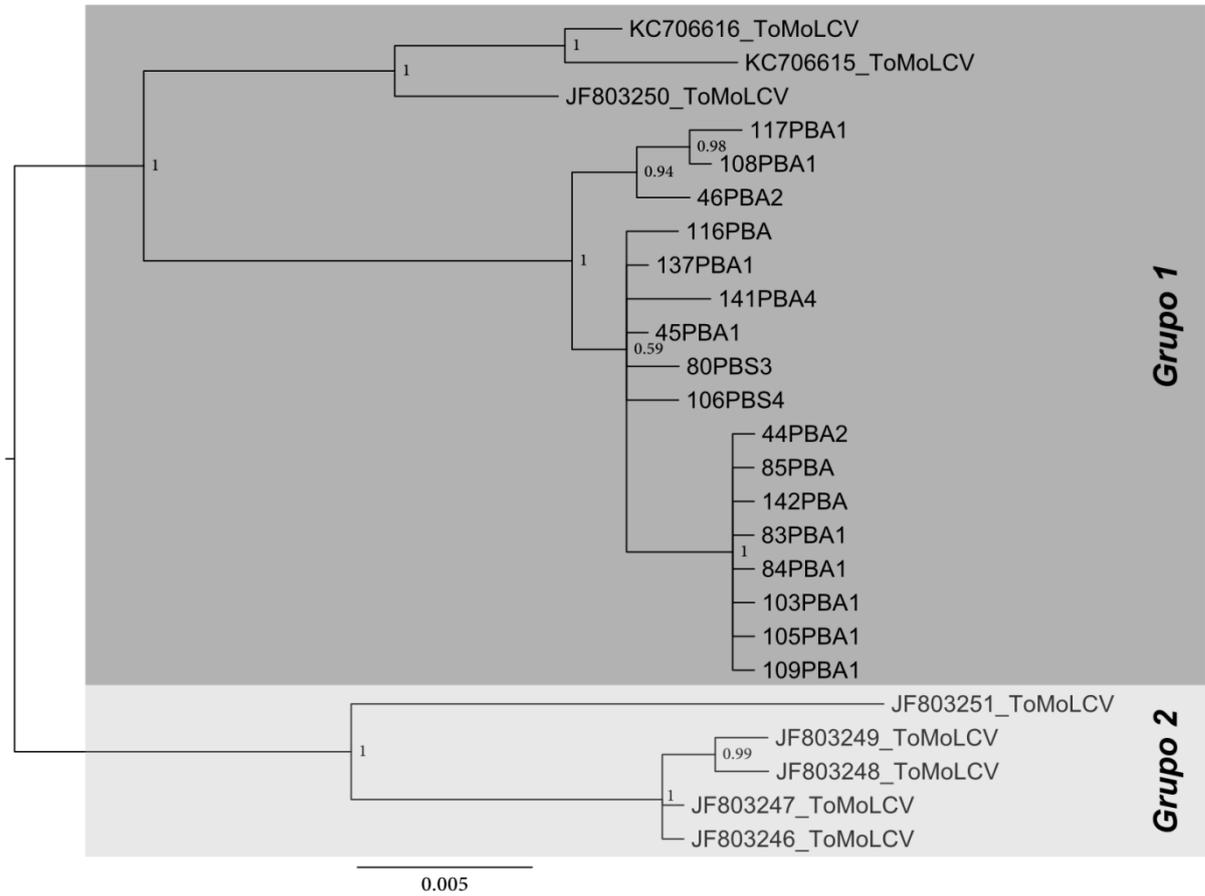


Figura 5. Análise filogenética de inferência Bayesiana baseada na ORF Rep do ToMoLCV, mostrando a formação de dois grupos distintos. Grupo 1 = isolados obtidos na PB; Grupo 2 = isolados obtidos na PB, MG, DF, PE e BA.

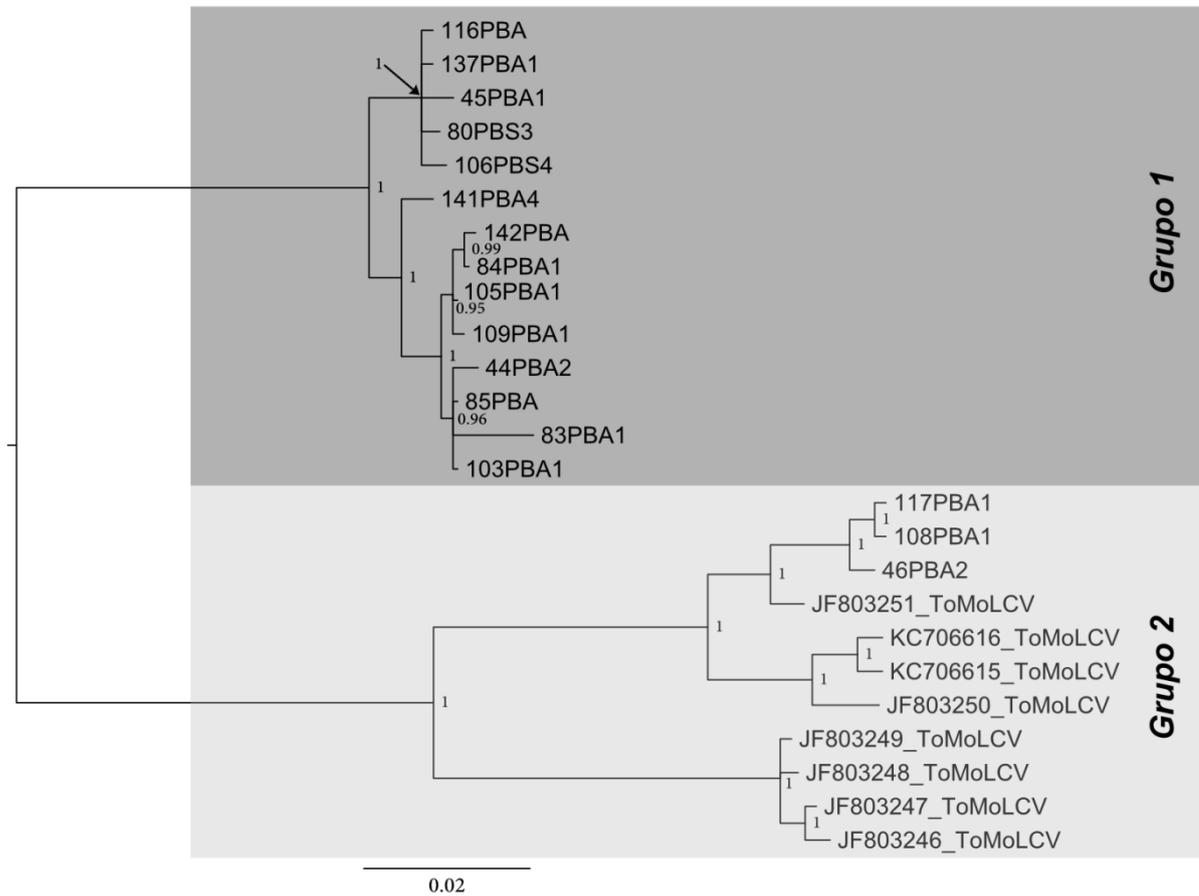


Figura 6. Análise filogenética de inferência Bayesiana baseada no DNA-A do SiMoAIV, mostrando a formação de dois grupos distintos de acordo com a origem geográfica. Grupo 1 = isolados obtidos na PB; Grupo 2 = isolados obtidos em AL.

