



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL  
DE PERNAMBUCO**  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM FITOPATOLOGIA**

**Tese de Doutorado**

# **Novos begomovírus associados a plantas daninhas no Nordeste do Brasil**

**Liliane Dias Nascimento**

**Recife – PE  
2013**

**LILIANE DIAS NASCIMENTO**

**NOVOS BEGOMOVÍRUS ASSOCIADOS A PLANTAS DANINHAS NO NORDESTE  
DO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Fitopatologia.

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:**

Orientador(a): Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima

Co-Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dra. Iraildes Pereira Assunção

Co-Orientador(a): Dr<sup>a</sup>. Sarah Jacqueline Cavalcanti da Silva

**RECIFE-PE**

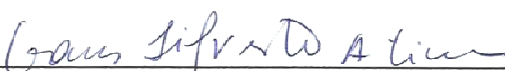
**FEVEREIRO DE 2013**

**NOVOS BEGOMOVÍRUS ASSOCIADOS A PLANTAS DANINHAS NO  
NORDESTE DO BRASIL**

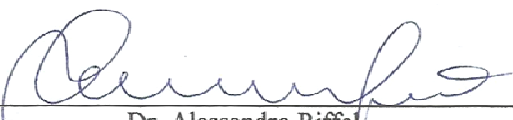
**LILIANE DIAS NASCIMENTO**

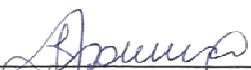
Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em 28 de fevereiro de 2013.

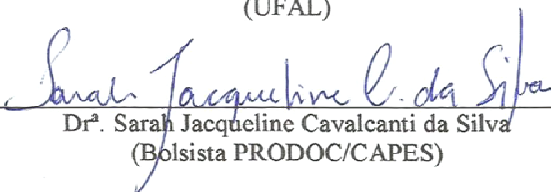
**ORIENTADOR:**

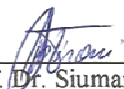
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima  
(UFAL)

**EXAMINADORES:**

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Alessandro Riffel  
(EMBRAPA dos Tabuleiros Costeiros - AL)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Iraíldes Pereira Assunção  
(UFAL)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Sarah Jacqueline Cavalcanti da Silva  
(Bolsista PRODOC/CAPES)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Siumar Pedro Tironi  
(UFAL)

**RECIFE-PE  
FEVEREIRO DE 2013**

## **DEDICO**

*Aos meus pais, Aguinaldo e Benedita (in memorian), aos meus irmãos, Meire e Darlan, pelo amor, carinho e incentivo durante todos os momentos. Ao meu noivo, Ezio Hilário, pelo amor, incentivo, apoio, paciência e por estar sempre presente em todos os momentos da minha vida.*

*Com carinho.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus por me dar força e sustentação durante as adversidades encontradas durante a realização deste trabalho;*

*À Universidade Federal Rural de Pernambuco pelo apoio institucional;*

*À Fundação de Amparo a Pesquisa de Alagoas (FAPEAL), pela concessão da bolsa de estudo;*

*Ao Professor Gaus Silvestre Andrade de Lima, pela orientação, paciência, amizade, confiança, ensinamentos passados durante todo esse período. Serei sempre grata;*

*À Professora Iraildes Pereira Assunção, pela amizade, apoio, por todos os ensinamentos a mim transmitidos. Serei sempre grata;*

*À Dra. Sarah Jacqueline Cavalcanti da Silva, pelo conhecimento transmitido, pela ajuda, amizade, paciência, dedicação. Serei sempre grata;*

*Aos meus colegas de Laboratório de Fitopatologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas, Edlene, Mayra, Jaqueline Figueiredo, Joyce, Jussara, Jackelinne, Karla, Hellóá, Lucas, Janaine, Nayana, Márcia, Arthur, Cecília e Aline.*

*A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco pelos ensinamentos transmitidos;*

*A todos os amigos da turma da Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco pela agradável convivência durante o curso;*

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

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

## SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	vii
GENERAL ABSTRACT.....	viii
CAPÍTULO I. Introdução Geral.....	01
1. Características dos geminivírus.....	02
2. Organização genômica e papel desempenhado pelas proteínas dos <i>Begomovirus</i> “Novo Mundo”.....	04
3. Replicação.....	07
4. Movimento do vírus na planta.....	09
5. Transmissão natural dos Geminivírus.....	10
6. Variabilidade e estrutura genética de populações de begomovírus.....	11
7. Diversidade de begomovírus infectando plantas cultivadas e daninhas no Brasil.....	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
CAPÍTULO II. Novos begomovírus associados a malváceas daninhas no Nordeste do Brasil.....	34
RESUMO.....	35
ABSTRACT.....	36
INTRODUÇÃO.....	37
MATERIAL E MÉTODOS.....	38
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
LITERATURA CITADA.....	46
APÊNDICE.....	51
CAPÍTULO III. Caracterização Molecular de begomovirus associados a <i>Hyptis</i> sp. e <i>Physalis</i> sp.....	59
RESUMO.....	60
ABSTRACT.....	61
INTRODUÇÃO.....	62
MATERIAL E MÉTODOS.....	63
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
LITERATURA CITADA.....	69
APÊNDICES.....	75
CONCLUSÕES GERAIS.....	81

## RESUMO GERAL

Os *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) são caracterizados por infectarem plantas dicotiledôneas, apresentarem partículas icosaédricas geminadas, com genoma composto por um ou dois componentes de DNA circular de fita simples (DNA-A e DNA-B). Além de plantas cultivadas, os begomovírus estão também associados a uma ampla gama de plantas daninhas. Esse estudo teve como objetivo caracterizar os begomovírus associados a plantas daninhas das famílias Malvaceae (*Herissantia crispera*, *Waltheria indica*, *Sidastrum paniculatum*, *Sida rhombifolia*, *Triumfetta semitriloba*), Solanaceae (*Physalis* sp.) e Lamiaceae (*Hyptis* sp.) no nordeste brasileiro para avaliar sua diversidade e importância como fontes de novos vírus para plantas cultivadas. As amostras de plantas daninhas com sintomas típicos de infecção por begomovírus foram coletadas nos estados de Alagoas, Pernambuco e Bahia durante os anos de 2010 a 2012. Foram obtidos um total de 28 componentes genômicos (18 DNA-A e 10 DNA-B). Análises das sequências indicaram a presença de oito espécies de begomovírus, sendo 6 novas espécies (HeYMV, TrYMV, PaYNV, PhYSV, HyRMV1 e HyRMV2). Nas análises filogenéticas entre os vírus obtidos das malváceas daninhas, indicam que todas as novas espécies se agruparam com begomovírus brasileiros. Evidências múltiplas de recombinação foram detectadas onde os begomovírus provenientes de *Sida* spp. e do tomateiro foram identificados como parentais. Nas daninhas *Hyptis* sp. e *Physalis* sp. análises das sequências indicaram a presença de três novas espécies de begomovírus, duas encontradas numa mesma amostra de *Hyptis* sp. (infecção mista) e a outra encontrada inicialmente em *Physalis* sp. e posteriormente detectada em *Hyptis* sp. Nas análises filogenéticas essas três novas espécies formaram um único ramo monofilético. As análises de recombinação indicaram uma forte evidência de recombinação entre HyRMV1 e HyRMV2, tendo o HyRMV1 como parental. O ToRMV foi identificado como possível parental para as espécies HyRMV1 e PhYSV. Portanto, esses resultados indicam que as plantas daninhas constituem importantes reservatórios de begomovírus e que eventos de recombinação tem aparentemente contribuído para o surgimento de novas espécies nessas hospedeiras.

**Palavras-chave:** geminivírus, recombinação, *Physalis* sp., *Hyptis* sp., malváceas daninhas

## GENERAL ABSTRACT

The Begomovirus (family *Geminiviridae*) are characterized by infecting dicotyledonous plants, present twinned icosahedral particles with genomes composed of one or two components of circular single-stranded DNA (DNA-A and DNA-B). In addition to cultivated plants, the begomoviruses are also associated with a wide range of weeds. This study aimed to characterize the begomoviruses associated with weed families Malvaceae (*Herissantia crispa*, *Waltheria indica*, *Sidastrum paniculatum*, *Sida rhombifolia* e *Triumfetta semitriloba*), Solanaceae (*Physalis* sp.) and Lamiaceae (*Hyptis* sp.) In northeastern Brazil to assess their diversity and importance as sources of new virus to cultivated plants. Samples of weeds with symptoms typical of begomovirus infection were collected in the states of Alagoas, Pernambuco and Bahia during the years 2010-2012. We obtained a total of 28 genomic components (18 DNA-A and 10 DNA-B). Analysis of the sequences indicated the presence of eight species of begomovirus, six new species (HeYMV, TrYMV, PaYNV, PhYSV, HyRMV1 and HyRMV2). In phylogenetic analyzes between viruses obtained malvaceous weeds. indicate that all new species clustered with Brazilian begomoviruses. Evidence of recombination were detected manifold where the begomoviruses from *Sida* spp. and tomato were identified as parents. In weed *Hyptis* sp. and *Physalis* sp. Sequence analyzes indicated the presence of three new species of begomoviruses, the two found in the same sample *Hyptis* sp. (Mixed infection) and another found initially *Physalis* sp. and subsequently detected in *Hyptis* sp. In phylogenetic analyzes of these three new species formed a single monophyletic branch. The analyzes showed strong evidence of recombination between HyRMV1 and HyRMV2, and the like parental HyRMV1. The ToRMV was identified as a possible parental species HyRMV1 and PhYSV. Therefore, these results indicate that the weeds are important reservoirs of begomoviruses and that recombination events have apparently contributed to the emergence of new species in some hosts.

**Palavras-chave:** geminivirus, recombination, *Physalis* sp., *Hyptis* sp., malvaceous weed



1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

# **CAPÍTULO I**

---

11

## **Introdução Geral**

12

13

14

15

16

17

18

## INTRODUÇÃO GERAL

19

20

### 21 1. Características dos geminivírus

22 Os geminivírus são vírus que infectam plantas e estão classificados na família  
23 *Geminiviridae*. Essa família, considerada a mais numerosa dentre os vírus de planta, está  
24 representada por quatro gêneros (*Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus*) de  
25 acordo com a gama de hospedeiros, o tipo de vetor, a organização do genoma e o  
26 relacionamento filogenético (FAUQUET; STANLEY, 2005; FAUQUET et al., 2008; VAN  
27 REGENMORTEL, 2000). Os membros dessa família são caracterizados por apresentarem  
28 DNA de fita simples encapsidados em partículas geminadas de morfologia icosaédrica  
29 (INOUE-NAGATA et al., 2006; STANLEY et al., 2005). A família *Geminiviridae* é  
30 constituída por um grande número de vírus de plantas que causam significativas perdas em  
31 importantes culturas em campos cultivados no mundo inteiro (ROJAS et al., 1993).

32 Estes vírus são encontrados basicamente no floema das plantas infectadas e,  
33 entretanto, alguns vírus podem atingir outros tipos de tecidos mais externos, como as células  
34 do mesófilo. Esta capacidade de colonizar o tecido epidérmico pode ser derivada de  
35 características genéticas adquiridas por algumas espécies, como por exemplo o *Tomato*  
36 *golden mosaic virus* (TGMV) e também o *Bean golden mosaic virus* (BGMV), quando  
37 associado ao TGMV (MORRA; PETTY, 2000). A partir do momento em que a infecção foi  
38 estabelecida no ponto de inoculação, esta se torna sistêmica, ou seja, atinge toda planta.

39 Os membros do gênero *Mastrevirus* (espécie-tipo *Maize streak vírus*) são transmitidos  
40 por cigarrinhas (Homoptera: Cicadellidae) de uma forma não-propagativa, persistente e  
41 circulativa e têm um genoma monopartido de 2,7 kb. Esses vírus foram encontrados apenas  
42 no velho mundo (Hemisfério Oriental, Europa, África, Ásia e Austrália) onde geralmente  
43 infectam monocotiledôneas, como milho e cana-de-açúcar, embora haja alguns membros que  
44 também infectam dicotiledôneas (STANLEY et al., 2005).

45 O gênero *Topocuvirus* (espécie-tipo *Tomato pseudo curly top vírus*) contém uma única  
46 espécie (monotípico), genoma monopartido de aproximadamente 3kb e são transmitidos pela  
47 *Micrutalis malleifera* (Homoptera: Auchenorrhyncha) a plantas dicotiledôneas. Os  
48 *Topocuvirus* foram encontrados apenas no novo mundo e parece resultar de uma  
49 recombinação entre *Mastrevirus* e *Begomovirus* (ROJAS et al., 2005).

50 O gênero *Curtovirus* (espécie-tipo *Beat curly top virus*) são geminivírus monopartidos  
51 e são transmitidos por cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae). Os membros do *Curtovirus* têm  
52 genoma de aproximadamente 3kb e infectam principalmente plantas dicotiledôneas  
53 (STANLEY et al., 2005).

54 Dentre os geminivírus o gênero *Begomovirus* (espécie tipo *Bean golden yellow mosaic*  
55 *virus* - BGYMV) é aquele que conta com o maior número de espécies e apresenta maior gama  
56 de hospedeiros (FAUQUET et al., 2008). O gênero inclui os mais importantes vírus de  
57 regiões tropicais e subtropicais, como o *Bean golden mosaic virus* (BGMV), o *African*  
58 *cassava mosaic virus* (ACMV) e o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). Os begomovírus  
59 apresentam um ou dois componentes genômicos de DNA circular de fita simples (ssDNA),  
60 são transmitidos pela mosca-branca *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) e infectam  
61 apenas dicotiledôneas (STANLEY et al., 2005; FARIAS et al., 2000).

62 Baseado na organização genômica, diversidade genética e distribuição geográfica, os  
63 begomovírus foram divididos em dois grupos: begomovírus do “Velho Mundo” (Europa,  
64 África, Ásia e Austrália) e do “Novo Mundo” (Américas). Os do “Velho Mundo” apresentam  
65 um ou dois componentes genômicos e frequentemente estão associados à moléculas de  
66 ssDNA satélites denominados DNA-1 (alfassatélites) e DNA  $\beta$  (betassatélites). Por outro  
67 lado, os encontrados no “Novo Mundo” apresentam dois componentes genômicos  
68 (denominados DNA-A e DNA-B), e acreditava-se que não estavam associados à DNAs  
69 satélites (MANSOOR et al., 2003). Recentemente, alfassatélites foram identificados no Brasil  
70 e na Venezuela, associados aos begomovírus bissegmentados Cleome leaf crumple virus  
71 (CILCrV), *Euphorbia mosaic virus* (EuMV) e Melon chlorotic mosaic virus (MeCMV), sendo  
72 esses os primeiros relatos de alfassatélites associados a begomovírus ocorrendo naturalmente  
73 no “Novo Mundo” (PAPROTKA; METZLER; JESKE, 2010; ROMAY et al., 2010).

74 O primeiro begomovírus associado a DNA- $\beta$  foi o *Ageratum yellow vein virus*  
75 (AYVV). Desde então, vários outros têm sido reportados e devido ao número crescente de  
76 relatos de DNA- $\beta$ , um sistema de classificação e nomenclatura foi proposto para estes  
77 componentes, onde já se observam listadas 51 espécies (BRIDDON et al., 2008).

78 Dois métodos são usados comumente para clonar o genoma destes vírus. O primeiro  
79 método baseia-se em PCR utilizando iniciadores universais ou específicos, através da  
80 amplificação parcial ou completamente o genoma (PATEL et al., 1993). Um segundo método  
81 baseia-se na extração do DNA total ou DNA semi-purificado enriquecido com a forma  
82 replicativa do genoma viral, seguido de digestão com enzimas de restrição, hibridação por

83 Southern blot e clonagem após digestão com uma enzima de corte único (GILBERTSON et  
84 al., 1991; SRIVASTAVA et al, 1995). Este procedimento geralmente tem baixa eficiência  
85 devido à baixa concentração de genoma viral para a preparação.

86 O método mais seguro para identificação de uma espécie de begomovírus tem sido a  
87 determinação da sequência completa de nucleotídeos do DNA-A. Devido à dificuldade  
88 inerente na identificação de espécies, o Grupo de Estudos de *Geminiviridae* do Comitê  
89 Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) propôs um critério para demarcação de espécie,  
90 sendo o valor mínimo de 89% de identidade de nucleotídeos entre sequências completas do  
91 DNA-A para espécies de *Begomovirus* (FAUQUET et al., 2008). Contudo a clonagem e  
92 sequenciamento do genoma completo são complexos devido às dificuldades no isolamento da  
93 forma replicativa dos begomovírus bipartidos. Em 2004, Inoue-Nagata e colaboradores  
94 desenvolveram um método simples de clonagem utilizando amplificação por círculo rolante  
95 (RCA – *rolling-circle amplification*) seguido por digestão com enzima de restrição e ligação  
96 ao vetor. Este método tem facilitado os procedimentos de clonagem e rápida realização de  
97 sequenciamento de um grande número de isolados. A utilização dessas técnicas tem permitido  
98 a realização de estudos de variabilidade genética, epidemiologia, além de fornecer suporte a  
99 programas de melhoramento genético de espécies cultivadas. Apesar dos inúmeros relatos de  
100 begomovírus infectando plantas invasoras no Brasil a caracterização molecular desses  
101 isolados tem recebido pequena atenção.

102

103

## 104 **2. Organização genômica e papel desempenhado pelas proteínas dos *Begomovirus* do** 105 **“novo mundo”**

106 O genoma da grande maioria dos *Begomovirus* do novo mundo apresenta dois  
107 componentes genômicos denominados DNA-A e DNA-B. Cada componente é encapsidado  
108 separadamente em partículas geminadas sendo necessárias as duas moléculas de DNA para  
109 que a infecção ocorra. Ambos apresentam um comprimento semelhante de aproximadamente  
110 2,6 Kb, exceto por uma região com cerca de 200 pb, a região comum (RC) ou região  
111 intergênica, não apresenta homologia de sequência. A RC é altamente conservada dentro de  
112 cada espécie viral, apresentando normalmente acima de 90 % de homologia. Na RC estão  
113 localizadas a origem de replicação e os promotores da síntese dos mRNAs virais  
114 (LAZAROWITZ, 1992; LAZAROWITZ et al., 1992; FONTES et al., 1994b).

115           Dentro da região comum localiza-se uma sequência de nove nucleotídeos (5'-  
116 TAATATTAC-3') conservada entre todos os geminivírus, onde se localiza o domínio  
117 funcional da origem de replicação (OROZCO; HANLEY-BOWDOIN, 1996). Este  
118 nonanucleotídeo é clivado durante o início da replicação viral e se localiza num contexto de  
119 30 nucleotídeos capazes de formar uma estrutura em forma de grampo. Embora a sequência  
120 de 30 nucleotídeos varie entre espécies de geminivírus, a estrutura em forma de grampo está  
121 sempre presente, sendo assim considerado um elemento conservado estruturalmente (FARIA;  
122 ZERBINI, 2000). A partir desta região intergênica divergem os genes virais, no sentido viral e  
123 complementar (HOWARTH et al., 1985). (Figura 1).

124           O DNA-A contém genes relacionados com replicação viral e síntese da capa proteica,  
125 enquanto o DNA-B possui genes associados ao movimento e expressão de sintomas  
126 (TIMMERMANS; DAS; MESSING, 1994; BROWN, 1997).

127           A transcrição é bidirecional tanto no componente A, que codifica genes envolvidos na  
128 replicação e encapsidação, quanto no componente B, que codifica genes envolvidos na  
129 movimentação do vírus da planta (FARIA et al., 2000).

130

131

132

133

134

135

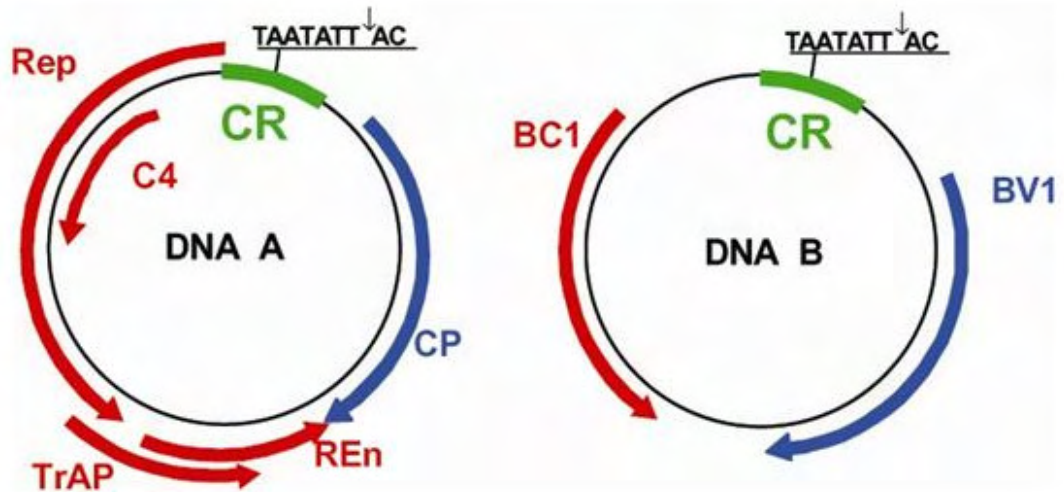
136

137

138

139

140



141

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

151

152 No componente A, um gene é transcrito no sentido viral denominado *cp* que codifica  
 153 para a proteína da capa proteica (CP), e três, no sentido complementar *rep*, *trap* e *ren*, as quais  
 154 codificam, respectivamente para a proteína associada à replicação (REP), a proteína da  
 155 transcrição (TRAP) e uma proteína que aumenta a replicação do genoma viral (REN)  
 156 (FARIA; ZERBINI, 2000).

157 O produto do gene *rep* (proteína associada à replicação, “replication associated  
 158 protein” – REP) é uma enzima com propriedades de ligação a ácidos nucléicos e de  
 159 endonucleases. A função da proteína REP é de se ligar ao sítio de iniciação da replicação viral  
 160 e cortar uma das fitas de DNA, iniciando o processo (FONTES; LUCKOW; HANLEY-  
 161 BOWDOIN, 1992).

162 A função da capa proteica (CP) está relacionada com a proteção do genoma contra  
163 degradação, aquisição do vírus e transmissão por insetos vetores, infectividade e movimento  
164 sistêmico. A proteína CP é determinante da especificidade da transmissão do vírus e na  
165 interação entre o vírus e a planta hospedeira, parece está associada com o desenvolvimento de  
166 sintomas (GARDINER et al., 1998).

167 A proteína TRAP, codificada pelo gene *trap*, é um fator de transcrição, que atua nos  
168 promotores de genes de sentido viral (*cp* e *ns*). Portanto os transcritos correspondentes a estes  
169 genes só são observados na célula após a expressão de *trap*. A proteína ativadora da  
170 transcrição (REN) codificada pelo gene *ren* é um fator de amplificação da replicação viral.  
171 Embora não seja essencial para que a replicação ocorra, o acúmulo de DNA viral é muito  
172 maior quando esta proteína está presente (ZERBINI; CARVALHO; MACIEL-ZAMBOLIN,  
173 2002).

