

Universidade Federal do Piauí

Diversidade de espécies e filogenia de begomovírus que infectam plantas não-cultivadas nos estados do Ceará e Piauí

Laíse da Silva Passos

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, área de concentração em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Mestre”.

Teresina

2016

Laíse da Silva Passos
Licenciada em Ciências Biológicas

**Diversidade de espécies e filogenia de begomovírus que infectam plantas
não-cultivadas nos estados do Ceará e Piauí**

Orientador:

Prof. Dr. José Evando Aguiar Beserra Júnior

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal do Piauí como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Genética e
Melhoramento, área de concentração em
Genética e Melhoramento, para obtenção do
título de “Mestre”.**

Teresina

2016

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

P289d Passos, Laíse da Silva

Diversidade de espécies e filogenia de begomovírus que infectam plantas não-cultivadas nos estados do Ceará e Piauí / Laíse da Silva Passos – 2016.
52 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016.

Orientação: Prof. Dr. José Evando Aguiar Beserra Junior

1 .Fabaceae 2. Geminivirus 3. Malvaceae 4. Novas espécies 5. Recombinação I. Título

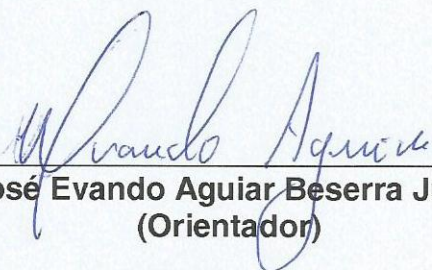
CDD 583.322

Diversidade de espécies e filogenia de begomovírus que infectam plantas não-cultivadas nos estados do Ceará e Piauí.

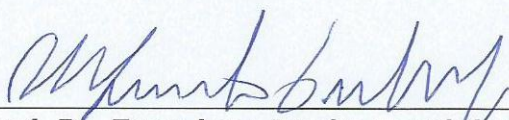
**Láise da Silva Passos
Licenciada em Ciências Biológicas**

Aprovada em 19/04/2016

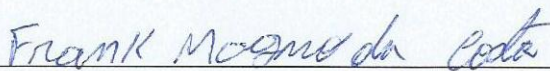
Comissão Julgadora:



**Prof. Dr. José Evando Aguiar Beserra Júnior – UFPI/CCA
(Orientador)**



Prof. Dr. Francisco Murilo Zerbini Júnior – UFV



Prof. Dr. Frank Magno da Costa – UESPI

*Dedico ao meu pai, Antônio Lucimar Gomes Passos e
à minha mãe, Arcângela Maria da Silva Passos.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Piauí (UFPI), pela oportunidade de realização desse curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor José Evando Aguiar Beserra Júnior, pelo profissional exemplar que és, o qual exerce com veemência seu papel de orientador.

Ao professor Francisco Murilo Zerbini Júnior, pelo essencial apoio durante a realização da pesquisa (serei eternamente grata).

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PPGM) da UFPI pelos ensinamentos transmitidos durante o curso.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular da UFPI, Miguel e Kelvin pela contribuição no desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Virologia Vegetal Molecular da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Angélica, César, Hermano, Igor, João, Josiane, Larissa, Márcio, Murilo e Talita pela valiosa amizade, apoio, conselhos e ensinamentos compartilhados.

À funcionária Patrícia, pela eficiência e cuidado durante a preparação das soluções de uso laboratorial, facilitando e tornando todo o trabalho mais prático e rápido.

Aos colegas de turma, Gizele Luz, Jesuíno Martins e Ubirajara Santana pela amizade e apoio.

Aos meus pais, Arcângela e Antônio, pelo incondicional amor, apoio, incentivo e dedicação em todos os momentos da minha vida. Aos meus irmãos e sobrinhos pelo carinho e presença constante. Ao Naudivan, por todo o companheirismo e compreensão. Ao meu cachorro Pingo, por está ao meu lado em todas as madrugadas de estudo.