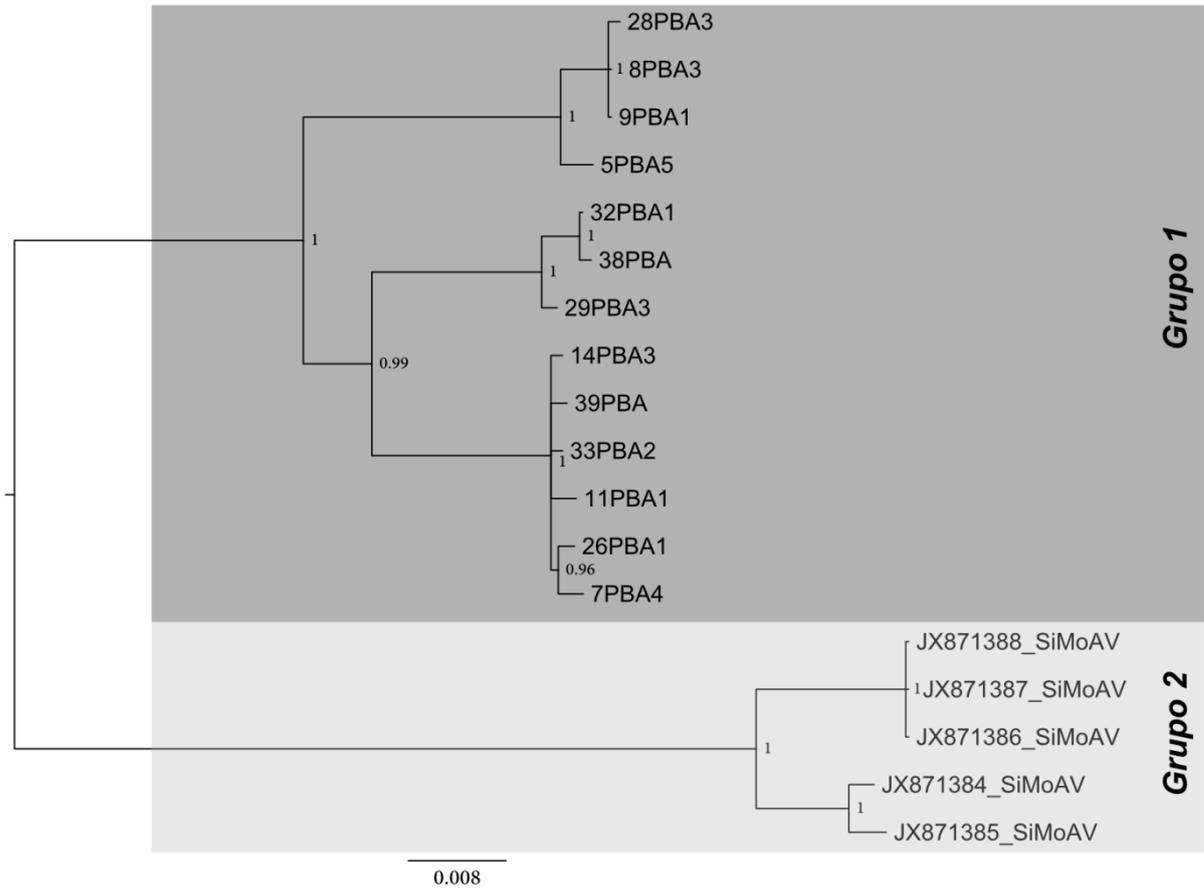


Figura 7. Análise filogenética de inferência Bayesiana baseada na ORF CP do SiMoAIV, mostrando a formação de dois grupos distintos de acordo com a origem geográfica. Grupo 1 = isolados obtidos na PB; Grupo 2 = isolados obtidos em AL.