174 AC4 é um importante fator na determinação dos sintomas, estando comprometida no  
175 controle do ciclo celular, além disso, ela pode combater uma resposta do hospedeiro à  
176 expressão da Rep (STANLEY et al, 2005).

177 No componente B, no sentido viral o gene *ns* codifica uma proteína que realiza o  
178 transporte do DNA através do envelope nuclear e no sentido complementar o gene *mp*  
179 (“movement protein” – MP) codifica a proteína (MP) com funções de movimento célula-a-  
180 célula (FARIA; ZERBINI, 2000; ZERBINI; CARVALHO; MACIEL-ZAMBOLIN, 2002).

181

182

### 183 **3. Replicação viral**

184

185 No processo de infecção dos geminivírus, o inseto vetor deposita as partículas virais  
186 (ssDNA) nas células floemáticas do hospedeiro (LAZAROWITZ, 1992). O genoma viral se  
187 dissocia da CP de forma espontânea e é transportado até o núcleo das células hospedeiras com  
188 o auxílio da proteína de tráfego (NS). Uma vez dentro do núcleo, ocorre a replicação do  
189 genoma viral (LAZAROWITZ, 1992; STANLEY et al., 1995).

190 A replicação se inicia com a síntese de uma fita complementar de DNA, gerando um  
191 intermediário de fita dupla, denominado “forma replicativa” (FR). A maneira como esta  
192 conversão ocorre não é conhecida, no entanto evidências indiretas, como a necessidade de  
193 desestabilização local do dsDNA para o iniciação da replicação por círculo rolante em  
194 procarionotes por “strand-nicking enzymes” indicam que é realizada por fatores do hospedeiro

195 (STENGER et al., 1991; STANLEY et al., 1995; ZERBINI; CARVALHO; MACIEL-  
196 ZAMBOLIN, 2002). Essa forma replicativa acumula-se em grandes concentrações na célula  
197 infectada e atua como molde para a síntese de novos componentes genômicos e também para  
198 transcrição de genes virais (LAUFS et al., 1995; HEYRAUD-NITSCHKE et al., 1995;  
199 STANLEY, 1995).

200 A RF serve como molde para síntese dos novos componentes genômicos que ocorre  
201 por meio do mecanismo de “Círculo rolante”, semelhante ao utilizado pelos bacteriófagos  
202  $\phi$  X174 e M13(ZERBINI; CARVALHO; MACIEL-ZAMBOLIN, 2002)

203 A origem de replicação viral (*ori*) está localizado na região comum (RC), onde  
204 encontra-se a sequência conserva em forma de grampo (“structurally-conserved element”,  
205 SCE) denominada nonanucleotídeo (5'-TAATATTAC-3'), no qual ocorre a clivagem  
206 (TAATATT↓AC) realizada pela proteína REP que atua como uma endonuclease, iniciando  
207 assim o processo de replicação por círculo rolante. A replicação ocorre da mesma forma para  
208 o DNA-B (LAUFS et al., 1995; FARIA; ZERBINI, 2000; STANLEY et al., 2005).

209 Na região comum encontram-se as sequências específicas para ligação da proteína Rep  
210 ( FONTES; LUCKOW; HANLEY-BOWDOIN, 1992; FONTES et al., 1994a) e regiões  
211 promotoras da RNA polimerase tipo II de plantas, responsável pela transcrição dos genes  
212 virais (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999).

213 Após a ligação da Rep ao DNA viral e estabilização do complexo formado por Rep,  
214 Ren e fatores do hospedeiro, a proteína Rep cliva o nonanucleotídeo localizado na SCE,  
215 dando início à replicação por círculo rolante (GUTIERREZ, 1999). O reconhecimento pela  
216 proteína Rep é considerado vírus-específico (HARRISON; ROBINSON, 1999; RAMOS et  
217 al., 2003). Após o estágio inicial, os fatores necessários para completar a fase de círculo  
218 rolante são de origem celular (GUTIERREZ et al., 2004). O último estágio é a produção e a  
219 encapsidação do ssDNA genômico circular maduro em partículas virais (GUTIERREZ,  
220 1999).

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

227



228

#### 229 **4. Movimento do vírus na planta**

230

231 Com a liberação das novas partículas virais para o exterior da célula, ocorre o início do  
232 processo de infecção sistêmica. Os vírions produzidos devem ser capazes de infectar a planta  
233 sistemicamente, via movimento lento célula a célula e de forma mais ágil a longa distância,  
234 via sistema vascular, geralmente através do floema. O movimento célula a célula ocorre  
235 simultaneamente à replicação do vírus, sendo que os vírus de plantas desenvolveram  
236 mecanismos adaptáveis às conexões existentes entre as células vegetais, denominadas  
237 plasmodesmas (BLUM; CARES; UESUGI, 2006).

238 Como os *Begomovirus* se multiplicam no núcleo da célula e não no citoplasma, esses  
239 vírus necessitam de uma etapa adicional de transporte, para efetivar a sua entrada e saída do  
240 núcleo celular (PALMER; RYBICKI, 1998). Para esse fim, o componente B dos begomovírus  
241 bissegmentados codificam duas proteínas relacionadas ao movimento viral, NSP e MP. O  
242 transporte através do envelope nuclear é um processo mediado pela proteína NSP, a qual leva  
243 DNA viral do citoplasma para o núcleo e vice-versa. Provavelmente essa passagem se dá  
244 através dos poros da membrana nuclear, utilizando as vias normais de importação /exportação  
245 de proteínas celulares, RNAs e ribonucleoproteínas (CARRINGTON et al., 1996).

246 Já a proteína MP associa-se à membrana celular e altera o limite de exclusão dos  
247 plasmodesmas, viabilizando o transporte do genoma viral (NOUEIRY; LUCAS;  
248 GILBERTSON, 1994). Estas duas proteínas atuam de forma cooperativa para mediar o  
249 tráfego intra- e intercelular do DNA viral (SANDERFOOT; LAZAROWITZ, 1995),  
250 permitindo ao vírus infectar sistemicamente o hospedeiro.

251 Uma vez que novas partículas virais são formadas na célula inicialmente infectada, o  
252 vírus necessita atingir outras células localizadas nas proximidades do sítio inicial da infecção,  
253 bem como células localizadas em tecidos mais distantes (PICÓ; DÍEZ; NUEZ, 1996).  
254 Seguindo o movimento célula-a-célula, o vírus atinge os plasmodesmas associados ao tecido  
255 vascular e então inicia-se o movimento a longa distância. O movimento viral a longa distância  
256 é passivo, acompanhando o fluxo de fotoassimilados dos tecidos fonte para os tecidos dreno  
257 através do sistema vascular. A grande maioria dos vírus é transportada via floema na forma de  
258 partícula completa, atingindo, a partir do ponto de penetração, primeiramente as raízes, em  
259 seguida as folhas jovens e posteriormente a planta toda, estabelecendo uma infecção sistêmica  
260 (JEFFREY; POOMA; PETTY, 1996). A velocidade de transporte do vírus neste caso é

261 rápida, sendo de 10 a 100 vezes superior quando comparada com o movimento célula a célula  
262 (FARIA; ZERBINI, 2000).

263

264

## 265 **5. Transmissão natural dos *Geminivirus***

266

267 Os geminivírus não são transmitidos via semente ou por contato manual. A única  
268 forma de dispersão desses vírus na natureza ocorre via vetor (DHAR; SINGH, 1995). Os  
269 vetores de geminivírus são insetos sugadores classificados na ordem Hemiptera, subordem  
270 Homoptera, incluindo as moscas-brancas (Aleyrodidae) e as cigarrinhas (Cicadellidae e  
271 Auchenorrhynca) (VILLAS-BÔAS et al., 1997). No caso do *Begomovirus*, a transmissão é  
272 realizada por *B. tabaci* (BROWN; BIRD, 1992). A mosca-branca é encontrada geralmente nos  
273 trópicos e subtropicais e em todos os continentes (FRANÇA et al., 2000). Sua distribuição está  
274 estreitamente relacionada à expansão da monocultura da maioria das espécies cultivadas, às  
275 condições dos sistemas agrícolas moderno, ao aumento da utilização de agrotóxicos e,  
276 principalmente, à grande facilidade em se adaptar aos diversos hospedeiros (BROWN; BIRD;  
277 FLETCHER, 1993).

278 Moscas-brancas são insetos diminutos, medindo de 1 a 2mm, sendo as fêmeas maiores  
279 (NATESHAN et al., 1996). Os adultos da mosca-branca têm o dorso de cor amarelo pálido e  
280 asas brancas. Como suas asas cobrem quase todo o corpo, a cor predominante é o branco, daí  
281 ser erroneamente denominada de mosca-branca (FRANÇA et al., 2000). Seu ciclo de vida  
282 compreende quatro fases (ovo, ninfa, pupa e adulto) e sofre influência das condições  
283 climáticas e ambientais, principalmente pela temperatura, umidade relativa do ar e planta  
284 hospedeira (NAVA-CAMBEROS et al., 2001).

285 Na década de 1990 foi introduzida uma nova espécie de *Bemisia*, a *B. argentifolii*,  
286 capaz de transmitir begomovírus mais eficientemente que a *B. tabaci*. Posteriormente, a  
287 análise de sequências de aloenzimas e DNA, complementados por avaliações morfológicas e  
288 ensaios de cruzamento e comportamento de acasalamento intra e interespecífico  
289 demonstraram que as diferenças não eram suficientes para uma distinção precisa entre as duas  
290 espécies (BELLOWS et al., 1994; FRANÇA; VILLAS BÔAS; BRANCO, 1996).

291 O aumento da incidência de doenças causadas por begomovírus em espécies  
292 cultivadas no Brasil está associado à introdução do biótipo B de *B. tabaci*, pois o biótipo A  
293 normalmente não coloniza algumas dessas hospedeiras (RIBEIRO et al., 1998; FARIAS;

294 ZERBINI, 2000). A *B. tabaci* biótipo B tem contribuído significativamente para severidade  
295 dos begomovírus e também para o aumento na diversidade de espécies e número de  
296 recombinantes entre eles (RIBEIRO et al., 2003; INOUE-NAGATA et al., 2006).

297 A modalidade de transmissão de begomovírus por moscas brancas é do tipo circulativa  
298 não propagativa (BROWN, 1997; GHANIM et al., 1998). Nesta o vírus circula na hemolinfa,  
299 mas não replica no vetor, envolvendo a passagem de partículas virais do intestino para a  
300 hemolinfa do inseto, da hemolinfa para as glândulas salivares e destas para outras plantas.  
301 Apenas para o caso do TYLCV existem evidências de replicação viral no inseto (GHANIM et  
302 al., 1998).

303 A *B. tabaci* apresenta hábito alimentar polífago com pelo menos 600 espécies de  
304 plantas hospedeiras em 74 famílias botânicas, incluindo espécies de brássicas, euforbiáceas,  
305 cucurbitáceas, leguminosas, solanáceas, plantas ornamentais e daninhas (BROWN;  
306 FROHLICH; ROSELL, 1995), sendo que plantas daninhas ocupam papel importante na  
307 manutenção de populações de mosca-branca, bem como reservatório de espécies virais. De  
308 acordo com Villas-Bôas et al. (2003), várias espécies de plantas daninhas contribuem para  
309 manutenção de populações desse vetor.

310 O período de retenção ou persistência do vírus no vetor é relativamente longo,  
311 algumas semanas ou por toda vida do inseto, já que este permanece virulífero depois das  
312 ecdises. Os vírus são adquiridos pelos insetos em períodos curtos, aproximadamente 10  
313 minutos, mas a probabilidade de transmissão aumenta com o aumento dos tempos de  
314 alimentação na fonte de vírus (LIU et al., 1997; COSTA, 1998).

315 No Brasil, a incidência e os danos causados por *B. tabaci* aumentaram  
316 exponencialmente a partir da década de 70, em associação ao grande aumento da área  
317 plantada com soja. A não adoção de medidas de controle permite que as populações de insetos  
318 atinjam níveis altíssimos, com a posterior migração para outras plantas após a colheita da  
319 soja. Esse fato levou à disseminação do BGMV, agente causal do mosaico dourado do  
320 feijoeiro, em plantios de feijoeiro próximos a cultivos de soja (COSTA, 1975).

321

322

### 323 **Variabilidade e estrutura genética de populações de begomovírus**

324

325 A análise da diversidade e estrutura genética de populações é crucial para uma melhor  
326 compreensão da evolução e interação do vírus com as plantas hospedeiras. As principais

327 fontes que determinam a variação e modifica a estrutura genética das populações dos vírus em  
328 plantas são: mutação, recombinação e pseudorecombinação (GARCIA-ARENAL; FRAILE;  
329 MALPICA, 2003). A geração de diversidade genética entre vírus de plantas fornecem novas  
330 oportunidades para adaptação a novos hospedeiros e a mudanças nas condições ambientais  
331 (ROOSSINCK, 1997). A ocorrência de eventos de recombinação, a ocorrência de pseudo-  
332 recombinação entre begomovírus bissegmentados, e a alta taxa de mutação contribuem para  
333 esse elevado grau de diversidade (PADIDAM; SAWYER; FAUQUET, 1999b; ANDRADE et  
334 al., 2006; DUFFY; HOLMES, 2009).

335

336

### 337 **Mutação**

338

339 Assim como para todos os vírus, a evolução dos geminivírus depende primariamente  
340 de mutações. Há evidências de que a rápida evolução dos geminivírus é, ao menos em parte,  
341 dirigida por processos mutacionais que agem especificamente sobre ssDNA (HARKINS et al.,  
342 2009). O impacto das mutações pontuais tem sido estudado nesse grupo de vírus. Sob  
343 diferentes condições de seleção, como presença de um efeito gargalo (população inicial  
344 pequena do vírus, período curto de aquisição pelo vetor), transferências sucessivas entre  
345 hospedeiros sem emprego do vetor, e inoculação em plantas resistentes (ISNARD et al.,  
346 1998).

347 Duffy; Holmes (2009) realizaram análises estruturadas no tempo de isolados de  
348 TYLCV e *East African cassava mosaic virus* (EACMV), para estimar a taxa de evolução  
349 dessas espécies de begomovírus na natureza. Taxas de mutação para o TYLCV foram  
350 estimadas em  $2,88 \times 10^{-4}$  subs/sítio/ano para o genoma completo. A região que codifica a  
351 proteína CP apresentou uma taxa maior ( $4,63 \times 10^{-4}$  subs/sítio/ano) e a região intergênica (não  
352 codificadora) apresentou uma taxa ainda maior ( $1,56 \times 10^{-4}$  subs/sítio/ano). Entretanto, as  
353 mutações observadas refletem mais uma rápida dinâmica mutacional do que uma frequência  
354 de evolução adaptativa. Para o EACMV as taxas foram estimadas em  $1,6 \times 10^{-3}$  e  $1,33 \times 10^{-4}$   
355 subs/sítio/ano para o DNA-A e DNA-B, respectivamente. A região que codifica a proteína CP  
356 apresentou  $1,37 \times 10^{-3}$  subs/sítio/ano e a região que codifica a proteína associada à replicação  
357 mostrou  $1,24 \times 10^{-3}$  subs/sítio/ano. As regiões codificadoras presentes no DNA-B, ORFs BV1 e  
358 BC1, apresentaram  $2,77 \times 10^{-4}$  e  $3,45 \times 10^{-4}$ , respectivamente (DUFFY; HOLMES, 2009).

359 A região que codifica a proteína CP apresentou  $1,37 \times 10^{-3}$  subs/sítio/ano e a região que  
360 codifica a proteína associada à replicação mostrou  $1,24 \times 10^{-3}$  subs/sítio/ano. As regiões  
361 codificadoras presentes no DNA-B, ORFs BV1 e BC1, apresentaram  $2,77 \times 10^{-4}$  e  $3,45 \times 10^{-4}$ ,  
362 respectivamente. Contudo, os autores validaram esses altos níveis de heterogeneidade apenas  
363 para o DNA-A e a ORF AV1. Foi observado então que as taxas de evolução indicadas para  
364 essas duas espécies de begomovírus, entre  $10^{-3}$  e  $10^{-5}$ , corroboram em geral aquelas  
365 determinadas experimentalmente para MSV (HARKINS et al., 2009) e TYLCCNV (GE et al.,  
366 2007).

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

372

### 373 **Recombinação**

374

375 A recombinação pode ocorrer em genomas de DNA e RNA e desempenham um papel  
376 importante na evolução dos vírus de plantas (GARCIA-ARENAL et al., 2001). Por  
377 recombinação, os vírus podem adquirir novas informações genéticas a partir de outros vírus  
378 ou ainda a partir do hospedeiro (PADIDAM; BEACHY; FAUQUET, 1999a).

379 Os vírus também através da recombinação, conseguem resgatar mutações deletérias  
380 pelas trocas genéticas com genomas do tipo selvagem (MAKINO et al, 1986).

381 A recombinação é um evento bastante comum em geminivírus (PADIDAM;  
382 BEACHY; FAUQUET, 1999a), e parece contribuir grandemente para a diversificação  
383 genética dos begomovírus, aumentando seu potencial evolutivo e adaptação local (MONCI et  
384 al., 2002).

385 Eventos de recombinação têm sido diretamente implicados na emergência de novas  
386 doenças e epidemias em plantas cultivadas. Essas incluem a epidemia devastadora do mosaico  
387 da mandioca (*Manihot esculenta*), causada pelo recombinante EACMV na Uganda e países  
388 vizinhos (PITA et al., 2001); as epidemias do complexo TYLCV na Bacia Ocidental do  
389 Mediterrâneo, com o surgimento dos recombinantes *Tomato yellow leaf curl Málaga virus*  
390 (TYLCMaIV) e *Tomato yellow leaf curl Axarquia virus* (TYLCAxV) nos campos de tomate

391 na Espanha e as epidemias de *Cotton leaf curl virus* (CLCuV) no Paquistão causadas por um  
392 complexo de espécies incluindo diversos begomovírus recombinantes (IDRIS; BROWN,  
393 2002; MONCI et al., 2002).

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

400 Os mecanismos precisos que controlam a recombinação em begomovírus permanecem  
401 desconhecidos (PADIDAM; BEACHY; FAUQUET, 1999a). No entanto, é conhecido que  
402 sítios recombinantes não são uniformemente distribuídos ao longo do genoma, com a  
403 existência de sítios frequentes (“hot spots”) e não-frequentes (“cold spots”) (STANLEY,  
404 1995; FAUQUET et al., 2005; GARCIA-ANDRES et al., 2007; LEFEUVRE et al., 2007).  
405 Análises bioinformáticas para detectar vírus recombinantes ocorrendo naturalmente revelaram  
406 que a origem de replicação viral é um sítio frequente de recombinação (HANLEY-  
407 BOWDOIN et al., 1999). A comparação de sequência de begomovírus mono e  
408 bissegmentados depositadas no GenBank até maio de 2006 (123 e 116 sequências,  
409 respectivamente) indicou que a região do gene *Rep* que codifica a porção N-terminal da  
410 proteína Rep, assim como a região intergênica adjacente (RC), são frequentemente  
411 intercambiadas durante a replicação. Também foram identificados sítios frequentes de  
412 recombinação localizados na região intergênica entre os genes *CP* e *Ren* (LEFEUVRE et al.,  
413 2007).

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

418

419

## 420 **Pseudo-recombinação**

421

422 A existência de dois componentes genômicos na maioria dos begomovírus promove  
423 um mecanismo alternativo, conhecido como pseudo-recombinação, pelo qual a troca de

424 material genético pode ocorrer sem necessidade de recombinação intermolecular, ocorrendo  
425 apenas a troca de componentes genômicos entre dois vírus distintos (SUNG; COUTTS, 1995;  
426 ANDRADE et al., 2006).

427 Experimentos com pseudo-recombinação são ferramentas úteis no estudo de funções  
428 de genes e podem revelar relações filogenéticas, como é o caso da mistura de componentes  
429 genômicos do BGYMV e do *Bean golden mosaic virus* (BGMV), que possuem identidade  
430 inferior a 75% em suas sequências de nucleotídeos e não formam pseudo-recombinantes  
431 infecciosos (GILBERTSON et al., 1993a). Por outro lado, pseudo-recombinantes formados a  
432 partir da mistura de componentes genômicos de dois isolados de BGYMV mostraram-se  
433 infecciosos. Quando inoculada, a mistura formada a partir de DNA-A do isolado da  
434 Guatemala (BGYMV-GA) e DNA-B do isolado da República Dominicana (BGYMV-DR) foi  
435 capaz de induzir os mesmos sintomas apresentados pelos parentais, enquanto o pseudo-  
436 recombinante recíproco induziu sintomas atenuados e tardios. Esses resultados demonstram  
437 que geminivírus com regiões comuns suficientemente similares podem formar pseudo-  
438 recombinantes infecciosos, mas ressaltam que frequentemente os pseudo-recombinantes  
439 recíprocos apresentam diferenças na eficiência de replicação e infecção sistêmica (FARIA et  
440 al., 1994). Esse fato foi também observado para o *African cassava mosaic virus* (ACMV) e  
441 TGMV (STANLEY et al., 2005; VON ARNIM; STANLEY, 1992).

442 Embora a pseudo-recombinação seja comum entre estirpes de uma mesma espécie de  
443 begomovírus, a formação de pseudo-recombinantes viáveis entre espécies distintas é mais  
444 difícil. Um pseudo-recombinante foi obtido entre o DNA-A do *Abutilon mosaic virus*  
445 (AbMV) e o DNA-B do *Sida golden mosaic Costa Rica virus* (SiGMCRV), porém o pseudo-  
446 recombinante recíproco não foi infeccioso (HOFER et al., 1997b). Similarmente, um pseudo-  
447 recombinante viável foi formado pelo DNA-A de um isolado de *Sida golden mosaic virus*  
448 (SiGMV) de Honduras (SiGMV-[Ho<sub>yv</sub>]) e o DNA-B do SiGMCRV. Entretanto, dentre os  
449 pseudo-recombinantes recíprocos formados pelo DNA-A do SiGMCRV combinado ao DNA-  
450 B de três isolados de SiGMV-[Ho<sub>yv</sub>] que possuíam pequenas diferenças na composição de  
451 nucleotídeos, apenas um mostrou-se viável, porém pouco eficiente, e não foi capaz de infectar  
452 a planta a partir da qual foi originalmente isolado (UNSELD et al., 2000).

453 A viabilidade de pseudo-recombinantes indica que fatores envolvidos na replicação e  
454 movimento são intercambiáveis entre espécies altamente relacionadas, ou entre estirpes de  
455 uma mesma espécie. A assimetria entre pseudo-recombinantes recíprocos indica que a

456 pseudo-recombinação entre begomovírus é um fenômeno complexo que envolve interações  
457 entre fatores do vírus e do hospedeiro (HILL et al., 1998).