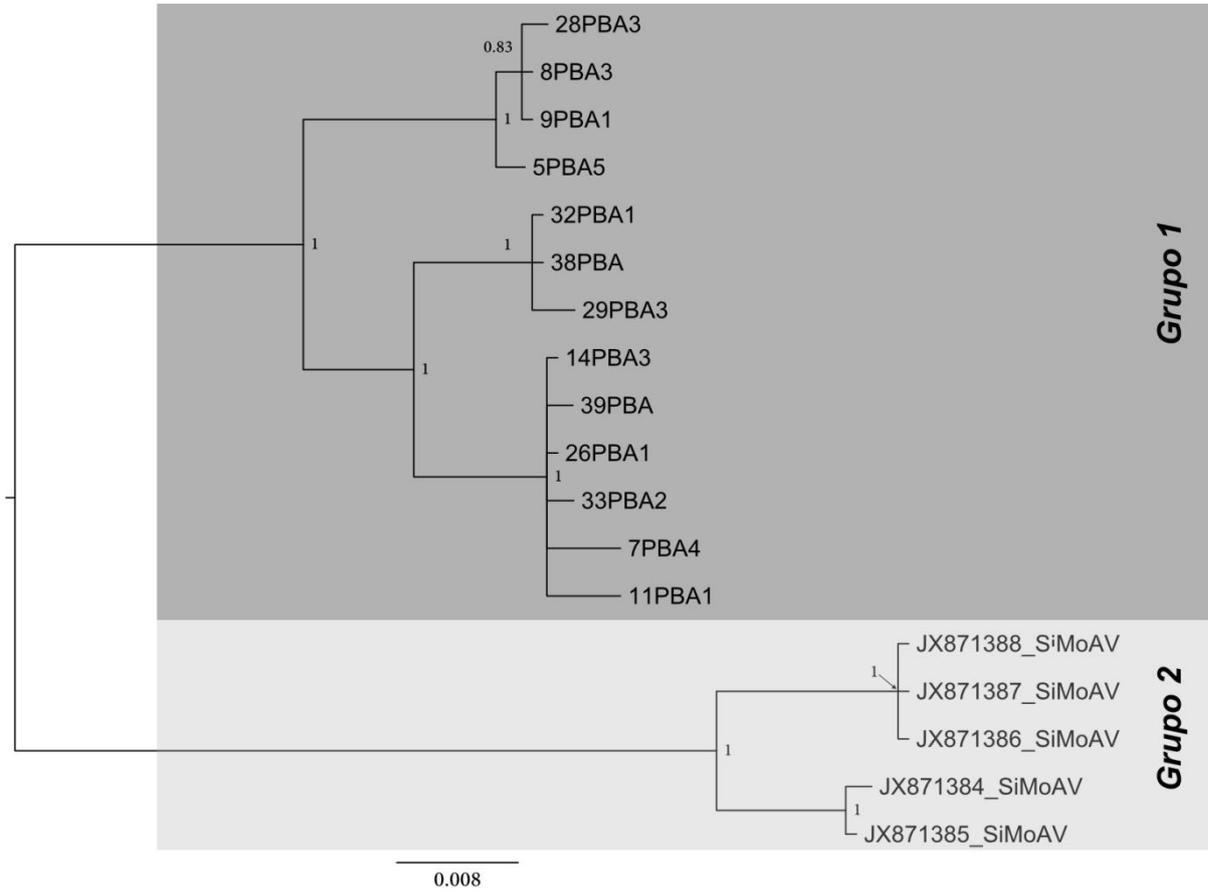


Figura 8. Análise filogenética de inferência Bayesiana baseada na ORF Rep do SiMoAIV, mostrando a formação de dois grupos distintos de acordo com a origem geográfica. Grupo 1 = isolados obtidos na PB; Grupo 2 = isolados obtidos em AL.

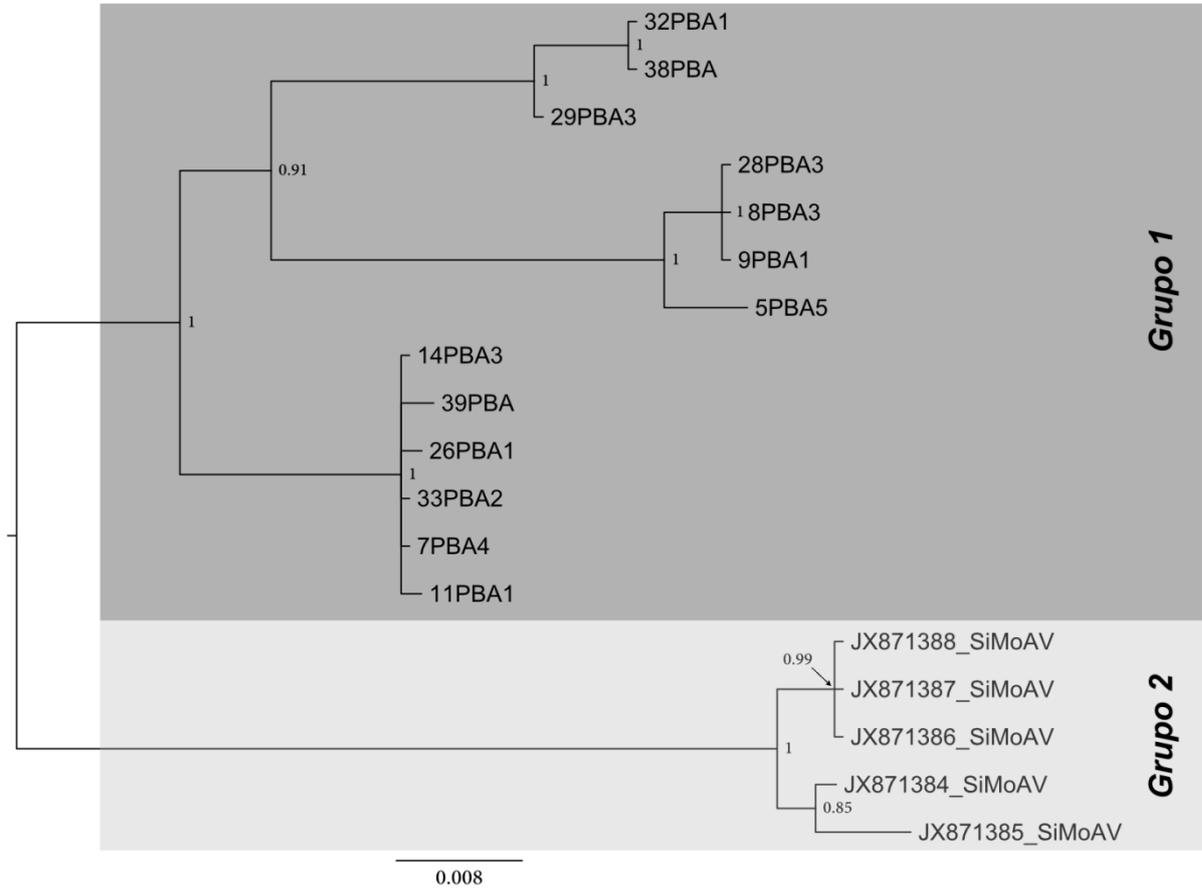


Figura 9 – Análise reticulada baseada no DNA-A do ToMoLCV. Isolados obtidos no estado da PB (em vermelho) e MG, PE e DF (em preto).

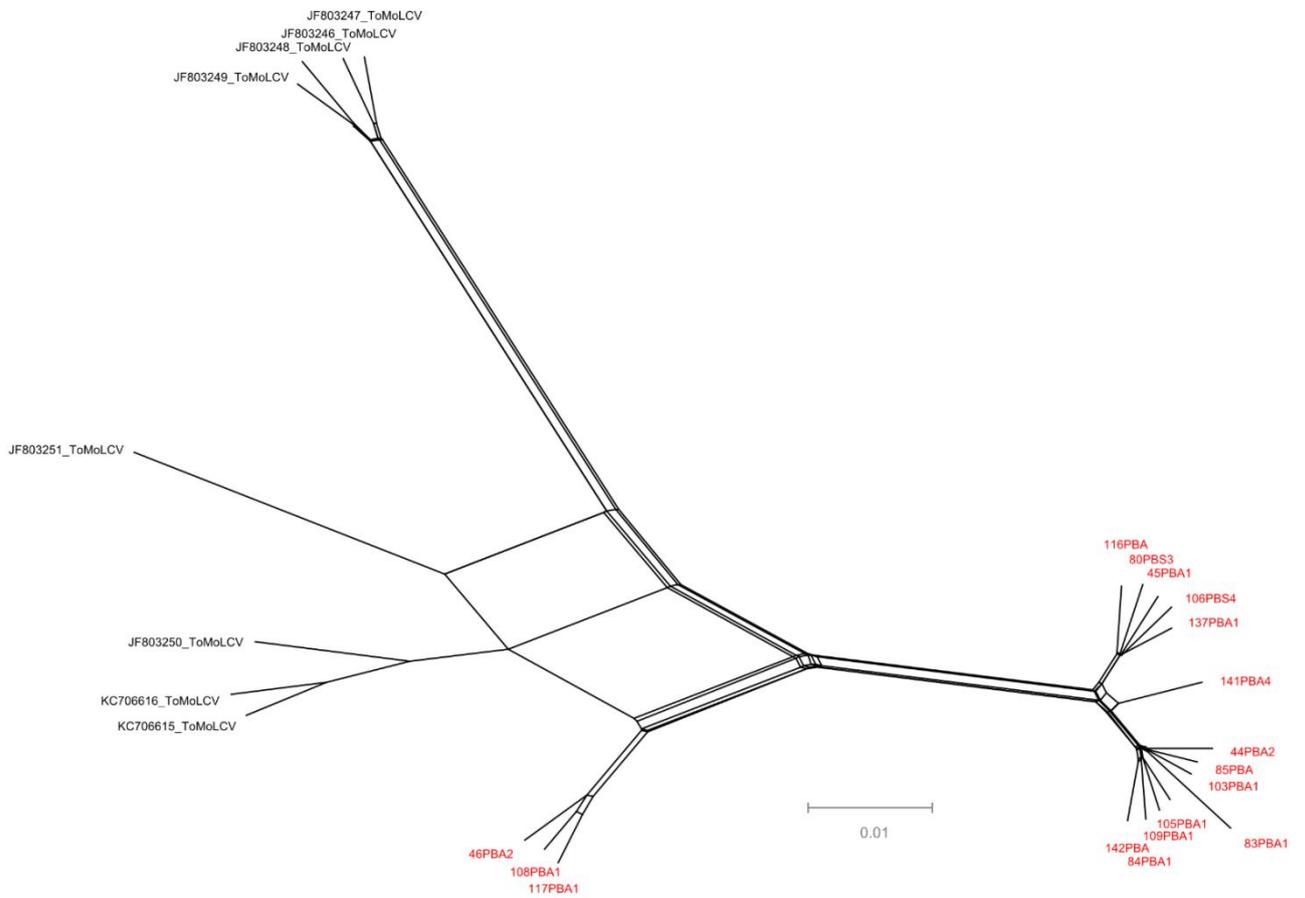


Figura 10 – Análise reticulada baseada na ORF CP do ToMoLCV. Isolados obtidos no estado da PB (em vermelho) e MG, PE e DF (em preto).

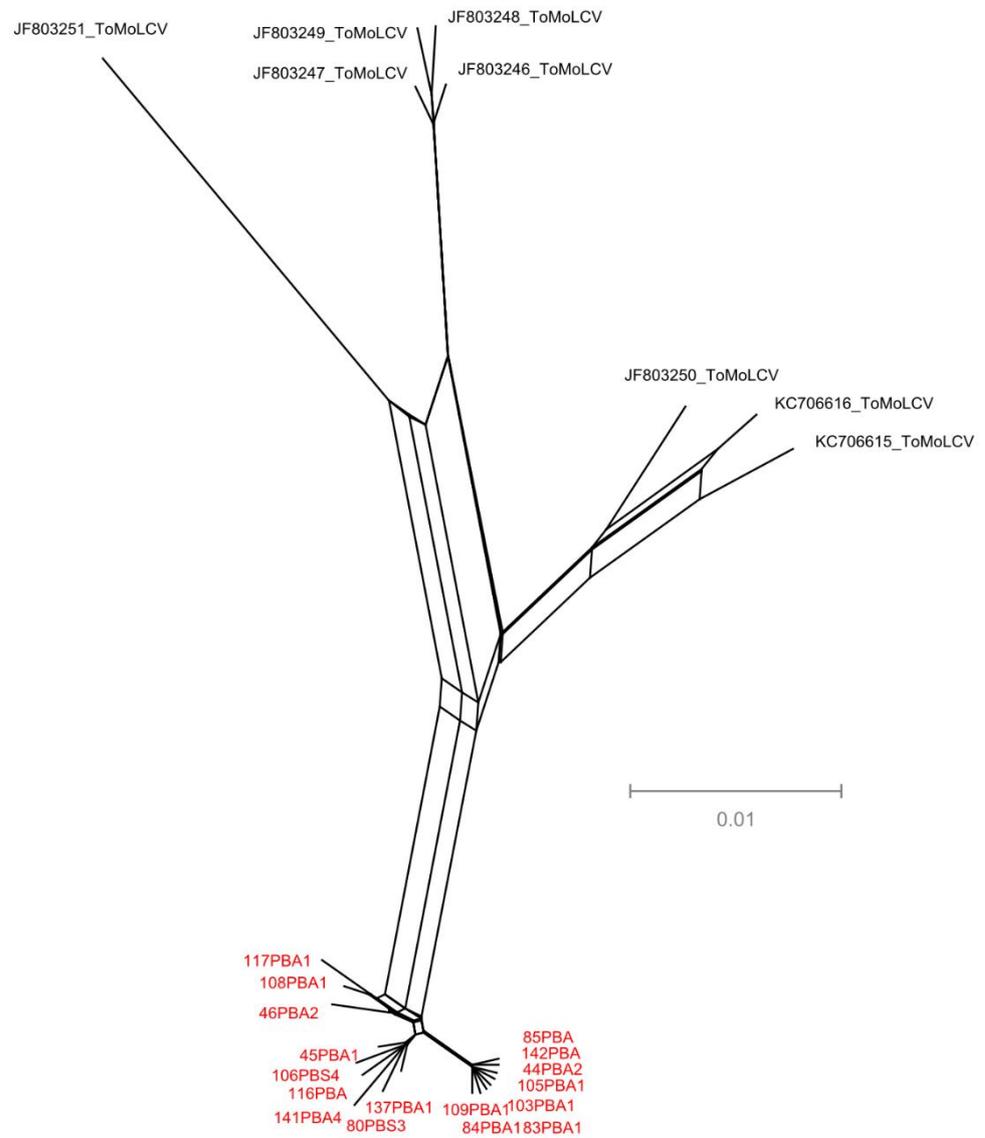


Figura 11 – Análise reticulada baseada na ORF Rep do ToMoLCV. Isolados obtidos no estado da PB (em vermelho) e MG, PE e DF (em preto).