458

459

## 460 **6. Diversidade de begomovírus infectando plantas cultivadas e plantas daninhas no** 461 **Brasil**

462

463 As begomoviroses têm prejudicado a produção de importantes culturas nas regiões  
464 tropicais e subtropicais, como feijão (*Phaseolus vulgaris*), mandioca (*Manihot esculenta*),  
465 algodão (*Gossypium* sp.), tabaco (*Nicotiana tabacum*) e tomate (*Solanum lycopersicum*),  
466 resultando em perdas significativas (GRAHAM et al., 2010).

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

474 Costa (1965) foi o primeiro a descrever o *Bean golden mosaic virus* (BGMV) no  
475 estado de São Paulo, um dos agentes etiológicos do mosaico dourado do feijoeiro. Na época,  
476 era considerada uma doença de importância econômica secundária, mas logo se espalhou  
477 tornando-se a doença mais importante em feijoeiros no Brasil, afetando principalmente os  
478 estados de Minas Gerais e Paraná.

479 Begomovírus que infectam feijoeiro (*Phaseolus* spp.) são distribuídos através das  
480 Américas, sendo sua incidência um fator limitante para a produtividade dessa cultura. A  
481 diversidade genética de begomovírus que infectam feijoeiro é baixa, com apenas quatro  
482 espécies descritas: *Bean calico mosaic virus* (BcaMV), *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV),  
483 *Bean golden mosaic virus* (BGMV) e *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV)  
484 (FAUQUET et al., 2008).

485 Foi demonstrado também que isolados brasileiros de BGMV apresentam um baixo  
486 grau de variabilidade genética, o que é incomum para begomovírus (FARIA; MAXWELL,  
487 1999). No entanto, estudos realizados em populações de BGMV infectando fava (*Phaseolus*



488 *lunatus* L.) demonstraram que a variabilidade genética dentro dessa espécie é alta (SILVA,  
489 2006; RAMOS-SOBRINHO et al., 2010).

490 Através de estudos moleculares ficou evidente que vírus distintos causavam o mosaico  
491 dourado do feijoeiro no Brasil, na América Central e Caribe (FARIA et al., 1994). A  
492 denominação atual para a espécie viral encontrada no Brasil é o BGMV, enquanto a espécie  
493 encontrada na América Central e Caribe manteve o BGYMV.

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

503 A incidência da infecção por begomovírus em tomateiro tem aumentado  
504 significativamente devido a introdução do Biótipo B da *Bemisia tabaci* no início da década de  
505 1990. Desde então, cinco definidas espécies de begomovírus foram descritas: *Tomato*  
506 *chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe*  
507 *rugose virus* (ToSRV), *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) e *Tomato yellow vein streak virus*  
508 (ToYVSV) (CALEGARIO et al., 2007; ZERBINI et al., 1996; FERNANDES et al., 2006;  
509 RIBEIRO et al., 2007).

510 Segundo Castillo-Urquiza et al., (2008) amostras de tomateiro e plantas daninhas  
511 coletadas nos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais indicou a prevalência do ToYVSV e  
512 de uma nova espécie denominada *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV). Além disso,  
513 mais cinco novas espécies foram identificadas, duas infectando tomateiro (*Tomato mild*  
514 *mosaic virus*, ToMIMV e *Tomato leaf distortion virus*, ToLDV e três provenientes das  
515 invasoras *Blainvillea rhomboidea* (*Blainvillea yellow spot virus*, BIYSV), *Sida rhombifolia*  
516 (*Sida yellow mosaic virus*, SiYMV) e *Sida micrantha* (*Sida common mosaic virus*,  
517 SiCmMV).

518 Albuquerque et al. (2012) relataram sequência completa do DNA-A de três  
519 begomovírus no Brasil, um potencialmente novo infectando tomateiro, *Tomato interveinal*  
520 *chlorosis virus* (ToICV) e dois já propostos anteriormente, no qual apenas a sequência parcial

521 do DNA-A estão disponíveis no banco de dados: Tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV)  
522 and Tomato golden vein virus (TGVV).

523 Em pimentão o primeiro relato de begomovírus no Brasil foi feito por Lima et al.  
524 (2001), que verificou um total de 43,8% de infecção nas amostras da cultivar S-59 e o híbrido  
525 Tango coletadas nos municípios de Curaçá (Bahia) e Petrolina (Pernambuco) no Submédio do  
526 Vale São Francisco, causando, em média, 20% de perda na produção.

527 Bezerra-Agazie et al. (2006) observaram em Petrolina de Goiás (Goiás) sintomas de  
528 mosaico amarelo e distorção de folha em pimenta dedo-de-moça, tendo sido verificada a  
529 espécie ToSRV (AY029750). No Estado de São Paulo foi verificada a mesma espécie  
530 ocorrendo em pimentão, no ano de 2005 (NOZAKI et al., 2006).

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

539 Além de plantas cultivadas, muitas espécies de plantas invasoras têm sido relatadas  
540 como hospedeiras de *Begomovirus* em vários países, inclusive no Brasil. As espécies relatadas  
541 geralmente pertencem a Malvaceae, Euphorbiaceae e Fabaceae (MORALES; ANDERSON,  
542 2001). Dados convincentes indicam que plantas invasoras podem funcionar como fontes de  
543 inóculo de *Begomovirus* para plantas cultivadas e que a erradicação dessas plantas das áreas  
544 de cultivo deve ser uma medida adotada visando à redução da incidência dessas viroses  
545 (ASSUNÇÃO et al., 2006).

546 Alguns estudos demonstraram casos em que *Begomovirus* provenientes de plantas  
547 invasoras podem ser transmitidos para espécies cultivadas através do inseto-vetor ou mediante  
548 inoculação via extrato vegetal tamponado (FRISCHMUTH et al., 1997; MORALES;  
549 ANDERSON, 2001).

550 No Brasil, já se realizaram estudos com o objetivo de caracterizar molecularmente  
551 isolados de begomovírus que infectam plantas silvestres e daninhas, sobretudo em  
552 associação às culturas do feijoeiro e do tomateiro (RIBEIRO et al., 1998; FARIA;  
553 MAXWELL, 1999; CASTILLO-URQUIZA et al., 2008). Os resultados desses estudos

554 revelaram que, a exemplo do que ocorre com plantas cultivadas, a diversidade genética é alta  
555 entre os isolados de begomovírus que infectam plantas invasoras (AMBROZEVICIUS et al.,  
556 2002; CALEGARIO, 2004; CASTILLO-URQUIZA, 2008).

557 Ambrozevicius et al. (2002) analisando geneticamente a variabilidade de geminivírus  
558 infectando tomateiros e algumas plantas daninhas associadas na região Sudeste do Brasil,  
559 observaram que os isolados de begomovírus extraídos das plantas de tomate e das plantas  
560 daninhas associadas aproximavam-se filogeneticamente, sugerindo que os hospedeiros  
561 naturais têm um importante papel como reservatório de espécies de begomovírus e que os  
562 vírus de tomate estão evoluindo a partir de plantas daninhas, devido principalmente a  
563 recombinações e pseudorecombinações.

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

567 Assunção et al. (2006) analisaram dez espécies de plantas daninhas na região Nordeste  
568 apresentando sintomas de mosaico amarelo, deformação do limbo foliar e redução do  
569 crescimento, a infecção por begomovírus foi confirmada através de PCR. Da família  
570 Capparaceae foi encontrada mussambê (*Cleome affinis*); Euphorbiaceae, cansação  
571 (*Cnidoscolus urens*); Fabaceae e feijão-de-rolinha (*Macroptilium lathyroides*); Malvaceae  
572 foram encontradas malva-guanxuma (*Sida rhombifolia*), mela-bode (*Herissantia crispa*),  
573 mela-veludo (*Sidastrum micranthum*) e malva (*Sida spinosa*); e, da família Sterculiaceae,  
574 carrapicho (*Triumfetta semitriloba*) e malva-sedosa (*Waltheria indica*). Algumas ainda não  
575 tinham sido relatadas como hospedeiras desses vírus no Brasil e no mundo, até o momento.  
576 Padrões distintos de clivagem obtidos em análise de PCR-RFLP sugeriram a existência de um  
577 alto grau de variabilidade genética. Entretanto, as espécies de begomovírus infectando estas  
578 plantas não foram identificadas.

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

587 Silva; Santos; Nascimento (2010) realizaram ensaios de inoculação por mosca-branca  
588 e enxertia com o objetivo de observar a transmissão de begomovírus a partir de tomateiros  
589 infectados para quatro espécies de plantas invasoras (*Amaranthus spinosus*, *A. viridis*,  
590 *Ageratum conizoides* e *B. pilosa*) e verificação de seu retorno para o tomateiro. Os resultados  
591 indicaram que o vetor transmitiu eficientemente o vírus para as quatro espécies. Por enxertia,  
592 apenas *B. pilosa* foi infectada. Esses resultados demonstram que as espécies invasoras são  
593 hospedeiras alternativas dos begomovírus de tomateiro presentes na região da Serra de  
594 Ibiapaba e, em condições de campo, na presença do vetor, podem constituir importantes  
595 fontes de inóculo para essa cultura. No entanto, as espécies de begomovírus infectando estas  
596 plantas não foram identificadas.

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

603 Silva et al. (2011; 2012) observaram uma alta diversidade de espécies em  
604 begomovírus ervas daninhas leguminosas tais como *Macroptilium* spp., enquanto uma única  
605 espécie virais foi detectado na erva daninha *Cleome affinis* (embora com um grau elevado de  
606 variabilidade genética intra espécies).

607 Almeida (2012) identificou a presença de infecção por begomovirus bipartidos em três  
608 espécies de Malváceas: *Sidastrum micranthum*, algodão (*Gossypium hirsutum*) e *Malvaviscus*  
609 *arboreus*. Amostra de *S. micranthum* apresentando 69% de identidade de nucleotídeos com  
610 *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV), sugerindo assim uma nova espécie de begomovírus.  
611 Já amostras de algodão apresentaram 78% de identidade (DNA-A) com Tomato mosaic  
612 comum virus (ToCMV) e 64% (DNA-B) com *Cabbage leaf curl virus* (CabLCV) e  
613 *Rhyncosia rugose golden mosaic virus* (RhRGMV). Na planta ornamental *Malvaviscus*  
614 *arboreus*, a sequência nucleotídica do DNA-A e do DNA-B apresentaram identidade de 78%  
615 e 74%, respectivamente, com Abutilon mosaic Bolivia virus (AbMBoV). Com este resultado  
616 fica claro que novas espécies de begomovírus estão ocorrendo em plantas daninhas, cultivadas  
617 e ornamentais pertencente à família Malvaceae no Brasil.

618 Tavares et al., (2012) com o objetivo de caracterizar a diversidade de begomovírus  
619 infectando plantas daninhas no Brasil, tiveram DNA total extraído de plantas de *Blainvillea*

620 *rhomboidea* e *Sida* spp. coletadas em Viçosa (Minas Gerais) e alguns municípios do estado de  
621 Alagoas. Através da análise de sequência constataram que todos os isolados originários de *B.*  
622 *rhomboidea* pertenciam a uma única espécie viral, Blainvillea yellow spot virus (BIYSV),  
623 sugerindo que BIYSV pode ser o único begomovírus presente nesta espécie de planta  
624 invasora. Quatro vírus caracterizados em espécies de *Sida* representaram espécies novas, para  
625 as quais os seguintes nomes foram propostos: Sida yellow net virus (SiYNV) obtido de *Sida*  
626 *micrantha*, Sida mottle Alagoas virus (SiMoAV) obtido de *S. urens* e *Sida* sp., Sida yellow  
627 blotch virus (SiYBV) e Sida yellow mosaic Alagoas virus (SiYMAV) obtidos de *S. urens*.

628 O objetivo desse estudo foi determinar a diversidade de begomovírus que infectam  
629 plantas daninhas (famílias Malvaceae, Lamiaceae, Solanaceae) no Nordeste do Brasil, como  
630 etapa inicial para demonstrar sua importância como reservatórios naturais e fontes de inóculo  
631 desses vírus.

632

633

634

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

635 ALBUQUERQUE, L.C. et al. Further characterization of tomato-infecting begomoviruses in  
636 Brazil. **Archives of Virology**, New York, v. 157, p. 747–752, 2012.

637 ALMEIDA, M.M.S. **Caracterização molecular de begomovírus de malváceas** (Tese),  
638 Universidade de Brasília, Dep. de Fitopatologia, Brasília, 2012. 72p.

639 ANDRADE, E.C. et al. *Tomato yellow spot virus*, a tomato-infecting begomovirus from  
640 Brazil with a closer relationship to viruses from *Sida* sp., forms pseudorecombinants with  
641 begomoviruses from tomato but not from *Sida*. **Journal of General Virology**, London, v. 87,  
642 p. 3687-3696, 2006.

643 AMBROZEVICIUS, L.P. et al. Genetic diversity of begomovirus infecting tomato and  
644 associated weeds in Southeastern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 372-  
645 377, 2002.

646 ARGUELLO-ASTORGA, G. et al. High-frequency reversion of geminivirus replication  
647 protein mutants during infection. **Journal of Virology**, Washington, v. 81, p. 11005-11015,  
648 2007.

- 649 ASSUNÇÃO, I.P. et al. Diversidade genética de begomovírus que infectam plantas invasoras  
650 na Região Nordeste. **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v. 24, p. 239-244, 2006.
- 651 BELLOWS Jr, T.S. et al. Description of especies of *Bemisia* (Homoptera: Aleyrodidae).  
652 **Annals of the Entomological Society of America**, Palo Alto, v. 87, p. 195- 206, 1994.
- 653 BEZERRA, I.C. et al. Survey of geminivirus infection in tomato producing areas in Federal  
654 District. **VIII Encontro Nacional de Virologia**. São Lourenço, MG, 1996. 289 p.
- 655 BEZERRA-AGASIE, I.C. et al. First report of *Tomato severe rugose virus* in chili pepper in  
656 Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, p. 114, 2006.
- 657 BLUM, L.E.B.; CARES, J.E.; UESUGI, C.H. **Fitopatologia: o estudo das doenças de**  
658 **plantas**. 1 Ed. Brasília: Otimismo, 2006. 265p.
- 659 BRIDDON, R.W. et al. Recommendations for the classification and nomenclature of the  
660 DNA-β satellites of begomoviruses. **Archives of Virology**, New York, v. 153, p. 763-781,  
661 2008.
- 662 BROWN, J.K.; BIRD, J. Whitefly-transmitted Geminiviruses and associated disorders in the  
663 Americas and the Caribbean Basin. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 76, n. 3, p. 220-225, 1992.
- 664 BROWN, J.K.; BIRD, J.; FLETCHER, D.C. First report of *Passiflora leaf mottle* disease  
665 caused by a whitefly-transmitted geminivirus in Puerto Rico. **Plant Disease**, Saint Paul, v.  
666 77, 1993. 1264p.
- 667 BROWN, J.K.; FROHLICH, D.R.; ROSELL, R.C. The sweet potato or silver leaf whiteflies:  
668 Biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex. **Annual Review of Entomology**, Palo  
669 Alto, v. 40, p. 511-534, 1995.
- 670 BROWN, J.K. The biology and molecular epidemiology of the Geminiviridae subgroup III.  
671 **Plant Microbe Interactions**. New York. v. 2, p. 125-195, 1997.
- 672 CALEGARIO, R.F. **Caracterização do isolado de begomovírus MG-Bi2, um possível**  
673 **membro da espécie *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV)**. (Tese M.S.). Departamento de  
674 Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004. 48p.

675 CALEGARIO, R.F. et al. Characterization of *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), a novel  
676 tomato-infecting begomovirus from Brazil. **Brazilian Journal of Agricultural Research**,  
677 Brasília, v. 42, p. 1335-1343, 2007.

678 CARRINGTON, J.C. et al. Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. **Plant**  
679 **Cell**, Rockville, v. 8, p. 1669-1681, 1996.

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

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

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

687 DHAR, A.K.; SINGH, R.P. Geminivirus. In: SINGH, U.S.; SINGH, R.P.; KHOMOTO, K.  
688 (Eds). Pathogenesis and host specificity in plant diseases. **Virus & Viroids**. St. Paul: **APS**  
689 **Press**, p. 289-309, 1995.

690 DUFFY, S.; SHACKELTON, L.A.; HOLMES, E.C. Rates of evolutionary change in viruses:  
691 Patterns and determinants. **Nature Reviews Genetics**, London, v. advanced online  
692 publication, p., 2008.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

718 FERNANDES, A.V. et al. Cloning and molecular characterization of A components of two  
719 new *Sida rhombifolia*-infecting geminiviruses. **Virus Reviews and Research**, Belo  
720 Horizonte, v. 4, p. 148, 1999.

721 FERNANDES, J.J. et al. Biological and molecular properties of Tomato rugose mosaic virus  
722 (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. **Plant Pathology**, v. 55, p. 513-  
723 522, 2006.

724 FONTES, E.P.B.; LUCKOW, V.A.; HANLEY-BOWDOIN, L. A geminivirus replication  
725 protein is a sequence-specific DNA binding protein. **Plant Cell**, Rockville, v. 4, p. 597-608,  
726 1992.



727 FONTES, E.P.B. et al. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA  
728 is essential for viral replication. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 269, p. 8459-  
729 8465, 1994a.

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

732 FRANÇA, F.H. et al. Manejo integrado de pragas. In: Tomate para processamento industrial,  
733 Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, **Embrapa Hortaliças**,  
734 Brasília, 2000. 168p.

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

738 GARCIA-ANDRES, S. et al. Frequent occurrence of recombinants in mixed infections of  
739 tomato yellow leaf curl disease-associated begomoviruses. **Virology**, New York, v. 365, p.  
740 210-219, 2007.

741 GARCIA-ARENAL, F.; FRAILE, A.; MALPICA, J.M. Variability and genetic structure of  
742 plant virus populations. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, p. 157-186,  
743 2001.

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

746 GARDINER, W. et al. Genetic analysis of *Tomato golden mosaic virus*: The coat protein is  
747 not required for systemic spread or symptom development. **EMBO Journal**, Oxford, v. 7, p.  
748 899-904, 1998.

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

751 GHANIM, M. et al. Evidence for transovarial transmission of *Tomato yellow leaf curl virus*.  
752 **Virology**, New York, v. 240, p. 295-303, 1998.

753 GILBERTSON, R.L. et al. Genetic diversity in geminiviruses causing bean golden mosaic  
754 disease: the nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of a Brazilian  
755 isolate of bean golden mosaic geminivirus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 709-715,  
756 1993a.

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

759 GILBERTSON, R.L. et al. Cloning of the complete DNA genomes of four bean-infecting  
760 geminiviruses and determining their infectivity by electric discharge particle acceleration.  
761 **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, p. 980–985, 1991.

762 GIORDANO, L.B. et al. Efeito da infecção precoce por Begomovirus com genoma bipartido  
763 em características de frutos de tomate industrial. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, p.  
764 815-818, 2005.

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

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

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

773 HANLEY-BOWDOIN, L. et al. Geminiviruses: Models for plant DNA replication,  
774 transcription, and cell cycle regulation. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.  
775 18, p. 71-106, 1999.

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

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

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

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

786 HÖFER, P. et al. Nucleotide sequence of a new bipartite geminivirus isolated from the  
787 common weed *Sida rhombifolia* in Costa Rica. **Virology**, New York, v. 78, p. 1785-1790,  
788 1997.

789 HOWARTH, A.J. et al. Nucleotide sequence of Bean golden mosaic virus and a model for  
790 gene regulation in Geminiviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**,  
791 v. 82, p. 3572-3576, 1985.

792 INOUE-NAGATA, A.K. et al. A simple method for cloning the complete begomovirus  
793 genome using the bacteriophage  $\phi$ 29 DNA polymerase. **Journal of Virological Methods**,  
794 London, v. 116, p. 209-211, 2004.

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

797 INOUE-NAGATA, A.K. et al. New species emergence via recombination among isolates of  
798 the Brazilian tomato infecting *Begomovirus* complex. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**,  
799 Rio de Janeiro, v. 41, p. 329-1332, 2006.

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

803 JEFFREY, J.L.; POOMA, W.; PETTY, I.T.D. Genetic requirements for local and systemic  
804 movement of *Tomato golden mosaic virus* in infected plants. **Virology**, New Yotk, v. 233, p.  
805 208- 218, 1996.

806 LAUFS, J. et al. In vitro cleavage and joining at the viral origin of replication by the  
807 replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. **Proceedings of the National**

808 **Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, p. 3879– 3883,  
809 1995.

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

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

814 LEFEUVRE, P. et al. Begomovirus 'melting pot' in the south-west Indian Ocean islands:  
815 Molecular diversity and evolution through recombination. **Journal of General Virology**, v.  
816 88, p. 3458-3468, 2007.

817 LIU, L. et al. Molecular characterization of a subgroup I geminivirus from a legume in South  
818 Africa. **Journal of General Virology**, London, v. 78, n. 8, p. 2113-2117, 1997.

819 LIMA, G.S.A. et al. Detection and partial characterization of geminiviruses associated to  
820 weeds in the state of Pernambuco. **Virus Reviews and Research**, Belo Horizonte, v. 6, p.  
821 158, 2001.

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

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

827 MAKINO, S. et al. High frequency RNA recombination of murine coronaviruses. **J. Virol.** v.  
828 57, p. 729–737, 1986.

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

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

834 MORALES, F.J.; ANDERSON, P.K. The emergence and dissemination of whitefly  
835 transmitted geminiviruses in Latin America. **Archives of Virology**, New York, v. 146, n. 3, p.  
836 415-441, 2001.

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

839 NATESHAN, H.M. et al. Host range, vector and serological relationships of cotton leaf curl  
840 virus from southern India. **Annual Applied Biology**, v. 28, p. 233-244, 1996.

841 NAVA-CAMBEROS, U.N.; RILEY, D.G.; HARRIS, M.K. Temperature and host plant  
842 effects on development, survival, and fecundity of *Bemisia argentifolli* (Homoptera:  
843 Aleyrodidae). **Environmental Entomology**, v. 30, p. 55-63, 2001.

844 NOUEIRY, A.O.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. Two proteins of a plant DNA virus  
845 coordinate nuclear and plasmodesmal transport. **Cell**, Cambridge, v. 76, p. 925-932, 1994.

846 NOZAKI, D.N. et al. First report of *Tomato severe rugose virus* infecting pepper plants in  
847 Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 3, 2006, 5040p.

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

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

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

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

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

859 PAPROTKA, T.; METZLER, V.; JESKE, H. The complete nucleotide sequence of a new  
860 bipartite begomovirus from Brazil infecting *Abutilon*. **Archives of Virology**, New York, v.  
861 155, p. 813-816, 2010b.