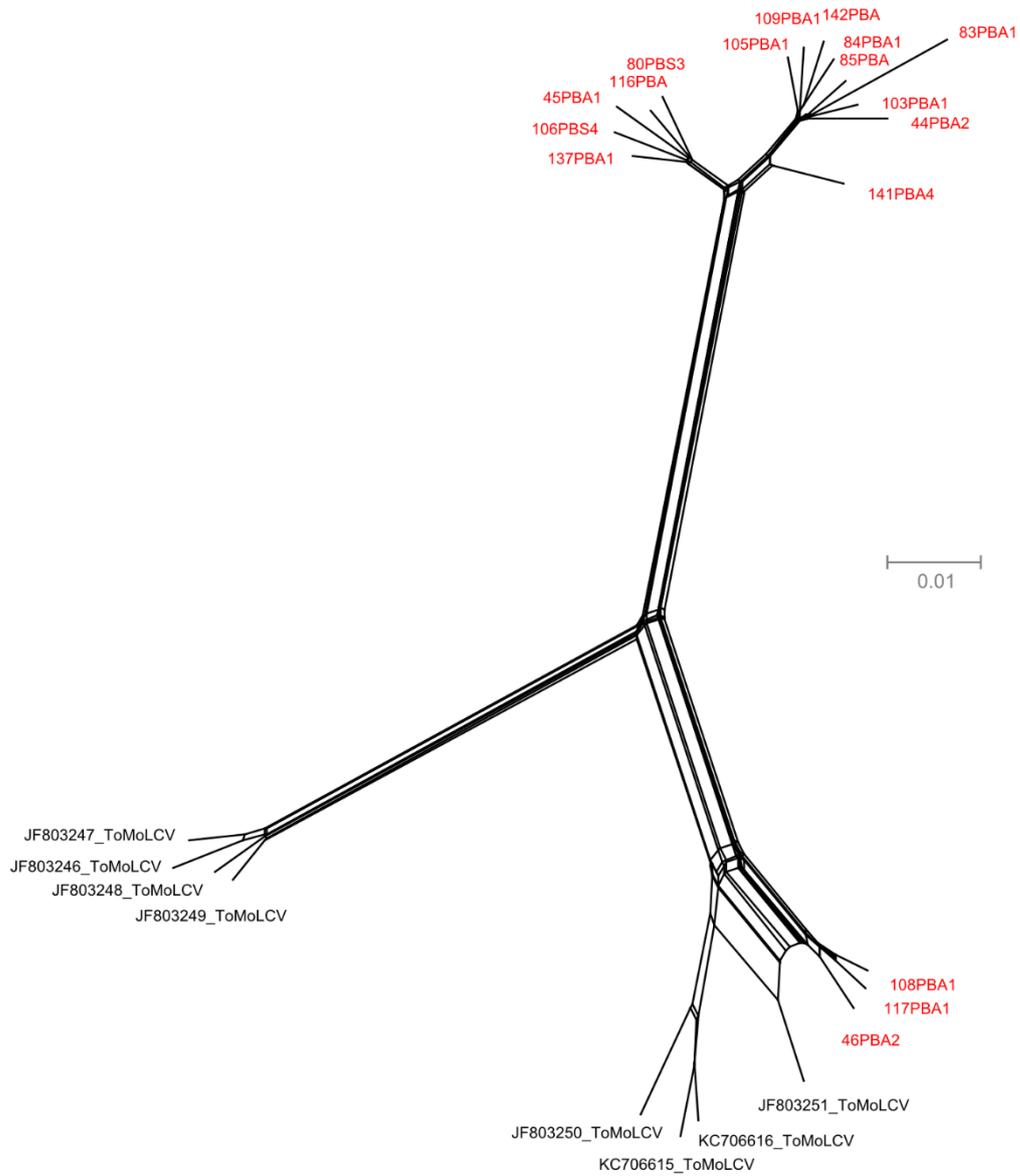


Figura 12 – Análise reticulada baseada no DNA-A do SiMoAlV. Isolados obtidos nos estados da PB (em vermelho) e AL (em preto).

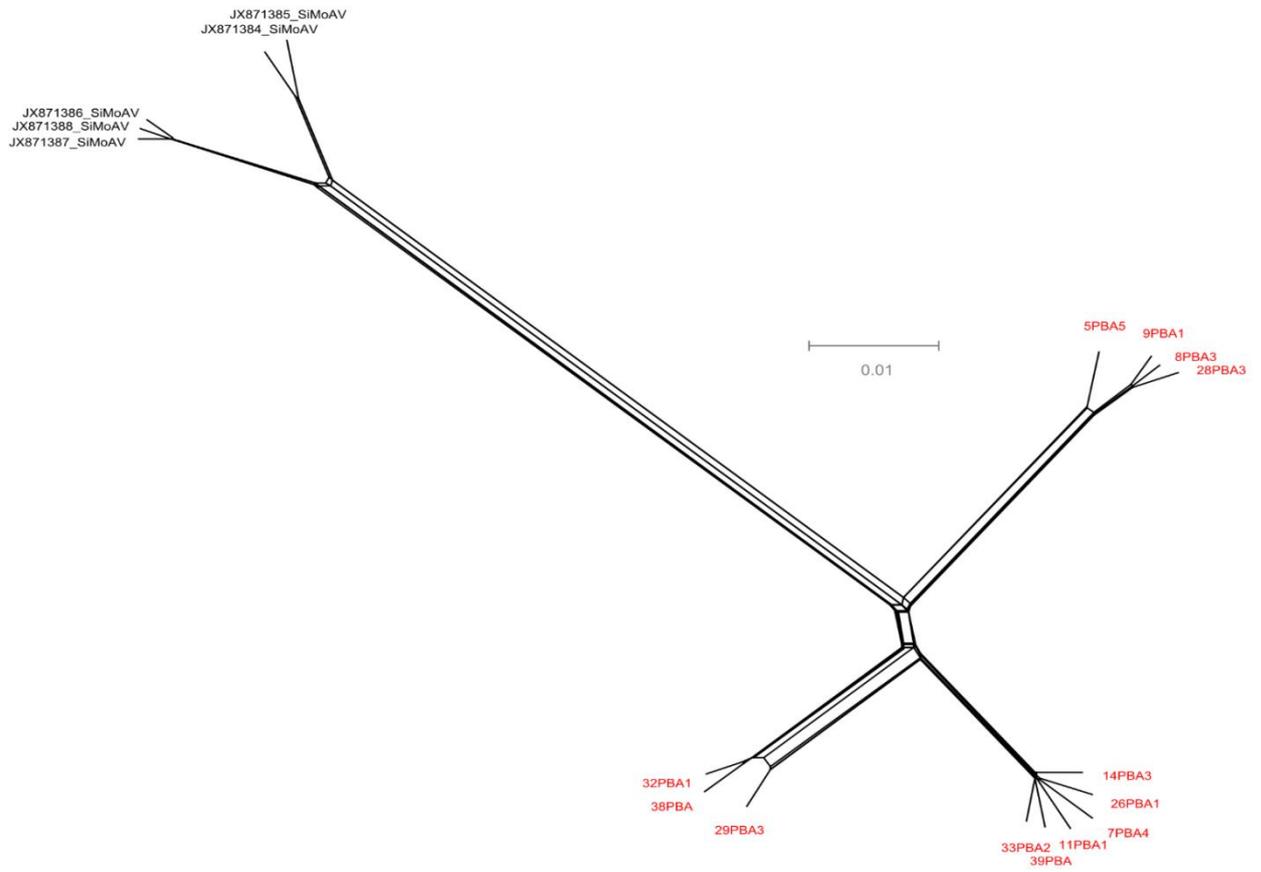


Figura 13 – Análise reticulada baseada na ORF CP do SiMoAlV. Isolados obtidos nos estados da PB (em vermelho) e AL (em preto).

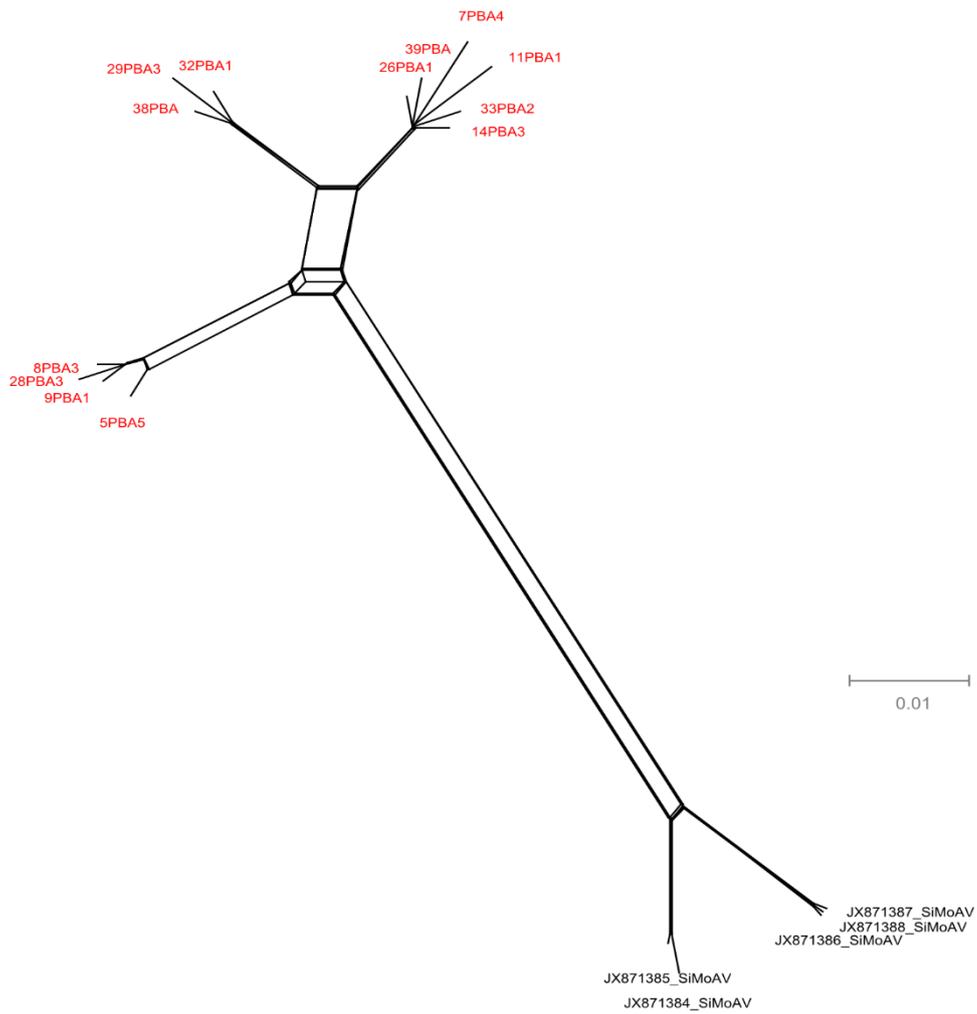
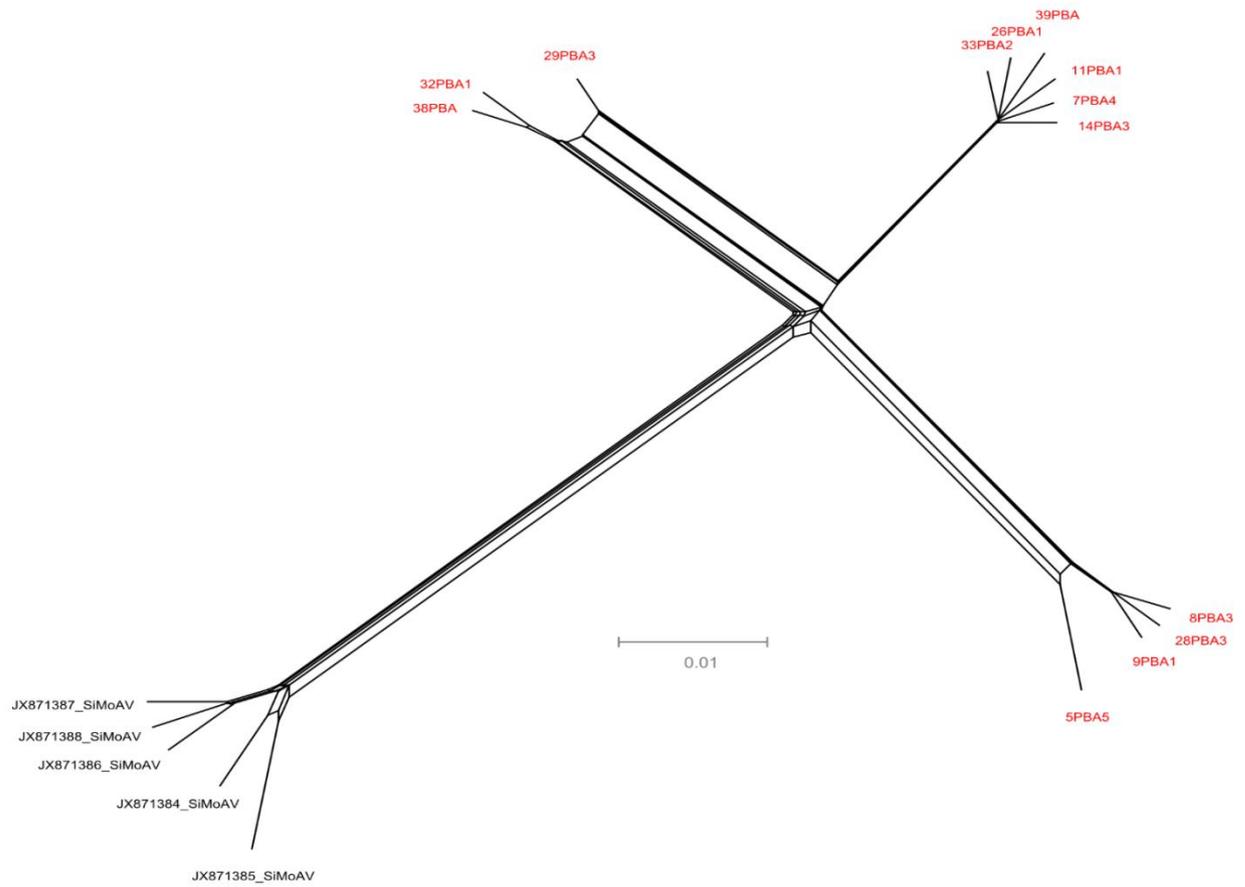


Figura 14 – Análise reticulada baseada na ORF Rep do SiMoAIV. Isolados obtidos nos estados da PB (em vermelho) e AL (em preto).