862 PAPROTKA, T.; METZLER, V.; JESKE, H. The first DNA 1-like alpha satellites in  
863 association with New World begomoviruses in natural infections. **Virology**, New York, v.  
864 404, p. 148-157, 2010c.

865 PATEL, V.P. et al. Cloning biologically active geminivirus DNA using PCR and overlapping  
866 primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 11, p. 1325–1326, 1993.

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

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

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

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

879 RAMOS-SOBRINHO, R. et al. Genetic structure of a population of the begomovirus *Bean*  
880 *golden mosaic virus* (BGMV) that infects lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in the state of  
881 Alagoas, Brazil. Program and Abstracts, **6th International Geminivirus Symposium and**  
882 **4th International ssDNA Comparative Virology Workshop**. Guadalajara, México. 2010.

883 RIBEIRO, S.G. et al. Occurrence of geminivirus in tomato plants in Bahia. **VIII Encontro**  
884 **Nacional de Virologia** (Resumos). São Lourenço, MG: SBV, p. 290, 1996.

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

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

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

892 ROJAS, M.R. et al. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect  
893 whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 77, p. 340-347, 1993.

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

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

898 ROOSSINCK, M. J. Mechanisms of plant virus evolution. **Annu. Rev. Phytopathol.** v. 35, p.  
899 191–209, 1997.  
900

901 SANDERFOOT, A.A.; LAZAROWITZ, S.G. Cooperation in viral movement: The  
902 geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the  
903 cell periphery. **Plant Cell**, Rockville, v. 7, p. 1185-1194, 1995.

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

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

910 SILVA, S.J.C. et al. High genetic variability and recombination in a begomovirus population  
911 infecting the ubiquitous weed *Cleome affinis* in northeastern Brazil. **Archives of Virology**,  
912 New York, v. 156, p. 2205–2213, 2011.

913 SILVA, S.J.C. et al. Species diversity, phylogeny and genetic variability of begomovirus  
914 populations infecting leguminous weeds in northeastern Brazil. **Plant Pathol**, v. 61, p. 457–  
915 467, 2012.

916 SRIVASTAVA, K.M. et al. Molecular cloning of Indian *Tomato leaf curl virus* genome  
917 following a simple method of concentrating the supercoiled replicative form of viral DNA.  
918 **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 51, p. 297–304, 1995.

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

921 STENGER, D.C. et al. Replicational release of geminivirus genomes from tandemly repeated  
922 copies: Evidence for rolling-circle replication of a plant viral DNA. **Proceedings of the**  
923 **National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88,p.  
924 8029-8033, 1991.

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

928 TAVARES, S.S. et al. Further molecular characterization of weed-associated begomoviruses  
929 in Brazil with an emphasis on *Sida* spp. **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 2, p. 305-  
930 315, 2012.

931 TIMMERMANS, M.C.P.; DAS, O.P.; MESSING, J. Geminiviruses and their uses as  
932 extrachromosomal replicons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular**  
933 **Biology**. v. 45, p. 79-112, 1994.

934 UNSELD, S. et al. Virus-specific adaptations for the production of a pseudorecombinant virus  
935 formed by two distinct bipartite geminiviruses from Central America. **Virology**, New York, v.  
936 274, p. 179-188, 2000.

937 VAN REGENMORTEL, M.H.V. et al. *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International*  
938 *committee on the Taxonomy of Viruses*. **Academic Press**, 2000.

939 VILLAS-BÔAS, G. L. et al. Manejo Integrado da Mosca Branca, *Bemisia argentifolii*.  
940 Brasília. **EMBRAPA-CNPq**. Circular Técnica, n. 9, 1997.



941 VILLAS-BÔAS, G.L. et al. Avaliação de plantas daninhas como possíveis hospedeiras da  
942 mosca-branca. In: **43º Congresso Brasileiro de Olericultura**, Recife, p. 344, 2003.

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

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

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

950

951

952

953

954

955

956

957

958

959

960

961

962

963

964

965

966

967

968

969

970

971

972

973

974

975

976

977

978

## CAPÍTULO II

---

979 **Novos begomovírus associados a malváceas daninhas no**

980 **Nordeste do Brasil**

981

982

983

984

985

986

987

988

989

990 **Novos begomovírus associados a malváceas daninhas no Nordeste do Brasil**

991

992 *New begomovirus associated with malvaceous weed in Brazil's Northeast*

993

994

995

**RESUMO**

996

997 Os begomovírus causam sérios problemas na produção de culturas de muitas áreas  
998 tropicais e subtropicais em todo o mundo, incluindo o Brasil. Os begomovírus são  
999 transmitidos por mosca-branca, possuem DNA circular de fita simples e estão  
1000 frequentemente associados com plantas daninhas, no qual podem servir de reservatórios  
1001 naturais de vírus podendo causar epidemias em plantas cultivadas. Portanto, esse estudo  
1002 teve como objetivo caracterizar os begomovírus associados a plantas daninhas da  
1003 família Malvaceae no nordeste brasileiro para avaliar sua diversidade e importância  
1004 como fontes de novos vírus para plantas cultivadas. Plantas daninhas (Família  
1005 Malvaceae) com sintomas típicos de infecção por begomovírus foram coletadas nos  
1006 estados de Alagoas, Pernambuco e Bahia durante os anos de 2010 a 2012. Um total de  
1007 22 componentes genômicos (13 DNA-A e 9 DNA-B) foram amplificados por RCA,  
1008 clonados e sequenciados. Análises das sequências indicaram a presença de cinco  
1009 espécies de begomovírus, sendo três novas espécies. Nas análises filogenéticas indicam  
1010 que todas as novas espécies se agruparam com begomovírus brasileiros. Evidências  
1011 múltiplas de recombinação foram detectadas. Nenhuma evidência para eventos de  
1012 recombinação intraespecíficos foi observada. Os begomovírus provenientes de *Sida* spp.  
1013 e do tomateiro foram identificados como parentais. Esses resultados indicam que as  
1014 malváceas daninhas constituem importantes reservatórios de begomovírus e que eventos  
1015 de recombinação tem aparentemente contribuído para o surgimento de novas espécies  
1016 nessas hospedeiras.

1017

1018

1019

1020 **Palavras-chave:** geminivírus, recombinação, hospedeiros alternativos.

1021

1022

1023 **ABSTRACT**

1024

1025 The begomovirus cause serious problems on crops production of many tropical and  
1026 subtropical areas around the world, including Brazil. The begomovirus are transmitted  
1027 by whiteflies, they have circular single-stranded DNA and are frequently associated  
1028 with weeds, which can serve as natural reservoirs of virus being able to cause epidemics  
1029 on crops plants. Therefore, this study aimed to characterize the begomovirus associated  
1030 with weeds from Malvaceae family in Brazil's Northeast and to evaluate their diversity  
1031 and importance as source of new virus for crops plants. Weeds (Malvaceae Family) with  
1032 typical symptoms of begomovirus infection were collected in Alagoas, Pernambuco and  
1033 Bahia state during the years 2010 to 2012. A total of 22 genomic components (13 DNA-  
1034 A and 9 DNA-B) were amplified by RCA, after they were cloned and sequenced.  
1035 Analysis of the sequences indicated the presence of 5 begomovirus species, from which  
1036 3 were new. The phylogenetic analysis indicated that the new species were grouped  
1037 with Brazilian begomovirus. Multiple evidences of recombination were detected. No  
1038 evidence for intra specific recombination events were observed. The begomovirus from  
1039 *Sida* spp. and tomato were identified as parents. These results indicate that malvaceaes'  
1040 weeds are major reservoirs of begomovirus and that events of recombination apparently  
1041 have contribute to the emergence of new species on these hosts.

1042

1043

1044

1045 **Keywords:** geminivirus, recombination, alternative hosts

1046

1047

1048

1049

1050

1051

1052

1053

1054

1055

1056

1057

1058

1059

## INTRODUÇÃO

1060  
1061  
1062

1063 A família *Geminiviridae* são importantes patógenos de plantas e englobam vírus  
1064 cujo genoma é constituído por DNA circular de fita simples, encapsidado por uma única  
1065 proteína estrutural que confere à partícula uma estrutura icosaédrica geminada. A  
1066 família é composta pelos gêneros *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus*,  
1067 definidos com base no inseto vetor, gama de hospedeiros e organização genômica  
1068 (Fauquet e Stanley, 2005).

1069 Os begomovírus (gênero *Begomovirus*) possuem um ou dois componentes  
1070 genômicos, são transmitidos pela mosca-branca *Bemisia tabaci* e infectam  
1071 dicotiledôneas. No Brasil prevalecem os representantes com dois componentes, que são  
1072 capazes de infectar indivíduos de variadas famílias botânicas (Paprotka et al, 2010a).

1073 Os begomovírus encontrados na América do Sul são altamente diversos, sendo  
1074 considerados fatores limitantes para a produção de várias culturas economicamente  
1075 importantes (Morales, 2006). No Brasil, esses vírus têm causado sérios danos às  
1076 culturas do tomateiro e do feijoeiro (Faria et al., 2000; Morales, 2006; Graham et al.,  
1077 2010).

1078 O aumento da incidência de doenças causadas por begomovírus em espécies  
1079 cultivadas no Brasil está associado à introdução do biótipo B de *B. tabaci*, uma vez que  
1080 o biótipo A normalmente não coloniza algumas dessas hospedeiras (Ribeiro et al.,  
1081 1998). A *B. tabaci* biótipo B tem contribuído significativamente para severidade dos  
1082 begomovírus bem como para o aumento na diversidade de espécies e número de  
1083 recombinantes entre eles (Inoue-Nagata et al., 2006).

1084 Alguns begomovírus economicamente importantes em plantas cultivadas estão  
1085 intimamente relacionados com begomovírus encontrados em plantas daninhas (Ilyas et  
1086 al., 2010). Plantas daninhas são consideradas reservatórios de begomovírus que infectam  
1087 plantas cultivadas e fontes para novos vírus recombinantes devido a infecções mistas  
1088 (Castillo-Urquiza, 2008; Graham et al., 2010; Ilyas et al., 2010).

1089 Durante muito tempo o interesse pela caracterização de begomovírus se  
1090 concentrou em plantas cultivadas, sendo as infecções de plantas daninhas ignorado.  
1091 Contudo nos últimos anos, com a demonstração de que begomovírus de plantas  
1092 daninhas podem infectar plantas cultivadas a caracterização desses vírus se intensificou,

1093 levando ao relato de dezenas de novas espécies, tanto no Brasil, quanto no exterior  
1094 (Castillo-Urquiza et al., 2008; Paprotka et al., 2010b; Silva et al., 2011; Silva et al.,  
1095 2012; Tavares et al., 2012).

1096 Espécies pertencentes à família Malvaceae são comumente relatadas como  
1097 hospedeiras de begomovírus, destacando-se o algodão, quiabo e *Abutilon* e várias  
1098 espécies *Sida* spp. Até o momento não foram encontrados relatos de doenças causadas  
1099 por begomovírus em algodoeiro no Brasil (Jovel et al., 2004; Castillo-Urquiza, et al.,  
1100 2008; Aranha et al., 2011).

1101 Semelhante ao observado em plantas cultivadas, a diversidade de espécies de  
1102 begomovírus infectando plantas daninhas é bastante alta, sendo esta explicada em parte  
1103 pela ocorrência de múltiplos eventos de recombinação (Castillo-Urquiza et al., 2008;  
1104 Silva et al., 2011; Silva et al., 2012; Tavares et al., 2012). No Brasil, *Sida* spp. tem sido  
1105 frequentemente descrita como hospedeira de várias espécies de begomovírus. *Sida* spp.  
1106 desempenham um importante papel epidemiológico como fonte de begomovírus para  
1107 espécies solanáceas, especialmente tomateiro (Castillo-Urquiza et al., 2008; Tavares et  
1108 al., 2012). Esse estudo teve como objetivo caracterizar os begomovírus associados a  
1109 plantas daninhas da família Malvaceae no nordeste brasileiro para avaliar sua  
1110 diversidade e importância como fontes de novos vírus para plantas cultivadas.

1111

## 1112 MATERIAL E MÉTODOS

1113

1114

1115

### 1115 **Coleta do material vegetal, identificação botânica**

1116 Foram coletadas trinta amostras de plantas daninhas pertencentes aos gêneros  
1117 *Herissantia*, *Pavonia*, *Sida*, *Sidastrum*, *Triumfetta* e *Waltheria* (todos da família  
1118 Malvaceae), apresentando sintomas de mosaico, amarelecimento e redução de  
1119 crescimento (Figura 1). As coletas foram realizadas nos estados de Alagoas, Bahia e  
1120 Pernambuco, no período de 2010 a 2012. As amostras foliares de cada planta foram  
1121 herborizadas e estocadas a temperatura ambiente.

1122

### 1123 **Amplificação do DNA e clonagem**

1124 O DNA total foi extraído a partir de tecidos foliares jovens de acordo com o  
1125 método Doyle e Doyle (1987). Para a confirmação da presença da infecção por

1126 begomovírus, foi realizada PCR utilizando primers universais para os membros do  
1127 gênero (Rojas et al., 1993). A partir das amostras positivas para PCR, os genomas virais  
1128 completos foram amplificados utilizando o método de círculo rolante (RCA) (Inoue-  
1129 Nagata et al., 2004), clonados no vetor pBluescript KS+ (Stratagene) previamente  
1130 linearizado com as enzimas de restrição *Bam* HI, *Cla* I, *Apa* I e *Hind* III e sequenciados  
1131 na Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul) *primer walking*.

1132

### 1133 **Comparações de sequências e análise filogenética**

1134 As sequências foram inicialmente analisadas com o algoritmo BLAST para  
1135 identificação das espécies virais com maior porcentagem de identidade, baseado no  
1136 valor limitante de 89% estabelecido pelo grupo de estudos de *Geminiviridae* (ICTV)  
1137 (King et al., 2012). Comparações par a par de nucleotídeos (*pairwise*) foram realizadas  
1138 com DNAMAN v. 6.0 (Lynnon Co.) utilizando a opção alinhamento ótimo seguindo  
1139 parâmetros: Ktuple = 2, Gap penalty = 7, Gap open = 10, Gap extension = 5.

1140 Sequências de nucleotídeos dos begomovírus utilizados nas análises  
1141 filogenéticas e recombinação (isolados obtidos neste estudo e outros begomovírus da  
1142 América do Sul anteriormente descritos, Tabela 1) foram alinhadas utilizando o módulo  
1143 Muscle no programa MEGA 5.05 (Tamura et al., 2011). A árvore filogenética, baseada  
1144 no alinhamento do DNA-A, foi construída utilizando-se o método neighbour-Joining  
1145 incluindo análise bootstrap com 10.000 repetições.

1146

### 1147 **Análises de Recombinação**

1148 Para evidenciar ocorrência de recombinação foi realizada uma análise de  
1149 filogenia reticulada (*Phylogenetic network*) utilizando o método neighbour-net  
1150 implementado no SplitsTree4 (Huson e Bryant, 2006). Análises adicionais de potenciais  
1151 eventos de recombinação e identificação de prováveis sequências parentais foram  
1152 realizadas utilizando o programa de detecção de recombinação (RDP) versão 3.0  
1153 (Martin et al., 2010) usando parâmetros padrões. Eventos de recombinação detectados  
1154 por pelo menos quatro métodos de análises disponíveis no programa foram  
1155 considerados confiáveis. As análises de recombinação incluíram os vírus obtidos neste  
1156 estudo e os descritos anteriormente no Brasil.

1157

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

1158

1159

### 1160 **Comparações das sequências e análise filogenética**

1161 Um total de 22 clones foram obtidos a partir de apenas dez das trinta amostras  
1162 coletadas, sendo 13 correspondentes ao DNA-A e 9 ao DNA-B (Tabela 2). Análises  
1163 BLAST e comparações par a par de sequências nucleotídicas, indicaram a presença de  
1164 cinco espécies de begomovírus (Figura 2).

1165 O clone BR:Goi2:10A obtido de *W. indica* e os clones BR:Fle1:10A,  
1166 BR:Fle2:10A, BR:Fle3:10A e BR:Fle4:10A obtidos de *T. semitriloba* corresponderam  
1167 ao isolado de Sida mottle Alagoas virus (SiMoAV JX871388), com 90% de identidade.  
1168 Os isolados BR:Jar1:10A, BR:Deg3:10A e BR:Deg4:10A obtidos de *S. paniculatum*  
1169 corresponderam ao Sida yellow mosaic Alagoas virus (SiYMAV JX871383) com 89%.  
1170 O clone BR:Mac7:10A obtido de *H. crispera* (Figura 1C) representa uma nova espécie  
1171 que está mais relacionada ao SiMoAV (JX871384) com 87% de identidade, para o qual  
1172 foi proposto o nome Herissantia yellow mosaic virus (HeYMV). Os clones  
1173 BR:Msj1:10A e BR:Msj1:10B obtidos de *Triumfetta* sp. (Figura 1B), também  
1174 correspondem a uma nova espécie, sendo esta mais relacionada (83% de identidade)  
1175 com dois begomovírus brasileiros de *Sida* spp., *Sida mottle virus* (SiMoV NC\_004637),  
1176 *Sida yellow net virus* (SiYNV JX871376) e com um isolado obtido de tomateiro  
1177 *Tomato yellow spot virus* (ToYSV NC\_007726), para o qual foi proposto o nome  
1178 *Triumfetta yellow mosaic virus* (TrYMV). A terceira nova espécie representada pelos  
1179 clones BR:Bsm1:12A, BR:Bsm1:12B, BR:Bsm2:12A e BR:Bsm2:12B obtidos a partir  
1180 de *Pavonia* sp. (Figura 1D), está mais intimamente relacionada com o Abutilon Brazil  
1181 virus (AbBV), com 88% de identidade, para o qual foi proposto o nome *Pavonia yellow*  
1182 *net virus* (PaYNV).

1183 A organização genômica dos novos vírus descritos neste trabalho apresentou  
1184 características típicas de begomovírus bissegmentados do “Novo Mundo”, com cinco ou  
1185 seis ORFs no DNA-A e duas no DNA-B (Tabela 3). A maioria dos clones apresentaram  
1186 na região comum (RC) o nonanucleotídeo conservado (5'TAATATT/AC3') que faz  
1187 parte do stem-loop que contém a origem de replicação da grande maioria dos  
1188 geminivírus, com exceção de BR:Msj1:10A e BR:Msj1:10B que apresentaram um  
1189 nonanucleotídeo distinto (5'-TAGTATTAC-3'). Esse nonanucleotídeo é tipicamente



1190 predominante em membros do gênero *Nanovirus* (família *Nanoviridae*), em DNAs  
1191 satélites associados à begomovírus do “Velho Mundo” e também em vírus que infectam  
1192 vertebrados das famílias *Circoviridae* e *Anelloviridae* (King et al., 2012). O  
1193 nonanucleotídeo (5'-TAGTATTAC-3') já foi relatado no Brasil em uma nova espécie  
1194 de begomovírus, *Malvaviscus yellow mosaic virus* (MIYMV), obtido de uma malvacea  
1195 ornamental (Lima et al., 2010).

1196       Esse resultado indica que a diversidade dos begomovírus de malváceas daninhas  
1197 obtidos nesse trabalho é alta. Vários estudos revelaram que a exemplo do que ocorre  
1198 com plantas cultivadas, a diversidade de espécies de begomovírus associadas a plantas  
1199 daninhas é elevada, sobretudo àquelas pertencentes às famílias *Malvaceae*, *Solanaceae* e  
1200 *Fabaceae* (Castillo-Urquiza et al., 2008; Paprotka et al., 2010b; Silva et al., 2012;  
1201 Tavares et al., 2012). Dentre as malváceas consideradas plantas daninhas, destacam-se  
1202 os representantes do gênero *Sida*, para o qual somente no Brasil, já foram relatados mais  
1203 de 10 espécies de begomovírus, muitas dos quais capazes de infectar plantas cultivadas  
1204 (Castillo-Urquiza et al., 2008 e 2010). As espécies SiMoAV e SiYMAV descritas  
1205 anteriormente apenas em *Sida* spp. nos estados de Alagoas e/ou Minas Gerais (Tavares  
1206 et al., 2012), foram encontradas nesse trabalho infectando naturalmente três outras  
1207 malváceas daninhas (Tabela 2). As espécies *W. indica*, *H. crispa*, *S. paniculatum*, *T.*  
1208 *semitriloba* já foram anteriormente relatadas como hospedeiras de begomovírus  
1209 (Assunção et al., 2006), no entanto a identidade dos begomovírus associados a estas  
1210 espécies até o momento não tinha sido determinada. Por outro lado, *S. rhombifolia* é  
1211 uma hospedeira bem conhecida de vários begomovírus (Fernandes et al., 1999; Castillo-  
1212 Urquiza et al., 2008).

1213       Para determinar o relacionamento filogenético dos begomovírus desse trabalho e  
1214 outros begomovírus da América do Sul, uma árvore baseada na sequência completa do  
1215 DNA-A foi construída utilizando o método Neighbor-joining. Os begomovírus que  
1216 infectam malváceas daninhas em Alagoas, Bahia e Pernambuco foram distribuídos em  
1217 quatro grupos distintos (Figura 3).

1218       No grupo I os clones BR:Fle1:10A, BR:Fle2:10A, BR:Fle3:10A e BR:Fle4:10A,  
1219 todos de *T. semitriloba*, foram mais relacionados a nova espécie HeYMV  
1220 (BR:Mac7:10A) obtida de *H. crispa*. Esses resultados discordam das análises de  
1221 comparações par a par de nucleotídeos, nas quais esses isolados corresponderam a

1222 espécie SiMoAV (Figura 2). O clone BR:Goi2:10A, como esperado, agrupou com 99%  
1223 de probabilidade com SiMoAV, corroborando os resultados da análise par a par.

1224 O clone BR:Msj:10A, obtido de *Triumfetta* sp., foi incluído no grupo III, sendo  
1225 mais próximo do Sida mosaic Brazil virus (SiMBV), Nicandra deforming necrosis virus  
1226 (NDNV) e Tomato leaf distortion virus (ToLDV). No entanto na análise par a par, este  
1227 clone foi mais relacionado a outras três espécies que infectam *Sida* spp. e o tomateiro  
1228 (Figura 2).

1229 Inserida no grupo IV, a nova espécie, PaYNV (BR:Bsm1:12A e BR:Bsm1:12A)  
1230 agrupou com 100% de *bootstrap* com as espécies Abutilon Brasil virus (AbBV) e  
1231 Abutilon mosaic Brasil virus (AbMBV), espécies filogeneticamente mais relacionadas a  
1232 begomovírus da América Central (Paprotka et al., 2010b). Outros begomovírus  
1233 brasileiros, os quais também estão incluídos no grupo IV, como Euphorbia yellow  
1234 mosaic virus (EuYMV), Sida yellow leaf curl virus (SiYLCV) e Tomato common  
1235 mosaic virus (ToCmMV), foram relatados ser mais relacionados àqueles begomovírus  
1236 que ocorrem nas Américas Central e do Norte (Castillo-Urquiza et al., 2008; Silva et al.,  
1237 2012; Tavares et al., 2012).

1238 No grupo V, os clones BR:Jar1:10A, BR:Deg3:10A e BR:De4:10A agruparam  
1239 com SiYMAV apresentando 99% de probabilidade, confirmando os resultados da  
1240 análise par a par.

1241 A análise com base em Neighbor-joining revelou que o relacionamento  
1242 filogenético dos isolados de begomovírus desse trabalho, em alguns casos, não  
1243 corrobora com os resultados encontrados na análise de comparações par a par de  
1244 sequências (Figuras 2 e 3). No entanto, estas inconsistências indicam que estes vírus  
1245 podem recombinantes. Uma característica das malváceas é que muitas de suas espécies,  
1246 incluindo *T. semitriloba* e *W. indica*, são subarbustos perenes, ou seja, plantas de ciclo  
1247 longo e que podem sobreviver por meio de rizomas (Lorenzi, 2008), o que favorece a  
1248 ocorrência de infecções mistas, importante fator que contribui para o surgimento de  
1249 novas espécies de begomovírus via recombinação e pseudo-recombinação (Castillo-  
1250 Urquiza et al., 2008; Fernandes et al., 2009).

1251

1252

1253

## 1254 **Análises de Recombinação**

1255 A análise de filogenia reticulada inferida pelo método Neighbor-net para  
1256 investigar a presença de recombinação entre os isolados provenientes das malváceas  
1257 daninhas desse trabalho e de todos os outros begomovírus brasileiros, revelou  
1258 evidências claras de múltiplos eventos de recombinação (Figura 4). Fortes evidências de  
1259 recombinação foram encontradas para o grupo I englobando as espécies SiMoAV  
1260 (BR:Fle1:10A, BR:Fle:10A, BR:Fle3:10A, BR:Fle4:10A e BR:Goi2:10A), HeYMV  
1261 (BR:Mac7:10A) e PaYNV (BR:Bsm1:12A e BR:Bsm2:12A) (Figura 4). Estas  
1262 evidências foram, sobretudo, reforçadas pela inconsistência filogenética observada para  
1263 os cinco isolados da espécie SiMoAV. Estes, mesmo pertencendo à mesma espécie,  
1264 sempre agrupam separadamente independente do tipo de análise filogenética utilizada  
1265 (Figuras 3 e 4). Outra evidência de recombinação foi observada para os isolados de  
1266 SiYMAV (BR:Deg3:10A, BR:Deg4:10A e BR:Jar1:10A). Apenas fracas evidências  
1267 foram observadas para o grupo IV o qual inclui o isolado de TrYMV (BR:Msj1:10A).

1268 O mesmo grupo de amostras foi submetido à análise ao programa RDP3 (Martin  
1269 et al., 2010) para confirmar os prováveis eventos de recombinação identificados pela  
1270 análise Neighbor-net. Para excluir sinais de recombinação não confiáveis apenas  
1271 eventos suportados por ao menos quatro diferentes métodos foram selecionados.  
1272 Nenhuma evidência para eventos de recombinação intraespecíficos foi observada para  
1273 as espécies de begomovírus descritas nesse trabalho. No entanto, esta análise forneceu  
1274 fortes evidências para ocorrência de ao menos sete eventos de recombinação  
1275 interespecíficas, os quais identificaram begomovírus provenientes de *Sida* spp. e  
1276 tomateiro como prováveis parentais. (Tabela 4).

1277 Um evento de recombinação foi detectado envolvendo a espécie HeYMV  
1278 (BR:Mac7:10A), com breakpoint nos genes *CP* e *TrAp* e identificando o SiMoAV como  
1279 possível parental (Tabela 4). A proximidade entre HeYMV e SiMoAV foi confirmada  
1280 por ambas análises filogenéticas, nas quais as duas espécies sempre ocuparam o mesmo  
1281 grupo (Figuras 3 e 4). Um evento de recombinação foi detectado para os clones  
1282 BR:Fle1:10A, BR:Fle2:10A, BR:Fle3:10A e BR:Fle4:10A, os quais pertencem a  
1283 espécie SiMoAV, envolvendo o gene *Rep* e a região comum (RC), tendo *Tomato golden*  
1284 *mosaic virus* (TGMV), como um dos prováveis parentais (Tabela 4). Dois eventos de  
1285 recombinação, um envolvendo o gene *CP* e outro, o gene *Rep* foram também

1286 encontrados para os três isolados de SiYMAV (BR:Deg3:10A, BR:Deg4:10A e  
1287 BR:Jar1:10A), os quais apontaram para as espécies Sida common mosaic virus  
1288 (SiCmMV) e Tomato leaf distortion virus (ToLDV) como parentais mais prováveis,  
1289 respectivamente. As análises filogenéticas revelaram que SiCmMV, é proximamente  
1290 relacionada a SiYMAV (Figura 3 e 4). A espécie PaYNV (BR:Bms1:12A e  
1291 BR:Bms1:12A), apresentou um único evento de recombinação, ocorrendo no gene *Rep*  
1292 e *RC*, tendo a espécie Sida yellow blotch virus (SiYBV) como seu provável parental  
1293 (Tabela 4). Por fim, o TrYMV (BR:Msj1:10A) também apresentou um evento de  
1294 recombinação que inclui o gene *Rep* e *RC*, identificando como espécie parental mais  
1295 provável o SiYMAV (Tabela 4).

1296       Eventos de recombinação são de ocorrência comum em geminivírus (Padidam,  
1297 et al., 1999; Lefreuve et al., 2007b), e parece contribuir grandemente para a  
1298 diversificação genética dos begomovírus, aumentando seu potencial evolutivo e  
1299 adaptação local (Berrie, et al., 2001; Monci et al., 2002). Os resultados das análises  
1300 RDP3 revelaram que eventos de recombinação são amplamente disseminados entre as  
1301 espécies descritas nesse trabalho, assim como ocorre para outros begomovírus  
1302 brasileiros que infectam plantas cultivadas e daninhas (Inoue-Nagata et al., 2006;  
1303 Ribeiro et al., 2007; Albuquerque et al., 2012; Silva et al., 2012 e Tavares et al., 2012).

1304       A maioria dos eventos de recombinação apresentaram breakpoints localizados  
1305 nos genes *Rep*, *REn* e *RC*, corroborando com estudos anteriores os quais identificaram  
1306 ambas as regiões como hot-spots (Lefreuve et al, 2007a). Apesar da ocorrência menos  
1307 frequente, breakpoints também foram detectados no gene *CP*. Embora as regiões  
1308 codificadoras sejam menos suscetíveis a recombinação, a região que codifica para o  
1309 gene *CP* têm sido demonstrada conter hot-spots (Lefreuve et al, 2007b; Garcia-Andrés  
1310 et al., 2007; Silva et al., 2011; Silva et al., 2012; Tavares et al., 2012).

1311       Adicionalmente, foi observado que eventos de recombinação 1 e 4 (Tabela 4)  
1312 envolvendo as espécies SiMoAV e PaYNV, obtidas de *T. semitriloba* e *Pavonia* sp.,  
1313 desse trabalho, apresentaram vírus que infectam tomateiro (TGMV e ToLDV) como  
1314 possíveis parentais. Esse resultado é interessante, já que a grande maioria dos eventos  
1315 de recombinação que envolve vírus que infectam hospedeiras daninhas e/ou silvestres  
1316 detectam como parentais outros vírus obtidos de plantas daninhas e/ou silvestres (Silva  
1317 et al., 2011 e 2012; Tavares et al., 2012). Esses resultados fornecem evidências

1318 adicionais que indicam que os vírus de tomateiro atualmente presente no campo têm  
1319 evoluído a partir de vírus que infectam hospedeiras silvestres e/ou daninhas, a exemplo  
1320 de *Sida* spp. A detecção de Tomato mild mosaic virus (ToMMV) e *Sida micrantha*  
1321 mosaic virus (SiMMV) ocorrendo tanto em tomateiro como em *Sida* spp. suportam esta  
1322 hipótese (Castillo-Urquiza et al., 2010).

1323       Nossos resultados indicam que as malváceas daninhas *H. crispa*, *Pavonia* sp., *S.*  
1324 *paniculatum*, *Triumfetta* spp. e *Waltheria*, constituem importantes reservatórios de  
1325 begomovírus e que eventos de recombinação tem aparentemente contribuído para o  
1326 surgimento de novas espécies nessas hospedeiras. No entanto, estudos adicionais são  
1327 necessários para determinar a importância dessas espécies como fonte de begomovírus  
1328 para plantas cultivadas.

1329

1330

1331

1332

1333

1334

1335

1336

1337

1338

1339

1340

1341

1342

## LITERATURA CITADA

1343

1344

1345 ALBUQUERQUE, L.C. et al. Further characterization of tomato-infecting  
1346 begomoviruses in Brazil. **Archives of Virology**, New York, v. 157, p. 747–752,  
1347 2012.

1348

1349 ARANHA S.A. et al. Detection and complete genome characterization of a  
1350 begomovirus infecting okra (*Abelmoschus esculentus*) in Brazil. **Tropical Plant**  
1351 **Pathology**, v. 36, p. 14-20, 2011.

1352

1353 ASSUNÇÃO, I. P. et al. Genetic diversity of begomovirus infecting weeds in  
1354 Northeastern Brazil. **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v. 24, p. 239–244, 1102,  
1355 2006.

1356

1357 BERRIE, L.C.; RYBICKI, E.P.; REY, M.E. Complete nucleotide sequence and host  
1358 range of South African cassava mosaic virus: further evidence for recombination  
1359 amongst begomoviruses. **Journal of General Virology**, London, v. 82, p. 53-58.,  
1360 2001.

1361

1362 CASTILLO-URQUIZA, G. P. et al. Six novel begomoviruses infecting tomato and  
1363 associated weeds in Southeastern Brazil. **Archives of Virology**, New York, v. 153,  
1364 p. 1985-1989, 2008.

1365

1366 CASTILLO-URQUIZA, G.P. et al. Genetic structure of tomato-infecting  
1367 begomovirus populations in two tomato-growing regions of Southeastern Brazil. In:  
1368 Program and Abstracts, **6th International Geminivirus Symposium and 4<sup>th</sup>**  
1369 **International ssDNA Comparative Virology Workshop**, Guanajuato, Mexico.  
1370 2010.

1371

1372 DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities  
1373 of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

1374

1375 FARIA, J.C. et al. Situação atual das geminiviroses no Brasil. **Fitopatologia**  
1376 **Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 125-137, 2000.  
1377  
1378 FAUQUET, C. M.; STANLEY, T. J. Revising the way we conceive and name  
1379 viruses below the species level: a review of geminivirus taxonomy calls for new  
1380 standardized isolate descriptors. **Archives of Virology**, v. 150, p. 2151-2179, 2005.  
1381  
1382 FERNANDES, A.V. et al. Cloning and molecular characterization of A components  
1383 of two new *Sida rhombifolia*-infecting geminiviruses. **Virus Reviews and**  
1384 **Research**, Belo Horizonte, v. 4, p. 148, 1999.  
1385  
1386 FERNANDES, F.R. et al. Three distinct begomoviruses associated with soybean in  
1387 central Brazil. **Archives of Virology**, New York, v. 154, p. 1567-1570, 2009.  
1388  
1389 GARCIA-ANDRÉS, S. et al. Frequent occurrence of recombinants in mixed  
1390 infections of tomato yellow leaf curl disease-associated begomoviruses. **Virology**,  
1391 New York, v. 365, p. 210-219, 2007.  
1392  
1393 GRAHAM, A.P.; MARTIN, D.P.; ROYE, M.E. Molecular characterization and  
1394 phylogeny of two begomoviruses infecting *Malvastrum americanum* in Jamaica:  
1395 Evidence of the contribution of inter-species recombination to the evolution of  
1396 malvaceous weed-associated begomoviruses from the Northern Caribbean. **Virus**  
1397 **Genes**, v. 40, p. 256-266, 2010.  
1398  
1399 HUSON, D.H.; BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary  
1400 studies. **Mol. Biol. Evol.**, v. 23, p. 254–267, 2006.  
1401  
1402 ILYAS, M. et al. Genetic diversity and phylogeography of begomoviruses infecting  
1403 legumes in Pakistan. **Journal General Virology**, v. 91, p. 2091-2101, 2010.  
1404

1405 INOUE-NAGATA, A. K. et al. A simple method for cloning the complete  
1406 begomovirus genome using the bacteriophage  $\phi$ 29 DNA polymerase. **Journal of**  
1407 **Virological Methods**, v. 116, p. 209-211, 2004.

1408

1409 INOUE-NAGATA, A.K. et al. New species emergence via recombination among  
1410 isolates of the Brazilian tomato infecting Begomovirus complex. **Pesquisa**  
1411 **Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 41, p. 1329-1332, 2006.

1412

1413 JOVEL, J. et al. *Sida micrantha* mosaic is associated with a complex infection of  
1414 begomoviruses different from *Abutilon mosaic virus*. **Archives of Virology**, v.149,  
1415 p. 829-841, 2004.

1416

1417 KING, A.M.Q. et al. E.J. **Ninth Report of the International Committee on**  
1418 **Taxonomy of Viruses**, 2012. 1327p.

1419

1420 LEFEUVRE, P. et al. Avoidance of protein fold disruption in natural virus  
1421 recombinants. **PLoS Pathogen**, Cambridge, v. 3, p. e181, 2007a.

1422

1423 LEFEUVRE, et al. Begomovirus 'melting pot' in the south-west Indian Ocean  
1424 islands: Molecular diversity and evolution through recombination. **Journal of**  
1425 **General Virology**, v. 88, p. 3458-3468, 2007b.

1426

1427 LIMA, A.T.M. et al. Molecular characterization and phylogenetic relationships of  
1428 two novel begomoviruses infecting weeds in Brazil. **6th International**  
1429 **Geminivirus Symposium**, México, 2010.

1430

1431 LORENZI, H. **Plantas daninhas no Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e**  
1432 **tóxicas**. 4. Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 640p.

1433

1434 MARTIN, D. P. et al. RDP3: A flexible and fast computer program for analyzing  
1435 recombination. **Bioinformatics**, v. 26, n.19, p. 2462-2463, 2010.

1436



1437 MONCI, F. et al. A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow*  
1438 *leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel  
1439 pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. **Virology**,  
1440 New York, v. 303, p. 317-326, 2002.

1441

1442 MORALES, F. J. History and current distribution of begomoviruses in Latin  
1443 America. **Advances in Virus Research**, v. 67, p. 127–162, 2006.

1444

1445 PADIDAM, M.; BEACHY, R.N.; FAUQUET, C.M. A phage single-stranded DNA  
1446 (ssDNA) binding protein complements ssDNA accumulation of a geminivirus and  
1447 interferes with viral movement. **Journal of Virology**, Washington, v. 73, p. 1609-  
1448 1616, 1999.

1449

1450 PAPROTKA, T. et al. Genomic diversity of sweet potato geminiviruses in a  
1451 Brazilian germplasm bank. **Virus Res**, v. 149, p. 224-233, 2010a.

1452

1453 PAPROTKA, T.; METZLER, V.; JESKE, H. The complete nucleotide sequence of  
1454 a new bipartite begomovirus from Brazil infecting Abutilon. **Archives of Virology**,  
1455 v. 155, p. 813-816, 2010b.

1456

1457 RIBEIRO, S.G. et al. Widespread occurrence of tomato geminiviruses in Brazil,  
1458 associated with the new biotype of the whitefly vector. **Plant Disease**, Saint Paul, v.  
1459 82, p. 830, 1998.

1460

1461 RIBEIRO, S.G. et al. Molecular and biological characterization of *Tomato chlorotic*  
1462 *mottle virus* suggests that recombination underlies the evolution and diversity of  
1463 Brazilian tomato begomoviruses. **Phytopathology**, v. 97, p. 702-711, 2007.

1464

1465 ROJAS, M.R. et al. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to  
1466 detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Dis**, v. 77, p. 340–347, 1993.

1467

1468 SILVA, S.J.C. et al. High genetic variability and recombination in a begomovirus  
1469 population infecting the ubiquitous weed *Cleome affinis* in northeastern Brazil.  
1470 **Arch Virol**, v. 156, p. 2205–2213, 2011.

1471

1472 SILVA, S.J.C. et al. Species diversity, phylogeny and genetic variability of  
1473 begomovirus populations infecting leguminous weeds in northeastern Brazil. **Plant**  
1474 **Pathol**, v. 61, p. 457–467, 2012.

1475

1476 TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using  
1477 maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods.  
1478 **Molec. Biol. Evol.**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

1479

1480 TAVARES, S.S. et al. Further molecular characterization of weed-associated  
1481 begomoviruses in brazil with an emphasis on *Sida* spp. **Planta Daninha**, v. 30, p.  
1482 305-315, 2012.

1483

1484

1485

1486

1487

1488

1489

1490

1491

1492

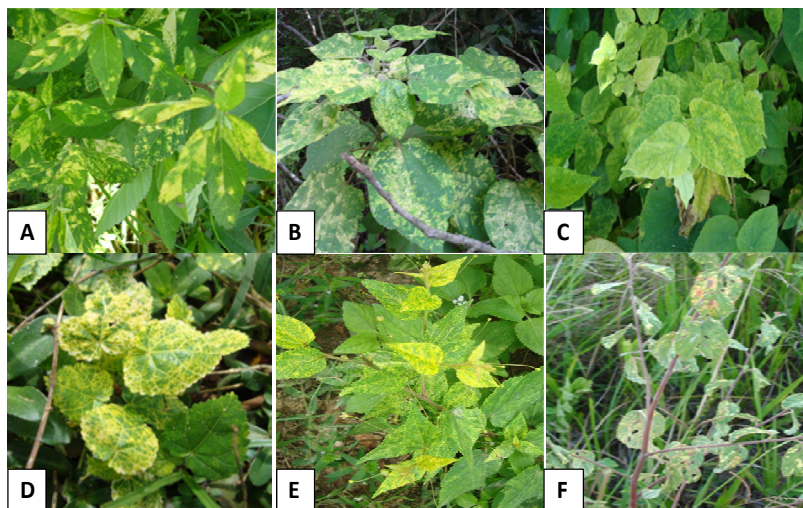
1493

1494

1495

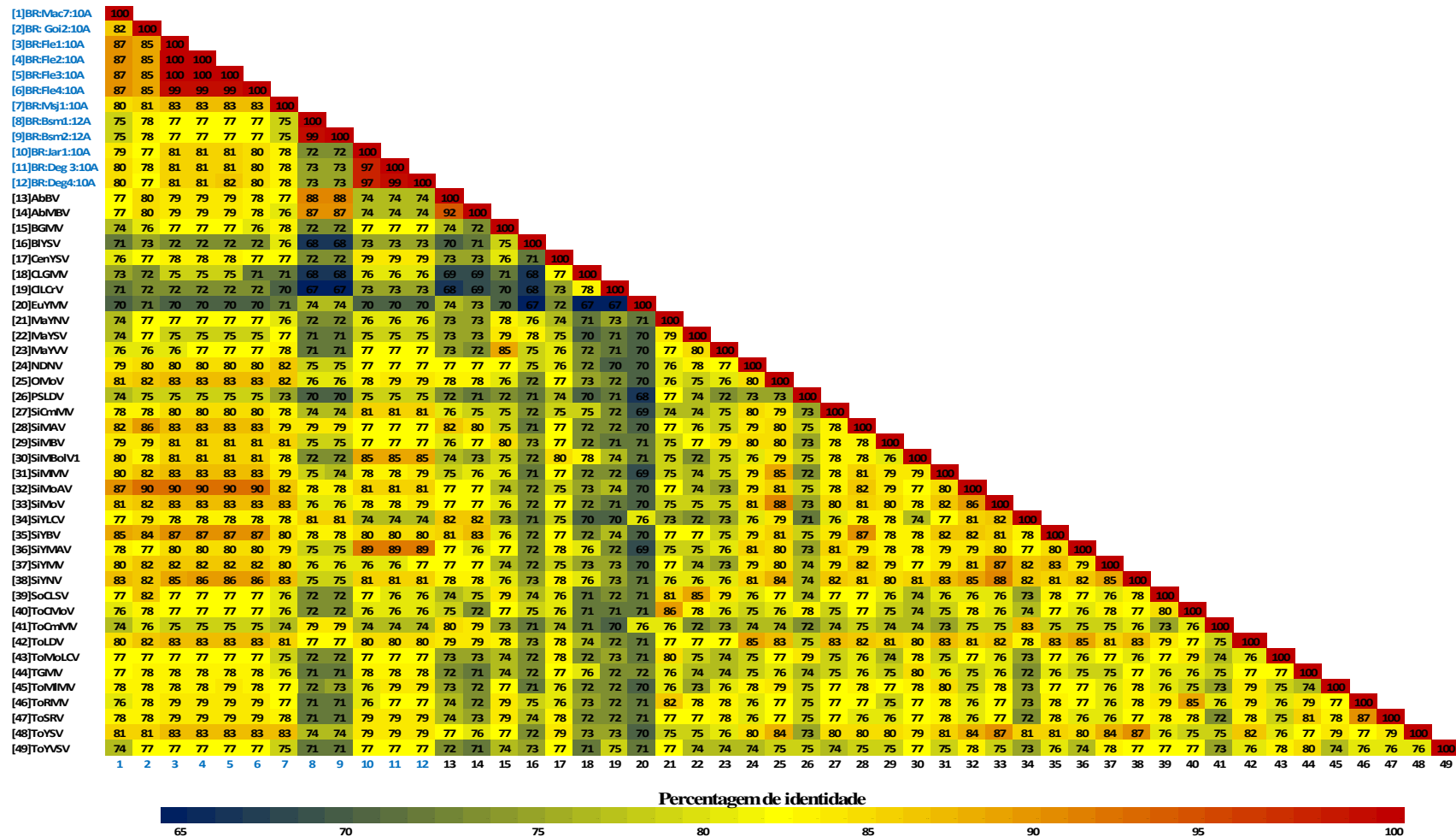
1496

1497



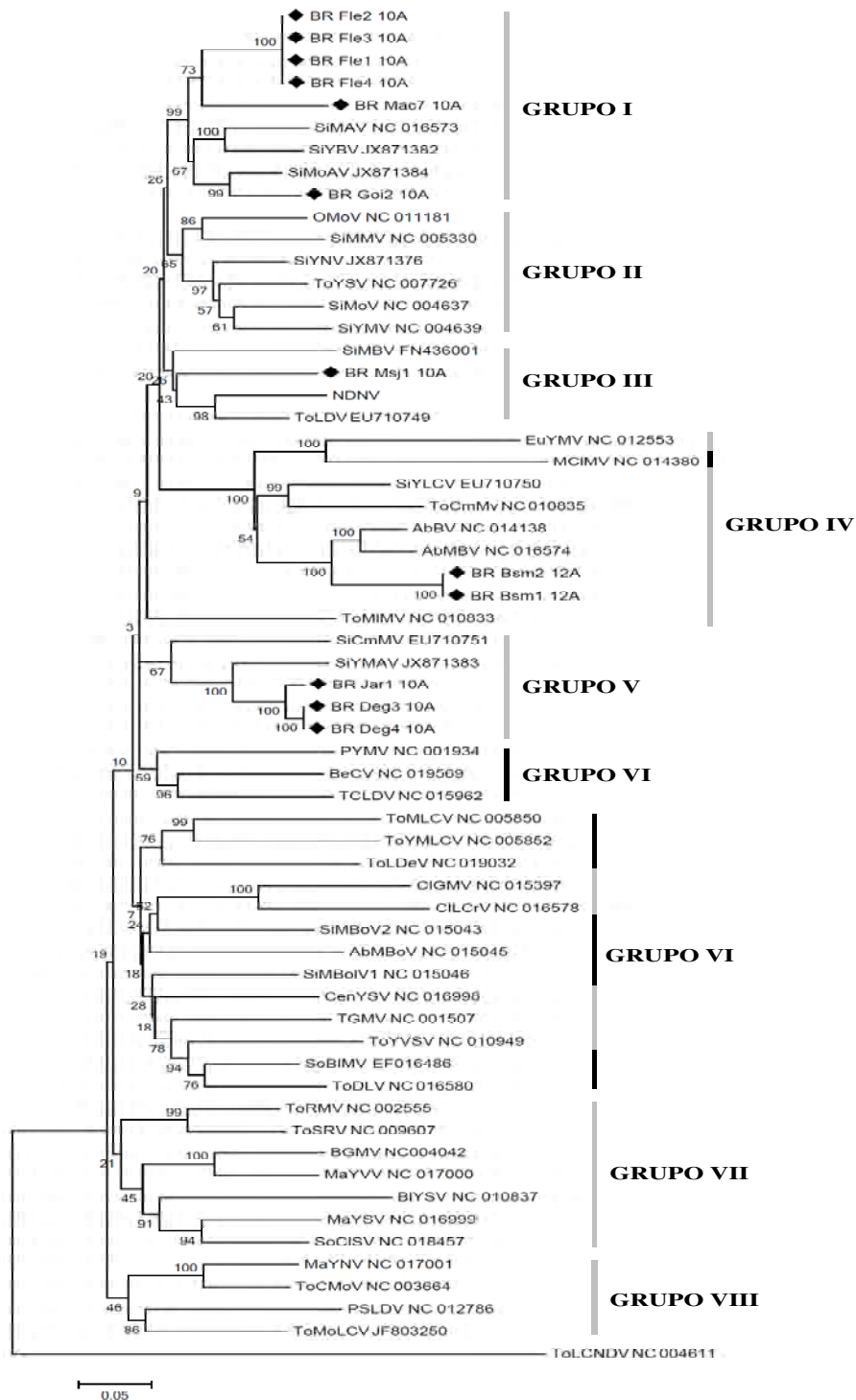
1498  
 1499  
 1500  
 1501  
 1502  
 1503  
 1504  
 1505  
 1506  
 1507  
 1508  
~~1509~~  
 1510  
 1511  
  