REFERÊNCIAS

- AHMAD et al. Characterization of Sunn hemp begomovirus and its geographical origin based on in silico structural and functional analysis of recombinant coat protein. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, 2600-2610, 2011.
- 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. Characterization of Tomato yellow vein streak virus, a begomovirus from Brazil. **Virus Genes**, v.40, p. 140 –147, 2010.
- ALBUQUERQUE, L.C. et al. Further characterization of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. **Archives of Virology**, v. 157, p. 747–752, 2012.
- ALBUQUERQUE, L. C. et al. Further evidence reveals that okra mottle virus arose from a double combination event. **Archives of Virology**, v. 158, p. 181-186, 2013.
- ALTSCHUL S.F., et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, 403-410, 1990.
- ALVES-JÚNIOR M., et al. Synergism and negative interference during co-infection of tomato and *Nicotiana benthamiana* with two bipartite begomoviruses. **Virology**, v. 387 257–266, 2009.
- AMBROZEVICIUS, L.P. et al. Genetic diversity of begomovirus infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 372-377, 2002.
- ANDRADE, E.C. et al. *Tomato yellow spot virus*, a tomato-infecting begomovirus from Brazil with a closer relationship to viruses from *Sida* sp., forms pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from *Sida*. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 3687-3696, 2006.
- ARANHA S. A. et al. Detection and complete genome characterization of a begomovirus infecting okra (*Abelmoschus esculentus*) in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, p.14-20, 2011.

ARGUELLO-ASTORGA, G. et al. High-frequency reversion of geminivirus replication protein mutants during infection. **Journal of Virology**, v. 81, p. 11005-11015, 2007.

BARRETO, S.S. et al. A Study of Weeds as Potential Inoculum Sources for a Tomato-Infesting Begomovirus in Central Brazil. **Phytopathology**, v. 103, n ° 5, 2013.

BEDFORD, I.D. et al. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographical regions. **Annals of Applied Biology**, v. 125, p. 311-325, 1994.

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

BRIDDON, R.W. et al. Recommendations for the classification and nomenclature of the DNA- β satellites of begomoviruses. **Archives of Virology**, v. 153, p. 763-781, 2008.

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

BRIDDON R. W. Cotton leaf curl disease, a multicomponent begomovirus complex **Molecular Plant Pathology**, v. 4, p. 427-434, 2003.

BROWN, J.K. et al. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence Comparisons. **Archives of Virology**, v. 160, p. 1593-1619, 2015.

BROWN, J.K. New species and revised taxonomy proposal for the genus Begomovirus (Geminiviridae): phylogenetic and pairwise distance analysis using the same approach as implemented for the genera Mastrevirus and Curtovirus in the same family, 2013. Disponível em:
<http://talk.ictvonline.org/files/ictv_official_taxonomy_updates_since_the_8th_report/m/plant-official/4838.aspx>. Acesso em Abril de 2015.

BROWN, J.K., et al. Family Geminiviridae. In: King A.M.Q, Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. (eds) Virus Taxonomy 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Elsevier Academic Press**, p. 351-373, 2012.

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

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

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

CASTILLO AG, et al. Interaction between a geminivirus replication protein and the plant simulation system. **Journal of Virology**, v. 78, p. 2758–2769, 2004.

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

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

CASTILLO-URQUIZA G.P. et al. 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, México.

CHAKRABORTY, S. et al. Supervirulent pseudorecombination and asymmetric synergism between genomic components of two distinct species of begomovirus associated with severe tomato leaf curl disease in India. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 818–828, 2008.

COLARICCIO, A. O impacto das viroses na cultura do tomateiro. Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia – CPDSV – Instituto Biológico. **Seminário de Atualização Cadeia Produtiva do Tomate**. Mogi-Guaçu, São Paulo. 2004. Disponível em: <http://www.feagri.unicamp.br/tomates/pdfs/impacviros.pdf>. Acesso em Abril de 2015.

COSTA, A.S. Increase in the populational density of *Bemisia tabaci*, a threat of widespread virus infection of legumes crops in Brazil. In Bird J.; Maramorosch K. (eds) **Tropical diseases of legumes**. Academic Press, p. 27-49, 1975.

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

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

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

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

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

EINI, O et al. Interaction with a host ubiquitin-conjugating enzyme is required for the pathogenicity of a geminiviral DNA beta satellite. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 22, p. 737-746, 2009.

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

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

FAO-FAOSTAT - **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso: 8 de Maio de 2015.

FARGETTE, D. et al. Molecular ecology and emergence of tropical plant viruses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 235-260, 2006.

FARIA, J. C. E ZERBINI, F. M. Família *Geminiviridae*: Taxonomia, replicação e movimento. In: (Luz, W. C; Fernandes, J. M; Prestes, A. M; e Picinini, E. C.) **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 8, p. 27-57, 2000.

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

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

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

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

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

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

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

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

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 2.ed: Viçosa: UFV, 412p, 2003.

FLORES, E.; SILBERSCHMIDT, K.; KRAMER, M. Observações de “clorose infecciosa” das malváceas em tomateiros do campo. **O Biológico**, v. 26, p. 65-69, 1960.

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.

FONTES, E.P.B. et al. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 8459-8465, 1994a.

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

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

FRANÇA, F.H.; VILLAS BÔAS, G.L.; CASTELO-BRANCO, M. Ocorrência de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera:Aleyrodidae) no Distrito Federal. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.25, p.369-372, 1996.

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

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

GARCÍA-ARENAL, F.; FRAILE, A.; MALPICA, J.M. Variation and evolution of plant virus populations. **International Microbiology**, 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**, 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.

GE, L. et al. Genetic Structure and Population Variability of Tomato Yellow Leaf Curl China Virus. **Journal of Virology**, v. 81, p. 5902-5907, 2007.

GILBERTSON, R.L. et al. Genetic diversity in geminiviruses causing bean golden mosaic disease: the nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of a Brazilian isolate of bean golden mosaic geminivirus. **Phytopathology**, 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**, v. 23, p. 815-818, 2005.

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

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

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

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

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

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

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

HEHNLE, S., WEGE, C.; JESKE, H. Interaction of DNA with the movement proteins of geminiviruses revisited. **Journal of Virol**, v. 78, p. 7698-706, 2004.

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

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

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**, v. 78, p. 1785-1790, 1997b.

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.

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

IBGE, 2014. Levantamento Sistemático da Produção. Disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Fasciculo/lspa_201504.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/lspa_201504.pdf). Acessado em 6 de Maio de 2015.

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

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

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

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

INOUE-NAGATA, A.K.; ÁVILA, A.C.; VILLAS BÔAS, G.L. Os geminivírus em sistema de produção integrada de tomate indústria. **Circular Técnica da Embrapa Hortaliças**. Brasília-DF, p.1, 2009.