 1512  
 1513  
  
 1514  
  
 1515  
  
 1516  
  
 1517  
  
 1518  
  
 1519  
  
 1520  
  
 1521

**Figura 1** – Plantas daninhas apresentando sintomas de mosaico amarelo e clorose de nervuras, típicos de infecção por begomovírus. (A) Amostra de *Sida rhombifolia* da qual foi obtido o clone BR:BR:Rla1:11B; (B) Amostra de *Triumfetta sp.* da qual foram obtidos os clones BR:Msj1:10A e BR:Msj2:10B (Triumfetta yellow mosaic virus); (C) Amostra de *Herissantia crisper* da qual foi obtido o clone BR:Mac7:10A (Herissantia yellow mosaic virus) ; (D) Amostra de *Pavonia sp.* da qual foram obtidos os clones BR:Bsm1:12A, BR:Bsm2:12A, BR:Bsm3:12B e BR:Bsm4:12B (Pavonia yellow net virus); (E) Amostra de *Sidastrum paniculatum* da qual foram obtidos os clones BR:Deg3:10A e BR:Deg4:10A (Sida yellow mosaic Alagoas virus); (F) Amostra de *Waltheria indica* da qual foi obtido o clone BR:Mac8:10B.



1523  
1524  
1525  
1526

Figura 2 – Gráfico bidimensional representando comparações par a par de sequências de nucleotídeos completas do DNA-A dos begomovírus descritos neste trabalho e outros begomovírus descritos anteriormente no Brasil.

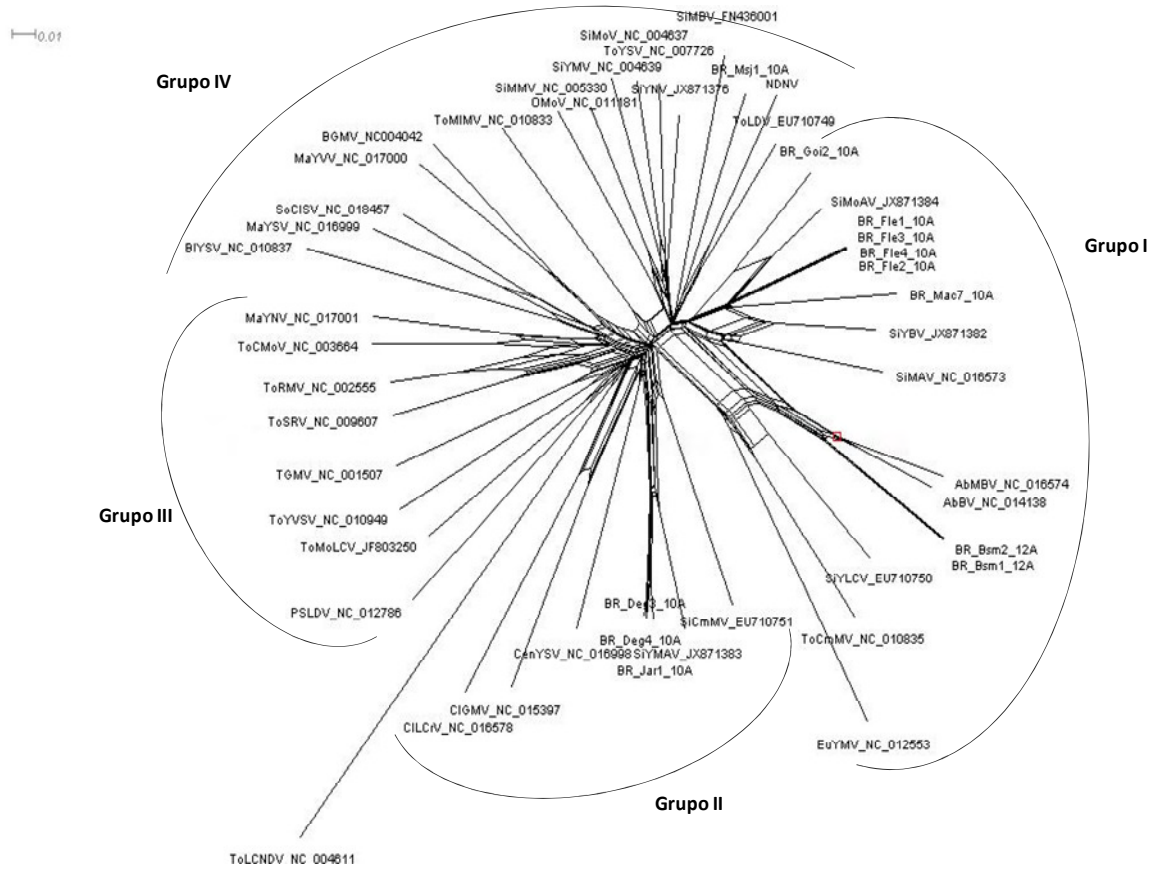


1527

1528 **Figura 3** – Árvore filogenética baseada no alinhamento da sequência completa do DNA-A das malváceas  
 1529 daninhas de Alagoas, Bahia e Pernambuco e outros begomovírus da América do Sul, incluindo o Brasil.  
 1530 A árvore foi construída com o MEGA 5.05 utilizando o método Neighbor-joining, e a confiabilidade de  
 1531 cada ramo verificada com *bootstrap* de 10,000 replicações. O *Tomato leaf curl New Delhi virus*  
 1532 (ToLCNDV), foi utilizado como *outgroup*. O marcador preto indicam os isolados desse trabalho; As  
 1533 barras cinza e preta delimitam os begomovírus do Brasil e América do Sul, respectivamente.

1534

1535



1536

1537

1538

1539

1540

1541

1542

1543

1544

1545

1546

1547

1548

1549

1550

1551

1552

**Figura 4** – Evidência filogenética de recombinação entre isolados de begomovírus de malváceas daninhas estudados neste trabalho e de outros begomovírus anteriormente descritos no Brasil. A análise de Neighbor-net foi realizada utilizando Splits Tree 4.

Vírus	Acrônimo	Nº de acesso do GenBank
<b>Brasil</b>		
Abutilon Brazil virus	AbBV	NC_014138
Abutilon mosaic Brazil virus	AbMBV	NC_016574
<i>Bean golden mosaic virus</i>	BGMV	NC_004042
Blainvillea yellow spot virus	BIYSV	NC_010837
Centrosema yellow spot virus	CenYSV	NC_016998
Cleome golden mosaic virus	CIGMV	NC_015397
Cleome leaf crumple virus	CILCrV	NC_016578
Euphorbia yellow mosaic virus	EuYMV	NC_012553
Macroptilium yellow net virus	MaYNV	NC_017001
Macroptilium yellow spot virus	MaYSV	NC_016999
Macroptilium yellow vein virus	MaYVV	NC_017000
Nicandra deforming necrosis virus	NDNV	n.d*
Okra mottle virus	OMoV	NC_011181
Passionfruit severe leaf distortion virus	PSLDV	NC_012786
Sida common mosaic virus	SiCmMV	EU710751
<i>Sida micrantha mosaic virus</i>	SiMMV	NC_005330
Sida mosaic Alagoas virus	SiMAV	NC_016573
Sida mosaic Brazil virus	SiMBV	FN436001
Sida mottle Alagoas virus	SiMoAV	JX871384
<i>Sida mottle virus</i>	SiMoV	NC_004637
Sida yellow blotch virus	SiYBV	JX871382
Sida yellow mosaic Alagoas virus	SiYMAV	JX871383
<i>Sida yellow mosaic virus</i>	SiYMV	NC_004639
<i>Sida yellow leaf curl virus</i>	SiYLCV	EU710750
Sida yellow net virus	SiYNV	JX871376
Soybean chlorotic spot virus	SoCISV	NC_018457
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i>	ToCMoV	NC_003664
Tomato common mosaic virus	ToCmMV	NC_010835
<i>Tomato golden mosaic virus</i>	TGMV	NC_001507
Tomato leaf distortion virus	ToLDV	EU710749
Tomato mild mosaic virus	ToMIMV	NC_010833
Tomato mottle leaf curl virus	ToMoLCV	JF803250
<i>Tomato rugose mosaic virus</i>	ToRMV	NC_002555
<i>Tomato severe rugose virus</i>	ToSRV	NC_009607
<i>Tomato yellow spot virus</i>	ToYSV	NC_007726
<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	ToYVSV	NC_010949
<b>América do Sul</b>		
Abutilon mosaic Bolivia virus	AbMBoV	NC_015045
Bean chlorosis virus	BeCV	NC_019569
Melon chlorotic mosaic virus	MCIMV	NC_014380
<i>Potato yellow mosaic virus</i>	PYMV	NC_001934
Sida mosaic Bolivia vírus 1	SiMBoV1	NC_015046
Sida mosaic Bolivia vírus 2	SiMBoV2	NC_015043
<i>Soybean blistering mosaic virus</i>	SoBIMV	EF016486
Tomato chlorotic leaf distortion virus	TCLDV	NC_015962
Tomato dwarf leaf virus	ToDLV	NC_016580
Tomato leaf deformation virus	ToLDeV	NC_019032
Tomato mosaic leaf curl virus	ToMLCV	NC_005850
<i>Tomato yellow margin leaf curl virus</i>	ToYMLCV	NC_005852
<b>Outgroup</b>		
<i>Tomato leaf curl New Delhi virus</i>	ToLCNDV	NC_004611

1554 **Tabela 2** – Clones completamente sequenciados correspondentes aos componentes DNA-A e DNA-B  
 1555 obtidos de plantas daninhas da família Malvaceae coletadas nos estados de Alagoas (AL), Pernambuco  
 1556 (PE) e Bahia (BA)  
 1557

Hospedeira	Local	Ano	Clone		Espécies (Acrônimo)*
			DNA-B	DNA-B	
<i>Herissantia crispa</i>	Maceió – AL	2010	BR:Mac7:10A		HeYMV <sup>(novo)</sup>
<i>Waltheria indica</i>	Goiana – PE	2010	BR:Goi2:10A		SiMoAV
<i>Waltheria indica</i>	Maceió – AL	2010		BR:Mac8:10B	
<i>Sidastrum paniculatum</i>	Jaramataia – AL	2010	BR:Jar1:10A		SiYMAV
<i>Sidastrum paniculatum</i>	Delmiro Gouveia – AL	2010	BR:Deg3:10A BR:Deg4:10A		SiYMAV
<i>Triumfetta semitriloba</i>	Flexeiras – AL	2010	BR:Fle1:10A BR:Fle2:10A BR:Fle3:10A BR:Fle4:10A		SiMoAV
<i>Triumfetta sp.</i>	Mata de São João – BA	2010	BR:Msj1:10A	BR: Msj1:10B	TrYMV <sup>(novo)</sup>
<i>Sida rhombifolia</i>	Rio Largo – AL	2011		BR:Rla1:11B	
<i>Triumfetta semitriloba</i>	Caraíbas – BA	2011		BR:Cbs1:11B BR:Cbs2:11B BR:Cbs3:11B	
<i>Pavonia sp.</i>	Barra de São Miguel – AL	2012	BR:Bsm1:12A BR:Bsm2:12A	BR:Bsm1:12B BR:Bsm2:12B	PaYNV <sup>(novo)</sup>

1558

1559 \*HeYMV – Herissantia yellow mosaic virus; SiMoAV – Sida mottle Alagoas virus; SiYMAV – Sida  
 1560 yellow mosaic Alagoas virus; TrYMV – Triumfetta yellow mosaic virus; PaYNV – Pavonia yellow net  
 1561 virus.

1562

1563

1564

1565

1566

1567

1568

1569

1570

1571

1572

1573

1574

1575

1576



1577  
1578  
1579

**Tabela 3** - Open reading frames (ORFs), com seus respectivos números de aminoácidos (aa), encontrados no DNA-A e DNA-B das espécies de begomovírus descritos neste trabalho.

Clones	cp	rep	ren	trap	ac4	ac5	nsp	mp
BR:Fle1:10A	251aa	368aa	132aa	129aa	87aa	96aa		
BR:Fle2:10A	251aa	368aa	132aa	129aa	87aa	96aa		
BR:Fle3:10A	251aa	368aa	132aa	129aa	87aa	96aa		
BR:Fle4:10A	251aa	368aa	132aa	129aa	87aa	96aa		
BR:Mac 7:10A	251aa	402aa	132aa	129aa	85aa	-		
BR: Goi 2:10A	251aa	361aa	132aa	129aa	85aa	-		
BR:Jar1:10A	251aa	358aa	132aa	129aa	85aa	105aa		
BR:Deg 3:10A	251aa	358aa	132aa	129aa	85aa	105aa		
BR:Deg 4:10A	251aa	358aa	132aa	129aa	85aa	105aa		
BR:Msj1:10A	251aa	361aa	132aa	131aa	85aa	96aa		
BR:Msj2:10B							256aa	293aa
BR:Bsm1:12A	251aa	359aa	132aa	129aa	140aa	96aa		
BR:Bsm2:12A	251aa	359aa	132aa	129aa	140aa	96aa		
BR:Bsm3:12B							253aa	293aa
BR:Bsm4:12B							253aa	293aa
BR: Deg 4:10A							256aa	293aa
BR:Mac8:10B							256aa	293aa
BR:Cbs1:11B							268aa	293aa
BR:Cbs2:11B							268aa	293aa
BR:Cbs3:11B							268aa	293aa
BR:Rla1:11B							256aa	293aa

1580  
1581  
1582  
1583  
1584  
1585  
1586  
1587  
1588  
1589  
1590  
1591  
1592  
1593  
1594  
1595  
1596  
1597  
1598  
1599  
1600  
1601  
1602  
1603  
1604  
1605  
1606  
1607  
1608  
1609  
1610  
1611

1612

1613 **Tabela 4** – Eventos de recombinação detectados entre os begomovírus das malváceas daninhas descritas  
 1614 nesse trabalho e outros begomovírus previamente descritos no Brasil

1615

Evento	Recombinante	Parental		Breakpoints		Programas <sup>b</sup>	<i>p</i> -Valor <sup>c</sup>
		Maior	Menor	Início	Fim		
1	BR:Mac7:10A	SiMoAV	n.i. <sup>a</sup>	327	<u>1035</u>	RGMCS3S	1,7x10 <sup>-17</sup>
2	BR:Goi2:10A	SiYBV	n.i.	1993	49	RGMCS3S	1,0x10 <sup>-28</sup>
4	BR:Fle1:10A BR:Fle2:10A BR:Fle3:10A BR:Fle4:10A	TGMV	n.i.	<u>2311</u>	24	RBMCS3S	1,9x10 <sup>-04</sup>
5	BR:Deg3:10A BR:Deg4:10A BR:Jar1:10A	SiCmMV	n.i.	<u>30</u>	718	RGMCS3S	5,6x10 <sup>-14</sup>
6	BR:Deg3:10A BR:Deg4:10A BR:Jar1:10A	ToLDV	n.i.	1099	1743	RGMCS3S	7,2x10 <sup>-10</sup>
7	BR:Bsm1:12A BR:Bsm2:12A	SiYBV	n.i.	1485	142	RGBMCS3S	2,5x10 <sup>-39</sup>
8	BR:Msj1:10A	SiYMAV	n.i.	2336	63	RGMCS3S	2,5x10 <sup>-13</sup>

1616 <sup>a</sup>. Parental não identificado. <sup>b</sup>. Programas: R, RDP; G, GeneConv; B, Bootscan; M, MaxChi; C,  
 1617 CHIMAERA; S, SisScan e 3S, 3SEQ. C. Maior *p*-valor detectado pelo programa indicado por um  
 1618 sublinhado. Números sublinhados indicam que os Breakpoints não foram precisamente identificados.

1619

1620

1621

1622

1623

1624

1625

1626

1627

1628

1629

1630

1631

1632

1633

1634

1635

1636

1637

1638

1639

1640

1641

1642

## CAPÍTULO III

---

1643 **Caracterização Molecular de begomovirus associados a *Hyptis* sp. e**  
1644 ***Physalis* sp.**

1645

1646

1647

1648

1649

1650

1651

1652

1653

1654

1655

1656 **Caracterização Molecular de begomovirus associados a *Hyptis* sp. e**  
1657 ***Physalis* sp.**

1658 *Molecular characterization of begomovirus associated to *Hyptis* sp. and *Physalis* sp.*

1659

1660

1661

**RESUMO**

1662

1663 Plantas daninhas podem funcionar como reservatórios ou fontes de novas espécies de  
1664 begomovírus (Família *Geminiviridae*) as quais surgem a partir de eventos de  
1665 recombinação ou pseudo-recombinação. Portanto, esse estudo teve como objetivo  
1666 caracterizar os begomovírus associados a plantas daninhas das famílias Solanaceae  
1667 (*Physalis* sp.) e Lamiaceae (*Hyptis* sp.) e comprovar a ocorrência de recombinação entre  
1668 os isolados. Uma amostra de *Physalis* sp. e duas amostras de *Hyptis* sp. com sintomas  
1669 típicos de infecção por begomovírus, foram coletadas em Rio Largo, AL, entre 2010 e  
1670 2012. Um total de seis clones foram obtidos (cinco DNA-A e um DNA-B) por meio da  
1671 amplificação por círculo rolante (RCA) e posteriormente sequenciados. Análises das  
1672 sequências indicaram a presença de três novas espécies de begomovírus, duas  
1673 encontradas numa mesma amostra de *Hyptis* sp. e a outra encontrada inicialmente em  
1674 *Physalis* sp. e posteriormente detectada em *Hyptis* sp. Nas análises filogenéticas as três  
1675 novas espécies formaram um único ramo monofilético. As análises de recombinação  
1676 indicaram uma forte evidência de recombinação entre HyRMV1 e HyRMV2, tendo o  
1677 HyRMV1 como parental. O ToRMV foi identificado como possível parental para as  
1678 espécies HyRMV1 e PhYSV. Esses resultados indicam que as plantas daninhas dos  
1679 gêneros *Physalis* sp. e *Hyptis* sp. são importantes reservatórios de begomovírus e que  
1680 eventos de recombinação tem aparentemente contribuído para o surgimento de novas  
1681 espécies de vírus nessas hospedeiras.

1682

1683

1684 **Palavras-chave:** geminivírus, recombinação, *Physalis* sp., *Hyptis* sp.

1685

## ABSTRACT

1686

1687

1688 Weeds can act as reservoirs or source of new species of begomovirus (Geminiviridae  
1689 Family), which arise from recombination or pseudo-recombination events. Therefore,  
1690 this study aimed to characterize the begomovirus associated with weeds from  
1691 Solanaceae (*Physalis* sp.) and Lamiaceae (*Hyptis* sp.) family and to prove the  
1692 occurrence of recombination among the isolates. A sample of *Physalis* sp. and two  
1693 samples of *Hyptis* sp. with typical symptoms of begomovirus infection were collected in  
1694 Rio Largo, AL, in 2010 and 2012. A total of six clones were obtained (5 DNA-A and 1  
1695 DNA-B) by rolling circle amplification (RCA) and after they were sequenced. Analysis  
1696 of the sequences indicated the presence of three new species of begomovirus, from  
1697 which two were found in the same sample of *Hyptis* sp., the other was initially found on  
1698 *Physalis* sp. and it was subsequently detected on *Hyptis* sp. In the phylogenetic analyzes  
1699 the three new species formed a single monophyletic branch. The recombination  
1700 analyzes indicated a strong evidence of recombination between HyRMV1 and  
1701 HyRMV2, having as parental HyRMV1. The ToRMV was identified as a likely parental  
1702 to the HyRMV1 and PhYSV species. These results indicate that weeds from the  
1703 *Physalis* sp. and *Hyptis* sp. genera are major reservoirs of begomovirus and that  
1704 recombination events have apparently contributed to the emergence of new species of  
1705 virus in these hosts.

1706

1707

1708 **Keywords:** geminivirus, recombination, *Physalis* sp., *Hyptis* sp.

1709

1710

1711

1712

1713

1714

## INTRODUÇÃO

1715

1716

1717 Os Begomovírus, transmitidos por mosca-branca (*Bemisia tabaci*), tem se  
1718 tornado um importante fator limitante para produção de diversas culturas nas regiões  
1719 tropicais e subtropicais (Seal et al., 2006). Estes são membros da família *Geminiviridae*  
1720 a qual engloba vírus com genoma de ssDNA circular encapsidados em partículas  
1721 icosaédricas geminadas, podendo constituir de um ou dois componentes do genoma  
1722 (DNA-A e DNA-B), cada um com aproximadamente 2600 nucleotídeos (Rojas et al.,  
1723 2005; Stanley et al., 2005).

1724 Os dois componentes genômicos de uma mesma espécie viral não possuem  
1725 identidade entre as suas sequências, exceto por uma região com aproximadamente 200  
1726 nucleotídeos denominada região comum (RC), que inclui a origem de replicação  
1727 (Hanley-Bowdoin et al., 1999). O componente DNA-A do genoma dos begomovírus  
1728 monosegmentados e bissegmentados codifica para as funções necessárias para a  
1729 replicação do vírus, no controle da expressão gênica e na transmissão por insetos,  
1730 enquanto que o componente DNA-B codifica para duas proteínas necessárias para a  
1731 movimentação do vírus e o desenvolvimento dos sintomas nas plantas (Rojas et al.,  
1732 2005).

1733 Desde 1980, a incidência e severidade de doenças causadas por begomovírus em  
1734 culturas economicamente importantes, como feijão, tomate e pimentão têm aumentado  
1735 significativamente no Brasil e em outros países das Américas devido ao aumento  
1736 populacional da *B. tabaci* (Morales, 2006).

1737 Begomovírus também estão associados a uma ampla gama de plantas daninhas,  
1738 com destaque para as espécies que pertencem às famílias Euphorbiaceae, Fabaceae,  
1739 Malvaceae e Solanaceae (Frishmuth et al., 1997, Morales e Anderson, 2001; Andrade et  
1740 al., 2006). Essas espécies podem funcionar como reservatórios ou fontes de novas  
1741 espécies de begomovírus as quais surgem a partir de eventos de recombinação ou  
1742 pseudo-recombinação devido sua frequente co-infecção com mais de uma espécie viral  
1743 (Mubin et al., 2009).

1744 Infecções por mais de um begomovírus são comuns no campo, favorecendo a  
1745 recombinação e a pseudo-recombinação, o que pode levar ao surgimento de novas

1746 estirpes ou espécies mais adaptadas ao novo hospedeiro (Galvão et al., 2003; Castillo-  
1747 Urquiza et al., 2008; Chakraborty et al., 2008; Rocha et al., 2013).

1748 A recombinação parece contribuir fortemente para a diversidade genética dos  
1749 begomovírus, aumentando o potencial evolutivo (Graham et al., 2010; Monci et al.,  
1750 2002). Estudos anteriores indicaram uma alta diversidade intra e interespecífica entre os  
1751 begomovirus, o que pode facilitar a adaptação a novos climas e novos hospedeiros  
1752 (Monci et al., 2002).

1753 Existem atualmente vários relatos de begomovírus infectando plantas daninhas  
1754 no Brasil (Inoue-Nagata et al., 2006; Ribeiro et al., 2007; Castillo-Urquiza et al., 2008;  
1755 Graham et al., 2010; Tavares et al., 2012; Silva et al., 2011 e 2012; Paprotka et al.,  
1756 2010; Rocha et al., 2013). A caracterização molecular desses begomovírus é importante  
1757 para elucidar seu comportamento ecológico e evolutivo (Assunção et al., 2006), sendo  
1758 que o desenvolvimento de novos métodos de amplificação e clonagem de genomas  
1759 completos de vírus de DNA circular tem facilitado essa abordagem (Inoue-Nagata,  
1760 2004). Este trabalho teve como objetivos realizar a caracterização de isolados obtidos  
1761 de *Physalis* sp. e *Hyptis* sp. e verificar a ocorrência de recombinação entre os isolados.

1762

1763

1764

1765

1766

1767

1768

## MATERIAL E MÉTODOS

1769

1770

1771

1772

1773

1774

1775

1776

1777

1778

1779

### **Coleta do material vegetal, identificação botânica**

Para a realização deste trabalho foram utilizadas duas amostras de *Hyptis* sp. (Lamiaceae) e uma amostra de *Physalis* sp. (Solanaceae), essas plantas daninhas foram coletadas numa mesma área experimental, localizada no município de Rio Largo, estado de Alagoas, em 2010 e 2012 (Tabela 1) e apresentavam sintomas de mosaico amarelo e deformação do limbo foliar (Figura 1). As amostras coletadas foram armazenadas em sacos plásticos e transportadas até o laboratório, onde foram mantidas a -80°C até a extração de DNA.

1776

1777

### **Amplificação do DNA e clonagem**

1778

1779

O DNA total foi extraído de acordo com o método Doyle e Doyle (1987). Para a confirmação da presença da infecção por begomovírus foi realizada PCR utilizando

1780 primers universais para os membros do gênero. Após a confirmação, os genomas  
1781 completos virais foram amplificados utilizando o método de amplificação por círculo  
1782 rolante (RCA) (Inoue-Nagata et al., 2004) e clonados no vetor pBluescript KS+  
1783 (Stratagene) previamente linearizado com as enzimas de restrição *Bam* HI, *Cla* I, *Apa* I  
1784 e *Hind* III e sequenciados na Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul). A primeira rodada de  
1785 sequenciamento foi realizada com os oligonucleotídeos M13 *Forward* e *Reverse*.

1786

### 1787 **Comparações de sequências e análise filogenética**

1788 As sequências foram inicialmente analisadas com o algoritmo BLAST para  
1789 identificação das espécies virais com maior porcentagem de identidade, baseado no  
1790 valor limitante de 89% estabelecido pelo grupo de estudos de *Geminiviridae* (ICTV)  
1791 (Brown et al., 2011). Comparações par a par de nucleotídeos (*pairwise*) foram  
1792 realizadas com DNAMAN versão 6.0 (Lynnon Co.) utilizando a opção alinhamento  
1793 ótimo seguindo parâmetros: Ktuple = 2, Gap penalty = 7, Gap open = 10, Gap extension  
1794 = 5.

1795 Sequências de nucleotídeos dos begomovírus utilizados nas análises  
1796 filogenéticas e recombinação (isolados obtidos neste estudo e outros begomovírus da  
1797 América do sul anteriormente descritos, incluindo o Brasil; Tabela 4) foram alinhadas  
1798 utilizando o módulo Muscle no MEGA 5 (Tamura et al., 2011). A árvore filogenética,  
1799 baseada no alinhamento do DNA-A, foi construída com MEGA 5.0 utilizando-se o  
1800 método neighbour-Joining incluindo análise bootstrap com 100.000 repetições.

1801

### 1802 **Análise de Recombinação**

1803 Para evidenciar recombinação foi realizada *Phylogenetic network analysis*  
1804 utilizando o método neighbour-net implementado no SplitsTree4 (Huson e Bryant,  
1805 2006). Análises adicionais de potenciais eventos de recombinação e identificação de  
1806 prováveis sequências parentais foram realizadas utilizando o programa de detecção de  
1807 recombinação (RDP) versão 3.0 (Martin et al., 2010) usando parâmetros padrões.  
1808 Eventos de recombinação detectados por pelo menos quatro métodos de análises  
1809 disponíveis no programa foram considerados confiáveis. As análises de recombinação  
1810 incluíram os vírus obtidos neste estudo e os descritos anteriormente no Brasil.

1811



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

1812

1813

### 1814 **Comparações das sequências e análise filogenética**

1815 A partir das plantas daninhas *Hyptis* sp. e *Physalis* sp., foram obtidos seis clones,  
1816 cinco correspondendo ao DNA-A e um ao DNA-B. As análises para atribuição  
1817 preliminares das espécies no BLAST e comparações par a par de sequências  
1818 nucleotídicas indicaram a presença de três novas espécies de begomovírus nessas  
1819 hospedeiras (Tabela 2, Figura 2).

1820 Os clones BR:Rla5:10A e BR:Rla6:10A obtidos de uma mesma amostra de  
1821 *Hyptis* sp. (Figura 1B) representam duas novas espécies distintas, as quais apresentaram  
1822 88% de identidade entre si. O clone BR:Rla5:10A apresentou apenas 83% de identidade  
1823 com Tomato mottle leaf curl virus (ToMoLCV JF803247), enquanto o clone  
1824 BR:Rla6:10A é mais relacionado ao Centrosema yellow spot virus (CenYSV  
1825 NC016998), com 80% de identidade (Figura 2). Os nomes propostos para as duas novas  
1826 espécies são *Hyptis rugose mosaic virus 1* (HyRMV1) e *Hyptis rugose mosaic virus 2*  
1827 (HyRMV2), respectivamente. A detecção de dois vírus em uma mesma amostra sugere  
1828 uma infecção mista, fenômeno relatado com certa frequência para begomovírus e  
1829 geralmente associado ao aumento da variabilidade genética, uma vez que possibilita  
1830 eventos de pseudo-recombinação e de recombinação verdadeira (Andrade et al., 2006;  
1831 Graham et al., 2010; Ilyas, 2010).

1832 Uma terceira nova espécie obtida inicialmente de *Physalis* sp. (BR:Rla1:12A e  
1833 BR:Rla2:12A) (Figura 1A) e posteriormente detectada em *Hyptis* sp. (BR:Rla3:12A)  
1834 (Figura 1C), mostrou-se mais relacionada com (ToMoLCV JF803250), com 79% de  
1835 identidade, para a qual foi proposto o nome *Physalis yellow spot virus* (PhYSV). Já os  
1836 isolados de PhYSV obtidos de *Hyptis* e *Physalis* compartilharam 99%-100% de  
1837 identidade de nucleotídeos (Figura 2).

1838 A organização genômica do HyRMV1, HyRMV2 e PhYSV foi semelhante as  
1839 dos begomovírus típicos do “Novo Mundo”, com ORFs: CP (“coat protein”) no sentido  
1840 viral e REP (“replication-associated protein”), REN (“replication enhance protein”),  
1841 TRAP (“trans-activating protein”), AC4 (codifica uma proteína supressora do  
1842 silenciamento gênico) no sentido complementar (King et al, 2012). Uma ORF adicional,  
1843 AC5, foi encontrada inserida no gene *CP* em orientação inversa. A função da AC5 no

1844 processo de infecção viral ainda não foi elucidada, no entanto no Indian mung bean  
1845 yellow mosaic virus (IMBYMV) é um importante fator envolvido na replicação viral  
1846 (Raghavan et al., 2004). (Tabela 3).

1847 Na análise filogenética baseada na sequência completa do DNA-A dos isolados  
1848 desse trabalho e outros begomovírus da América do Sul, as três novas espécies  
1849 formaram um ramo monofilético (Figura 3), o qual incluiu apenas o ToMoLCV e  
1850 PSLDV, os quais infectam tomateiro e maracujazeiro, respectivamente. O ToMoLCV, é  
1851 a espécie de begomovírus que prevalece na região nordeste do Brasil (Albuquerque et  
1852 al., 2012).

1853

### 1854 **Análise de Recombinação**

1855 A ocorrência de infecção mista envolvendo as duas novas espécies (HyRMV1 e  
1856 HyRMV2) em *Hyptis* sp., aliada ao fato de PhYSV (obtida de *Physalis* sp.) ser  
1857 detectada em *Hyptis* sp., e das três espécies serem coletadas em áreas muito próximas,  
1858 sugere que estas podem ser recombinantes. Infecções mistas com mais de um  
1859 begomovírus no campo são comuns, favorecendo a ocorrência de recombinação e  
1860 pseudo-recombinação, favorecendo o surgimento de novas variantes ou espécies melhor  
1861 adaptadas aos novos hospedeiros (Galvão et al., 2003; Castillo-Urquiza et al., 2008;  
1862 Chakraborty et al., 2008; Rocha et al., 2013).

1863 A ocorrência de recombinação intra e interespecíficos entre as espécies  
1864 HyRMV1 (BR:Rla5:10A) e HyRMV2 (BR:Rla6:10A) e PhYSV (BR:Rla1:12A e  
1865 BR:Rla2:12A ) e todos os outros begomovírus brasileiros foi inicialmente testada por  
1866 análise de filogenia reticulada (Figura 4), utilizando o método Neighbor-net. Os  
1867 resultados das análises indicaram uma forte evidência de recombinação entre HyRMV1  
1868 e HyRMV2. Entretanto, nenhuma evidência de recombinação foi encontrada para os  
1869 isolados pertencentes à espécie PhYSV, quando este método foi utilizado.

1870 Para maiores investigações desse possível sinal de recombinação, este mesmo  
1871 grupo de dados foi analisado utilizando o programa RDP3. Para excluir sinais de  
1872 recombinação não confiáveis. Dessa forma, apenas eventos suportados por ao menos  
1873 quatro diferentes métodos foram selecionados. As análises de recombinação utilizando  
1874 RDP3, indicaram que as espécies ocorrendo em infecção mista em *Hyptis* sp., HyRMV1  
1875 (BR:Rla5:10A) e HyRMV2 (BR:Rla6:10A), são de fato recombinantes (Tabela 4),

1876 sendo HyRMV1 o maior parental, o qual doou um segmento que engloba o gene *Rep* e  
1877 início da região comum (RC) para HyRMV2. Um segundo evento de recombinação  
1878 com breakpoints localizados em *Rep* foi compartilhado pelas espécies HyRMV1  
1879 (BR:Rla5:10A) e PhYSV (BR:Rla1:12A, BR:Rla2:12A e BR:Rla3:12A), identificando  
1880 como maior parental o *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), um begomovírus de  
1881 tomateiro (Tabela 4). Assim como identificado nesse estudo, as regiões RC e gene *Rep*  
1882 tem sido frequentemente identificadas como hot-spots de recombinação para muitos  
1883 begomovírus (García-Andrés et al., 2007; Lefeuvre et al., 2007; Silva et al., 2011 e  
1884 2012; Albuquerque et al., 2012; Tavares et al., 2012). Com base nesses resultados foi  
1885 proposto que a nova espécie HyRMV2, surgiu de um evento de recombinação que  
1886 envolveu HyRMV1 e um begomovírus desconhecido. Enquanto que a espécie PhYSV,  
1887 teria surgido inicialmente em *Physalis* sp., a partir de eventos de recombinação que  
1888 envolveram o ToRMV e um begomovírus parental desconhecido e posteriormente,  
1889 adquirido a capacidade de infectar *Physalis* sp. Uma evidência que suporta este hipótese  
1890 é o fato de que o ToRMV infectar naturalmente *Nicandra physaloides* uma outra plantas  
1891 daninha pertencente à família Solanaceae (Fernandes et al., 2006). No entanto, estudos  
1892 adicionais são necessários para comprovar essa hipótese.

1893 O fato de o ToRMV ser encontrado como possível parental para as espécies  
1894 HyRMV1 e PhYSV, obtidas de duas novas espécies plantas daninhas, é interessante. De  
1895 acordo com Rocha et al. (2013), a maioria dos eventos de recombinação detectados em  
1896 begomovírus que infectam tomateiro têm vírus de hospedeiras daninhas ou silvestres  
1897 como parental, enquanto o contrário não é verdadeiro.

1898 Acumuladas evidências sugerem que a recombinação é uma importante fonte de  
1899 diversidade genética para begomovírus brasileiros (Inoue-Nagata et al., 2006; Ribeiro  
1900 et al., 2007; Castillo-Urquiza et al., 2008; Fernandes et al., 2009). No entanto, estudos  
1901 sobre a variabilidade de begomovírus em plantas não cultivadas indicam que estas  
1902 apresentam um maior grau de variabilidade genética quando comparados com vírus que  
1903 infectam hospedeiras cultivadas (Silva et al., 2011 e 2012, Lima et al., 2013; Rocha et  
1904 al., 2013). Eventos de recombinação, seleção não adaptativa e mutação tem explicado  
1905 esta alta variabilidade em hospedeiras não cultivadas (Fialo-Olivé et al., 2012; Silva et  
1906 al., 2011 e 2012; Lima et al., 2013; Rocha et al., 2013).

1907           Infeções associadas a begomovírus em hospedeiras daninhas pertencentes às  
1908 famílias Malvaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae e Solanaceae, são frequentes (Morales e  
1909 Anderson, 2001). Estas podem funcionar como reservatórios de begomovírus para  
1910 plantas cultivadas (García-Andrés et al., 2006; Barbosa et al., 2009) ou como fontes  
1911 para novos vírus recombinantes devido a infeções mistas (García-Andrés et al., 2006,  
1912 Silva et al., 2012). Recentes estudos revelaram que *Sida* spp., *Sidastrum micranthum* e  
1913 *Macroptilium* spp. são importantes reservatórios naturais de várias espécies de  
1914 begomovírus (Tavares et al., 2012 e Silva et al., 2012). O verdadeiro papel dessas  
1915 hospedeiras daninhas na epidemiologia de doenças de plantas cultivadas ainda não foi  
1916 esclarecido. No entanto, acredita-se que os begomovírus brasileiros que infectam  
1917 tomateiro presentes atualmente no campo evoluíram a partir *Sida* spp. A detecção de  
1918 Tomato mild mosaic virus (ToMIMV) e Sida micrantha mosaic virus (SiMMV) tanto  
1919 em tomate bem como em *Sida* spp., suportam esta hipótese (Tavares et al., 2012).

1920           *Physalis* sp. é frequentemente utilizada como indicadora em testes de gama de  
1921 hospedeiras para novas espécies de begomovírus. A caracterização biológica de  
1922 begomovírus que infectam tomateiro como ToRMV, Tomato chlorotic mottle virus  
1923 (ToCMoV), *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), tem demonstrado que várias  
1924 hospedeiras solanáceas não cultivadas como *Nicandra physaloides*, *Solanum nigrum*  
1925 *Datura stramonium* são frequentes hospedeiras desses vírus. No entanto, a inoculação  
1926 experimental de *Physalis* sp. com estas mesmas espécies virais comprovaram que esta  
1927 não é hospedeira (Fernandes et al., 2006; Calegario et al., 2007 e Ribeiro et al., 2007).  
1928 Até o momento, não existem relatos de infecção natural de *Physalis* sp. e *Hyptis* sp. por  
1929 begomovírus.

1930           Os resultados desse estudo indicam *Physalis* sp. e *Hyptis* sp. podem funcionar  
1931 como potenciais reservatórios e fontes de novos begomovírus. No entanto, estudos  
1932 adicionais são necessários para investigar a importância dessas duas espécies como  
1933 fontes de begomovírus para plantas cultivadas.

1934

1935

1936

1937

1938

## Literatura Citada

- 1939
- 1940
- 1941 ALBUQUERQUE, L.C. et al. Further characterization of tomato-infecting
- 1942 begomoviruses in Brazil. **Archives of Virology**, New York, v. 157, p. 747–752, 2012.
- 1943
- 1944 ANDRADE, E.C. et al. *Tomato yellow spot virus*, a tomato-infecting begomovirus from
- 1945 Brazil with a closer relationship to viruses from *Sida* sp., forms pseudorecombinants
- 1946 with begomoviruses from tomato but not from *Sida*. **Journal of General Virology**,
- 1947 London, v. 87, p. 3687-3696, 2006.
- 1948
- 1949 ASSUNÇÃO, I.P. et al. Diversidade genética de begomovírus que infectam plantas
- 1950 invasoras na Região Nordeste. **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v. 24, p. 239-244,
- 1951 2006.
- 1952
- 1953 BARBOSA, J. C. et al. Natural infection of *Nicandra physaloides* by *Tomato severe*
- 1954 *rugose virus* in Brazil. **J. Gen. Plant Pathol.**, v. 75, n. 6, p. 440-443, 2009.
- 1955
- 1956 BROWN, J. K. et al. Family Geminiviridae. In: KING, A. M. Q. et al (Ed.). *Virus*
- 1957 *Taxonomy. 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.*
- 1958 London: Elsevier Academic Press, p. 351-373, 2011
- 1959
- 1960 BYRNE, D. Migration and dispersal by the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci*.
- 1961 **Agric. For. Meteorol.**, v. 97, n. 4, p. 309-316, 1999.
- 1962
- 1963 CALEGARIO, R.F et al. Characterization of *Tomato yellow spot virus*, (ToYSV), a
- 1964 novel tomato-infecting begomovirus from Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**,
- 1965 Rio de Janeiro, v. 42, p. 1335-1343, 2007.
- 1966
- 1967 CASTILLO-URQUIZA, G. P. et al. Six novel begomoviruses infecting tomato and
- 1968 associated weeds in Southeastern Brazil. **Archives of Virology**, New York, v. 153, p.
- 1969 1985-1989, 2008.
- 1970

1971 CHAKRABORTY, S. et al. Supervirulent pseudorecombination and asymmetric  
1972 synergism between genomic components of two distinct species of begomovirus  
1973 associated with severe tomato leaf curl disease in India. **Journal of General Virology**,  
1974 v. 89, p. 818-828, 2008.

1975

1976 DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of  
1977 fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

1978

1979 FERNANDES, J.J. et al. Biological and molecular properties of *Tomato rugose mosaic*  
1980 *virus* (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. **Plant Pathology**,  
1981 Oxford, v. 55, p. 513-522, 2006.

1982

1983 FERNANDES, F.R. et al. Three distinct begomoviruses associated with soybean in  
1984 central Brazil. **Archives of Virology**, v. 154, p. 1567-1570, 2009.

1985

1986 FIALLO-OLIVÉ, E. et al. Begomoviruses infecting weeds in Cuba: increased host  
1987 range and a novel virus infecting *Sida rhombifolia*. **Archives of Virology**, v. 157, p.  
1988 141–146, 2012.

1989

1990 FRISCHMUTH, T. et al. Nucleotide sequence evidence for the occurrence of three  
1991 distinct whitefly-transmitted, *Sida*-infecting bipartite geminiviruses in Central America.  
1992 **Journal of General Virology**, London, v. 78, p. 2675-2682, 1997.

1993

1994 GARCIA-ANDRÉS, S. et al. Begomovirus genetic diversity in the native plant  
1995 reservoir *Solanum nigrum*: Evidence for the presence of a new virus species of  
1996 recombinant nature. **Virology**, New York, v. 350, p. 433-442, 2006.