ISNARD, M. et al. Quasi species nature of three maize streak virus isolates obtained through different modes of selection from a population used to assess response to infection of maize cultivars. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 3091-3099, 1998.

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

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

KIRTHI, N. et al. Evidence for recombination among the tomato leaf curl virus strains/species from Bangalore, India. **Archives of Virology**, v. 147, p. 255–272, 2002.

KOSAKOVSKY POND, S. L.; FROST, S. D. W. Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. **Bioinformatics**, v. 21 n. 10, p. 2531–2533, 2005.

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

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

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

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

LIMA A.T.M., et al. *Malvaviscus* yellow mosaic virus, a weed-infecting begomovirus carrying a nanovirus-like nonanucleotide and a modified stem-loop structure. **Phytopathology**, v. 101, p. 104, (Abstract), 2011.

LIMA, A.T.M. et al. Primeiro relato de infecção pelo geminivírus *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) em tomateiro no estado de Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31(Suplemento), p. 224, 2006.

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

LOPES, C.A.; ÁVILA, A.C. **Doenças do tomateiro: Diagnóstico e Controle**. Brasília: Embrapa Hortaliças, p.96. 2005.

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

LOZANO-DURÁN, R.; BEJARANO, E.R. Geminivirus C2 protein might be the key player for geminiviral co-option of SCF-mediated ubiquitination. **Plant Signaling and Behavior**, v. 6, p. 999–1001, 2011.

MAKINO, S. et al. High frequency RNA recombination of murine coronaviruses. **Journal of Virology**, 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.; RYBICKI, E. RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. **Bioinformatics**.v. 16, p. 562-563, 2000.

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

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

MATYIS, J.C.; et al. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v. 1, p. 267-275, 1975.

MELGAREJO, T. A. et al. Characterization of a New World Monopartite Begomovirus Causing Leaf Curl Disease of Tomato in Ecuador and Peru Reveals a New Direction in Geminivirus Evolution. **Journal of Virology, American Society for Microbiology**, v. 87, p. 5397-5413, 2013.

MILLER, M. A. et al. The CIPRES Portals. **Cipres**. 2010. Website http://www.phylo.org/sub_sections/portal [acesso em 06 Julho de 2015].

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

MORALES, F.J. History and current distribution of begomoviruses in Latin America. **Advances in Virus Research**, v. 67, p. 127-162, 2006.

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

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.

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

NAIKA, S. et al. **A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização.** Agromisa e CTA, Wageningen, p.10-11, 2006.

NASH, T. E. et al. Functional analysis of a novel motif conserved across geminivirus Rep proteins. **Journal of Virology**, v. 85, p. 1182–1192, 2011.

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

NELSON, R.S.; VAN BEL, A.J.E. The mystery of virus trafficking into, through and out of vascular tissue. **Progress in Botany**. v. 59, p. 477–533, 1997.

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.

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

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

PERALTA, E.R.; KNAPP, S.; SPOONER, D.M. New species of wild tomatoes (*Solanum* Section: *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. **Systematic Botany**, v. 30, p. 424-434, 2005.

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

PILARTZ, M.; JESKE, H. Mapping of Abutilon mosaic geminivirus minichromosomes. **Journal of Virology**, v.77, p.10808-10818, 2003.

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

POSADA, D.; BUCKLEY, T. Model Selection and Model Averaging in Phylogenetics: Advantages of Akaike Information Criterion and Bayesian Approaches Over Likelihood Ratio Tests. **Systematic Biology**, v. 53, p. 793–808, 2004.

PREISS, W.; JESKE, H. Multitasking in Replication Is Common among Geminiviruses. **The Journal of Virology**, v. 77, p. 2972-80, 2003.

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

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

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

REZENDE, E.A. et al. Tomato infected with geminivirus in greenhouse conditions at Uberlândia-MG, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.21, p.424, 1996.

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

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

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

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

ROCHA, C. S. et al. Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly evolving, and segregated based on geographical location. **Journal of Virology**, v. 87, p. 5784–5799, 2013.

RODRÍGUEZ-NEGRETE, E. et al. Geminivirus Rep protein interferes with the plant DNA methylation machinery and suppresses transcriptional gene silencing. **New Phytologist**, v. 199, p. 464–475, 2013.

ROJAS, M.R. et al. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 361–394, 2005.

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

RONQUIST, F. et al. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice across a Large Model Space. **Systematic Biology Advance Access**, v. 61, p. 539-42, 2012.

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

ROOSSINCK, M.J.; SLEAT, D.; PALUKAITIS, P. Satellite RNAs of plant viruses: structures and biological effects. **Microbiological Reviews**, v. 56, p. 265–79, 1992.

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

SAMBROOK J.; RUSSEL D. **Molecular Cloning -A Laboratory Manual** (3^a ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.

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

SÁNCHEZ-DURÁN M.A., et al. Interaction between geminivirus replication protein and the SUMO conjugating enzyme is required for viral infection. **Journal of Virology**, v. 85, p. 9789–9800, 2011.

SCHEFFLER K, et al. Robust inference of positive selection from recombining coding sequences. **Bioinformatics**, v. 22, p. 2493–2499, 2006.

SERFRAZ, S. et al. S. Recombination Among Begomoviruses on Malvaceous Plants Leads to the Evolution of Okra Enation Leaf Curl Virus in Pakistan. **Journal Phytopathology**, 2015, (in print).

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

SILVA, F. N. et al. Recombination and pseudorecombination driving the evolution of the begomoviruses Tomato severe rugose virus (ToSRV) and Tomato rugose mosaic virus (ToRMV): two recombinant DNA-A components sharing the same DNA-B. **Virology Journal**, v. 11, p. 66, 2014.

SILVA, J.B.C.; GIORDANO, L.B. **Tomate para o processamento industrial**. Brasília: EMBRAPA-HORTALIÇAS, 2000, 168p.

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**, v. 201, p. 41-49, 2015.

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

STANLEY, J. et al. Family *Geminiviridae*. In *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. **Elsevier**, London, p. 301–326, 2005.

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

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

SUNTER, G.; 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.

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, p. 59-70, 2001.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TAVARES, S.S. et al. Further molecular characterization of weed-associated begomoviruses in Brazil with an emphasis on *Sida* spp. **Planta Daninha**, 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.

VAGHI MEDINA, C. G.; MARTIN, D. P.; LÓPEZ LAMBERTINI, P. M. Tomato mottle wrinkle virus, a recombinant begomovirus infecting tomato in Argentina. **Archives of Virology**, v. 160, p. 581–585, 2015.

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

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

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

ZERBINI, F.M. et al. A new bipartite geminivirus infecting tomatoes in Minas Gerais, Brazil. **Phytopathology**, v.86, p.51, 1996.

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

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

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

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.