1997

1998 GARCIA-ANDRÉS, S. et al. Frequent occurrence of recombinants in mixed infections  
1999 of tomato yellow leaf curl disease-associated begomoviruses. **Virology**, New York, v.  
2000 365, p. 210-219, 2007.

2001

2002 GRAHAM, A.P., MARTIN, D.P.; ROYE, M. E. Molecular characterization and  
2003 phylogeny of two begomoviruses infecting *Malvastrum americanum* in Jamaica:  
2004 evidence of the contribution of inter-species recombination to the evolution of  
2005 malvaceous weed associated begomoviruses from the northern Caribbean. **Virus Genes**,  
2006 v. 40, p. 256–266, 2010.

2007

2008 HANLEY-BOWDOIN, L. et al. Geminiviruses: Models for plant DNA replication,  
2009 transcription, and cell cycle regulation. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca  
2010 Raton, v. 18, p. 71-106, 1999.

2011

2012 HUSON, D.H.; BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary  
2013 studies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, p. 254–267, 2006.

2014

2015 ILYAS, M. et al. Genetic diversity and phylogeography of begomoviruses infecting  
2016 legumes in Pakistan. **Journal General Virology**, v. 91, p. 2091-2101, 2010.

2017

2018 INOUE-NAGATA, A.K. et al. A simple method for cloning the complete begomovirus  
2019 genome using the bacteriophage  $\phi$ 29 DNA polymerase. **Journal of Virological**  
2020 **Methods**, v. 116, p. 209-211, 2004.

2021

2022 INOUE-NAGATA, A.K. et al. New species emergence via recombination among  
2023 isolates of the Brazilian tomato infecting Begomovirus complex. **Pesquisa**  
2024 **Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 41, p. 1329-1332, 2006.

2025

2026 KING, A.M.Q. et al. E.J. **Ninth Report of the International Committee on**  
2027 **Taxonomy of Viruses**, 2012. 1327p.

2028

2029 LEFEUVRE, et al. Begomovirus 'melting pot' in the south-west Indian Ocean islands:  
2030 Molecular diversity and evolution through recombination. **Journal of General**  
2031 **Virology**, v. 88, p. 3458-3468, 2007b.

2032

2033 LEFEUVRE, P. et al. Widely conserved recombination patterns among single-stranded  
2034 DNA viruses. **Journal of Virology**, v. 83, p. 2697–2707, 2009.

2035

2036 LIMA, A.T.M. et al. Synonymous site variation due to recombination explains higher  
2037 genetic variability in begomovirus populations infecting non-cultivated hosts. **Journal**  
2038 **of General Virology**, v. 94, p. 418–431, 2013.

2039

2040

2041 MARTIN, D.P. et al. RDP3: A flexible and fast computer program for analyzing  
2042 recombination. **Bioinformatics**, v. 26, n. 19, p. 2462-2463, 2010.

2043

2044 MORALES, F.J.; ANDERSON, P.K. The emergence and dissemination of  
2045 whiteflytransmitted geminiviruses in Latin America. **Archives of Virology**, v.146, n. 3,  
2046 p. 415-441, 2001.

2047

2048 MONCI, F. et al. A natural recombinant between the geminiviruses Tomato yellow leaf  
2049 curl Sardinia virus and Tomato yellow leaf curl virus exhibits a novel pathogenic  
2050 phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. **Virology**, v. 303, p. 317–  
2051 326, 2002.

2052

2053 MORALES, F.J. History and current distribution of begomoviruses in Latin America.  
2054 **Advances in Virus Research**, v. 67, p. 127-162, 2006.

2055

2056 MUBIN, M.; BRIDDON, R.W.; MANSOOR, S. Diverse and recombinant DNA  
2057 betasatellites are associated with a begomovirus disease complex of *Digera arvensis*, a  
2058 weed host. **Virus Research**, v. 142, p. 208–212, 2009.

2059

2060 PAPROTKA, T.; METZLER, V.; JESKE, H. The complete nucleotide sequence of a  
2061 new bipartite begomovirus from Brazil infecting *Abutilon*. **Archives of Virology**, New  
2062 York, v. 155, p. 813-816, 2010.

2063



2064 RAGHAVAN, V. et al. The DNA-A Component of a Plant Geminivirus (*Indian Mung*  
2065 *Bean Yellow Mosaic Virus*) Replicates in Budding Yeast Cells. **Journal of Virology**,  
2066 v.78: p.2405–2413, 2004.

2067

2068 RIBEIRO, S.G. et al. Molecular and biological characterization of Tomato chlorotic  
2069 mottle virus suggests that recombination underlies the evolution and diversity of  
2070 Brazilian tomato begomoviruses. **Phytopathology**, v. 97, n. 6, p. 702-711, 2007.

2071

2072 [ROCHA, C.S.](#) et al. Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly  
2073 evolving, and segregated based on geographical location. **Journal of virology**, in print .  
2074 doi:10.1128/JVI.00155-13, 2013.

2075

2076 ROJAS, M.R. et al. Exploiting chinks in the plant’s armor: evolution and emergence of  
2077 geminiviruses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 361–394, 2005.

2078

2079 SEAL, S. E.; JEGER, M. J.; VAN DEN BOSCH, F. Begomovirus evolution and disease  
2080 management. **Advances in Virus Research**, v. 67, p. 297– 316, 2006.

2081

2082 SILVA, S.J.C. et al. High genetic variability and recombination in a begomovirus  
2083 population infecting the ubiquitous weed *Cleome affinis* in northeastern Brazil.  
2084 **Archives of Virology**, v. 156, p. 2205–2213, 2011.

2085

2086 SILVA, S.J.C. et al. Species diversity, phylogeny and genetic variability of  
2087 begomovirus populations infecting leguminous weeds in northeastern Brazil. **Plant**  
2088 **Pathology**, v. 61, p. 457–467, 2012.

2089 STANLEY, J. et al. Family *Geminiviridae*. In *Virus Taxonomy: Eighth Report of the*  
2090 **International Committee on Taxonomy of Viruses**, p. 301–326, Elsevier, London,  
2091 2005.

2092 TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum  
2093 likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular**  
2094 **Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

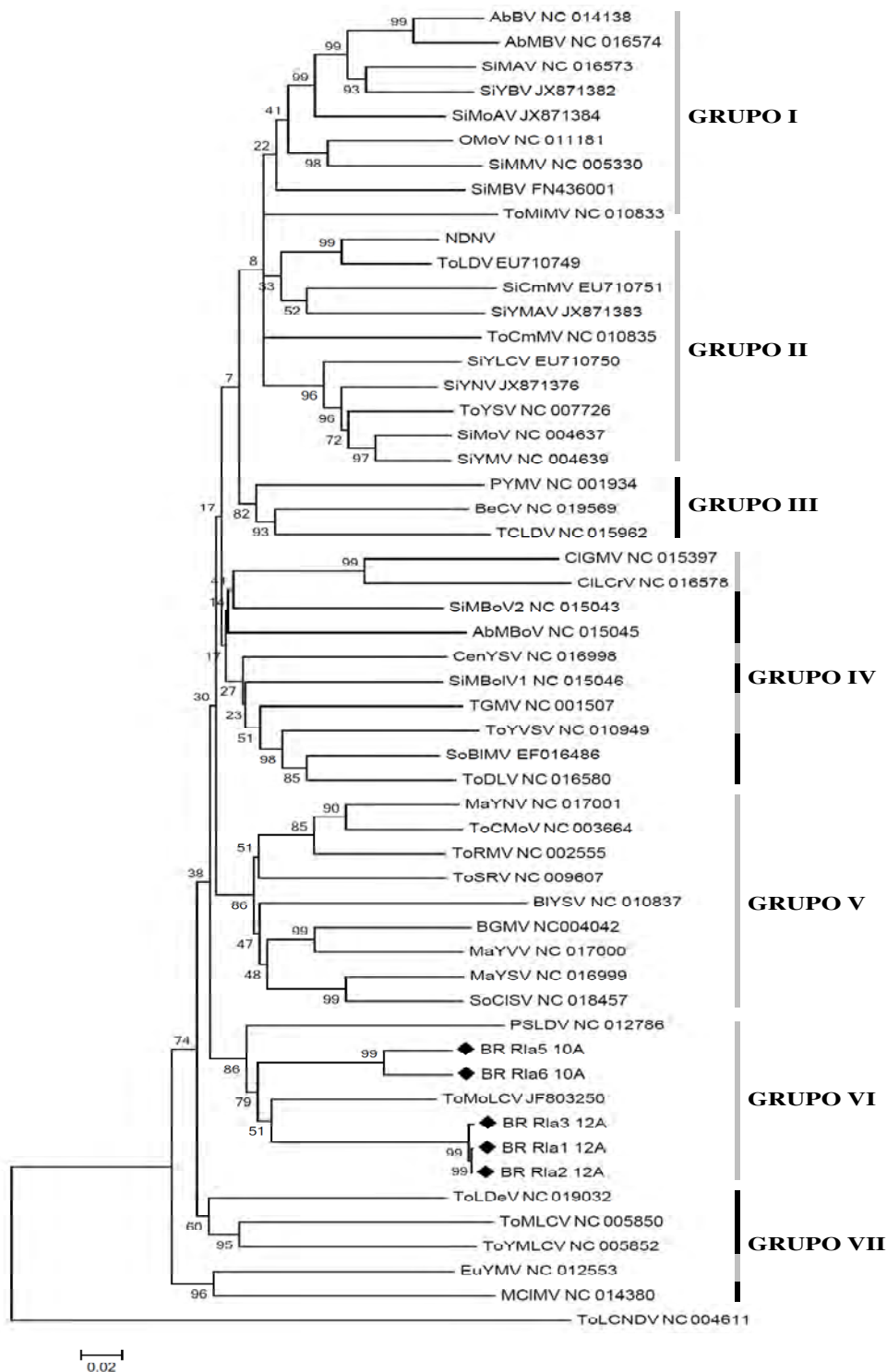
2095 TAVARES, S.S. et al. Further molecular characterization of weed-associated  
2096 begomoviruses in brazil with an emphasis on *Sida* spp. **Planta Daninha**, v. 30, p. 305-  
2097 315, 2012.  
2098  
2099  
2100  
2101  
2102  
2103  
2104  
2105  
2106  
2107  
2108  
2109  
2110  
2111  
2112  
2113  
2114  
2115  
2116  
2117  
2118  
2119  
2120  
2121  
2122  
2123  
2124  
2125  
2126  
2127  
2128  
2129  
2130  
2131  
2132  
2133  
2134  
2135  
2136  
2137  
2138  
2139  
2140



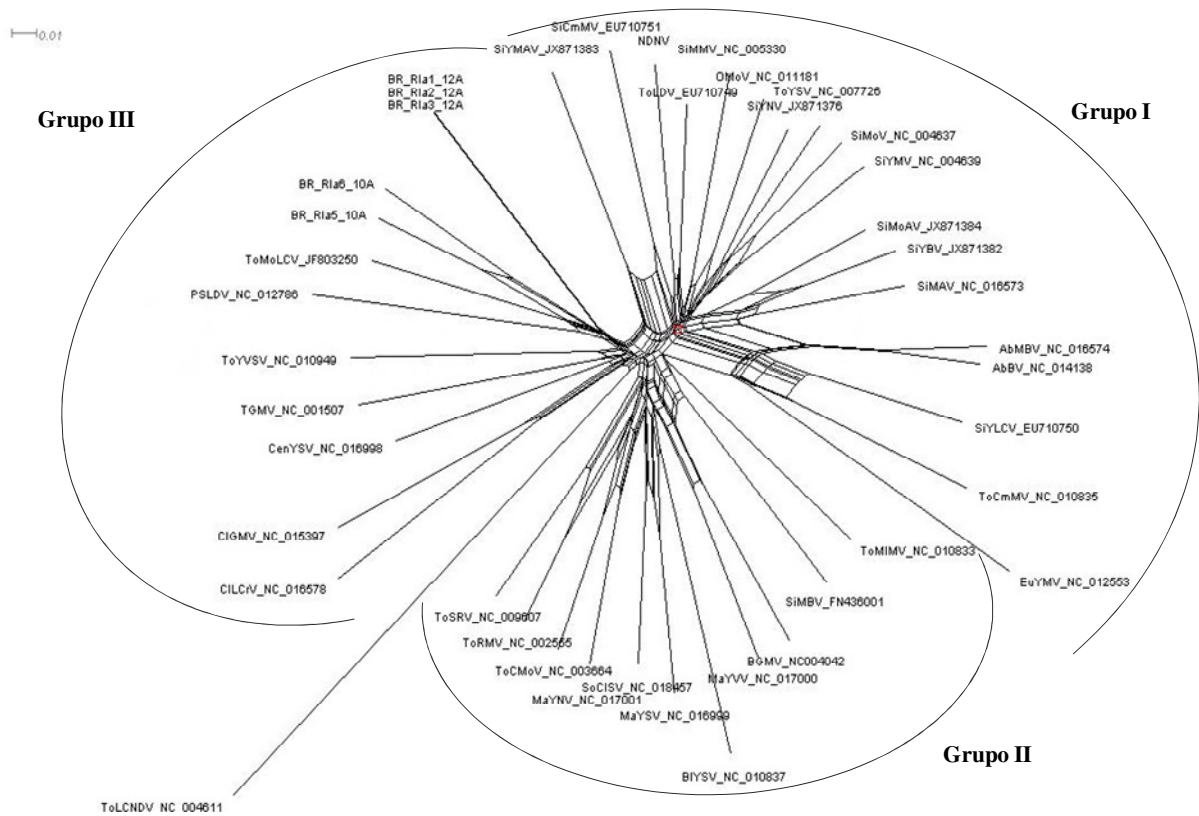
2141  
2142  
~~2143~~  
2144  
2145  
2146  
2147  
2148  
2149  
2150  
2151  
2152  
  
2153  
2154  
2155  
2156  
2157  
2158  
2159  
2160  
2161  
2162

**Figura 1** - Plantas daninhas apresentando sintomas típicos de infecção por begomovírus. (A) mosaico-amarelo em *Physalis* sp. do qual foram obtidos os clones BR:Rla5:10A e BR:Rla6:10A (Physalis yellow spot virus); (B) mosaico-amarelo e deformação do limbo foliar em *Hyptis* sp. do qual foram obtidos os clones BR:Rla1:12A (Hyptis rugose mosaic virus1), BR:Rla2:12 (Hyptis rugose mosaic virus2) e (C) mosaico-amarelo em *Hyptis* sp. do qual foi obtido o clone BR:Rla1:12A (Physalis yellow spot virus).





**Figura 3** – Árvore filogenética baseada no alinhamento da sequência completa do DNA-A dos isolados de *Hyptis* sp. e *Physalis* sp. de Alagoas e outros begomovírus da América do Sul, incluindo o Brasil. A árvore foi construída com o MEGA 5.05 utilizando o método Neighbor-joining, e a confiabilidade de cada ramo verificada com *bootstrap* de 10,000 replicações. O *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV), foi utilizado como *outgroup*. O marcador preto indicam os isolados desse trabalho; As barras cinza e preta delimitam os begomovírus do Brasil e América do Sul, respectivamente.



**Figura 4** – Evidência filogenética de recombinação entre isolados de begomovírus de *Physalis* sp. e *Hyptis* sp. estudados neste trabalho e de outros begomovírus descritos no Brasil. A análise de Neighbor-net foi realizada utilizando Splits Tree 4.

**Tabela 1** – Clones completamente sequenciados correspondentes aos componentes DNA-A e DNA-B obtidos de plantas daninhas das famílias Lamiaceae e Solanaceae coletadas no município de Rio Largo, AL.

Hospedeiro	Família	Local	Ano	Clone		Espécies (Acrônimo)*
				DNA-A	DNA-B	
<i>Hyptis</i> sp.	Lamiaceae	Rio Largo – AL	2010	BR:Rla5:10A	BR:Rla7:10B	HyRMV1 <sup>(novo)</sup>
				BR:Rla6:10A		HyRMV2 <sup>(novo)</sup>
<i>Hyptis</i> sp.	Lamiaceae	Rio Largo – AL	2012	BR:Rla3:12A		PhYSV <sup>(novo)</sup>
<i>Physalis</i> sp.	Solanaceae	Rio Largo – AL	2012	BR:Rla1:12A	PhYSV <sup>(novo)</sup>	
				BR:Rla2:12A		

\* HRMV1 – Hyptis rugose mosaic virus1; HRMV2 – Hyptis rugose mosaic virus2; PhYSV – Physalis yellow spot virus.

**Tabela 2** – Open reading frames (ORFs), com seus respectivos números de aminoácidos (aa), encontrados no DNA-A e DNA-B das espécies de begomovírus descritos neste trabalho.

Isolados (clones)	cp	rep	ren	Trap	ac4	ac5	nsp	mp
BR:Rla1:12A	251aa	399aa	132aa	129aa	85aa	105aa		
BR:Rla2:12A	251aa	399aa	132aa	129aa	85aa	105aa		
BR:Rla3:12A	251aa	399aa	132aa	129aa	85aa	105aa		
BR:Rla6:10A	251aa	404aa	132aa	129aa	97aa	-		
BR: Rla5:10A	251aa	362aa	132aa	129aa	85aa	-		
BR:Rla7:10B							256aa	293aa

**Tabela 3** – Eventos de recombinação detectados entre os begomovírus das malváceas daninhas descritas nesse trabalho e outros begomovírus previamente descritos no Brasil

Evento	Recombinante	Parental		Breakpoints		Programas <sup>b</sup>	<i>p</i> -Valor <sup>c</sup>
		Maior	Menor	Início	Fim		
1	BR:Rla1:12A BR:Rla2:12A BR:Rla3:12A	ToRMV	n.i. <sup>a</sup>	1980	2171	RGBMCS <sup>3</sup> S	3,3x10 <sup>-20</sup>
2	BR:Rla5:10A	ToRMV	n.i.	1941	2208	RGBMCS <sup>3</sup> S	3,3x10 <sup>-20</sup>
3	BR:Rla6:10A	BR:Rla5:10A	n.i.	1980	15	RGBMCS	6,5x10 <sup>-32</sup>

<sup>a</sup> Parental não identificado. <sup>b</sup> Programas: R, RDP; G, GeneConv; B, Bootscan; M, MaxChi; C, CHIMAERA; S, SisScan e 3S, 3SEQ. <sup>c</sup> Maior *p*-valor detectado pelo programa indicado por um sublinhado.

**Tabela 4** – Sequências dos begomovírus usados nas análises de comparação par a par e filogenéticas

<b>Vírus</b>	<b>Acrônimo</b>	<b>Nº de acesso do GenBank</b>
<b>Brasil</b>		
Abutilon Brazil virus	AbBV	NC_014138
Abutilon mosaic Brazil virus	AbMBV	NC_016574
<i>Bean golden mosaic virus</i>	BGMV	NC_004042
Blainvillea yellow spot virus	BIYSV	NC_010837
Centrosema yellow spot virus	CenYSV	NC_016998
Cleome golden mosaic virus	CIGMV	NC_015397
Cleome leaf crumple virus	CILCrV	NC_016578
Euphorbia yellow mosaic virus	EuYMV	NC_012553
Macroptilium yellow net virus	MaYNV	NC_017001
Macroptilium yellow spot virus	MaYSV	NC_016999
Macroptilium yellow vein virus	MaYVV	NC_017000
Nicandra deforming necrosis virus	NDNV	n.d*
Okra mottle virus	OMoV	NC_011181
Passionfruit severe leaf distortion virus	PSLDV	NC_012786
Sida common mosaic virus	SiCmMV	EU710751
<i>Sida micrantha mosaic virus</i>	SiMMV	NC_005330
Sida mosaic Alagoas virus	SiMAV	NC_016573
Sida mosaic Brazil virus	SiMBV	FN436001
Sida mottle Alagoas virus	SiMoAV	JX871384
<i>Sida mottle virus</i>	SiMoV	NC_004637
Sida yellow blotch virus	SiYBV	JX871382
Sida yellow mosaic Alagoas virus	SiYMAV	JX871383
<i>Sida yellow mosaic virus</i>	SiYMV	NC_004639
<i>Sida yellow leaf curl virus</i>	SiYLCV	EU710750
Sida yellow net virus	SiYNV	JX871376
Soybean chlorotic spot virus	SoCISV	NC_018457
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i>	ToCMoV	NC_003664
Tomato common mosaic virus	ToCmMV	NC_010835
<i>Tomato golden mosaic virus</i>	TGMV	NC_001507
Tomato leaf distortion virus	ToLDV	EU710749
Tomato mild mosaic virus	ToMIMV	NC_010833
Tomato mottle leaf curl virus	ToMoLCV	JF803250
<i>Tomato rugose mosaic virus</i>	ToRMV	NC_002555
<i>Tomato severe rugose virus</i>	ToSRV	NC_009607
<i>Tomato yellow spot virus</i>	ToYSV	NC_007726
<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	ToYVSV	NC_010949
<b>América do Sul</b>		
Abutilon mosaic Bolivia virus	AbMBoV	NC_015045
Bean chlorosis virus	BeCV	NC_019569
Melon chlorotic mosaic virus	MCIMV	NC_014380
<i>Potato yellow mosaic virus</i>	PYMV	NC_001934
Sida mosaic Bolivia vírus 1	SiMBoV1	NC_015046
Sida mosaic Bolivia vírus 2	SiMBoV2	NC_015043
<i>Soybean blistering mosaic virus</i>	SoBlMV	EF016486
Tomato chlorotic leaf distortion virus	TCLDV	NC_015962
Tomato dwarf leaf virus	ToDLV	NC_016580
Tomato leaf deformation virus	ToLDeV	NC_019032
Tomato mosaic leaf curl virus	ToMLCV	NC_005850
<i>Tomato yellow margin leaf curl virus</i>	ToYMLCV	NC_005852
<b>Outgroup</b>		
<i>Tomato leaf curl New Delhi virus</i>	ToLCNDV	NC_004611



## **CONCLUSÕES GERAIS**

---

## CONCLUSÕES GERAIS

- Neste trabalho foi observado um alto grau de diversidade de espécies de begomovírus infectando plantas daninhas nos estados de Alagoas, Pernambuco e Bahia.
- Das 13 amostras coletadas foi detectada a presença de seis novas espécies de begomovírus infectando as plantas daninhas pertencentes às famílias Malvaceae, Lamiaceae e Solanaceae.
- As características das sequências indicam que todas as novas espécies são begomovírus bissegmentados típicos do “Novo Mundo” que agruparam com begomovírus brasileiros na árvore filogenética.
- Nossos resultados indicam que as malváceas daninhas *H. crisper*, *Pavonia* sp., *S. paniculatum*, *Triumfetta* spp. *Waltheria*, a *Physalis* sp. (Solanaceae) e *Hyptis* sp (Lamiaceae) constituem importantes reservatórios de begomovírus e que eventos de recombinação tem aparentemente contribuído para o surgimento de novas espécies nessas hospedeiras