A todos que, de alguma forma, contribuíram com a realização deste trabalho, minha sincera gratidão.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
Família <i>Geminiviridae</i>	10
Evolução dos geminivírus.....	13
Organização genômica de begomovírus.....	14
Diversidade de begomovírus infectando plantas cultivadas e não cultivadas no Brasil.....	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
3. CAPÍTULO 1: Diversidade de espécies e filogenia de begomovírus que infectam plantas não-cultivadas no nordeste do Brasil.....	27
RESUMO.....	27
ABSTRACT.....	28
3.1 INTRODUÇÃO.....	29
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
Comparação de sequências.....	33
Análise filogenética.....	39
Análise de recombinação.....	45
3.4 CONCLUSÕES.....	48
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

RESUMO

PASSOS. L. S. **Diversidade de espécies e filogenia de begomovírus que infectam plantas não-cultivadas nos estados do Ceará e Piauí.** 2016. 52p. Dissertação para obtenção do título de Mestre na área de concentração de Genética e Melhoramento- Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, 2016.

Os *Begomovirus*, maior e mais importante gênero da família *Geminiviridae*, possuem um ou dois componentes genômicos (DNA-A e DNA-B), cada um com cerca de 2600 nucleotídeos, são transmitidos pela mosca-branca *Bemisia tabaci* e infectam apenas espécies dicotiledôneas. A incidência desses vírus em plantas cultivadas e não-cultivadas, no Brasil, aumentou significativamente nos últimos vinte e cinco anos, em razão da introdução da espécie Middle East-Asia Minor 1 – MEAM1 (conhecida como biótipo B) de *B. tabaci*, mais adaptada e com maior gama de hospedeiros. A identificação de vírus que infectam plantas cultivadas e não-cultivadas, assim como o próximo relacionamento filogenético entre estas espécies virais, sugerem que as plantas não-cultivadas atuam como reservatórios de vírus e sejam importantes fontes de inóculo para plantas cultivadas. O objetivo deste trabalho foi identificar e realizar um levantamento das espécies de begomovírus existentes em plantas não-cultivadas em dois estados da região nordeste do Brasil. Amostras de plantas não-cultivadas com sintomas típicos de infecção por begomovírus foram coletadas nos estados do Ceará e Piauí. Após amplificação, digestão e clonagem, vinte e seis clones foram sequenciados. Destes, 17 corresponderam a DNA-A e 9 a DNA-B. Através da análise de comparação de sequências, foram detectadas oito espécies de begomovírus em plantas de *Euphorbia heterophylla*, *Macroptilium lathyroides*, *Sida* spp. e *Wissadula* sp., sendo cinco delas novas espécies. Todas as espécies apresentaram características de begomovírus bissegmentados do Novo Mundo. Filogeneticamente, a maioria das espécies agrupou com outros begomovírus brasileiros, entretanto uma espécie agrupou com vírus identificados em plantas não-cultivadas do México, o que reforça a existência de uma linhagem distinta de begomovírus do Novo Mundo. Eventos de recombinação foram detectados em todas as espécies identificadas. Com base nos hospedeiros e nos sintomas induzidos por cada isolado são propostos os nomes *Macroptilium common mosaic virus* (MaCMV), *Macroptilium bright mosaic virus* (MaBMV), *Sida chlorotic vein virus* (SiCVV), *Sida angular mosaic virus* (SiAMV) e *Wissadula yellow mosaic virus* (WYMV). Os resultados deste trabalho demonstram que as plantas não-cultivadas são fontes de novas espécies de begomovírus, as quais constituem ameaça para o cultivo de espécies agronomicamente importantes.

Palavras-chave: Fabaceae, geminivírus, Malvaceae, novas espécies, recombinação.

ABSTRACT

PASSOS. L. S. **Diversity of species and begomovirus phylogeny infecting non-cultivated plants in states of Ceará and Piauí.** 2016. 52p. Dissertation to obtain of the title of Master in the concentration area of Genetics and Breeding, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, 2016.

The *Begomovirus*, largest and most important genus of family *Geminiviridae*, have one or two genomic components (DNA-A and DNA-B), each with about 2.600 nucleotides, are transmitted by the whitefly (*Bemisia tabaci*) and only infect dicotyledonous species. The incidence of these viruses in cultivated and non-cultivated plants, in Brazil, increased significantly in the last twenty-five years because of the introduction of the specie Middle East - Asia Minor 1 - MEAM1(known as B biotype) of *B. tabaci*, better adapted and more host range. The identification of cultivated and non-cultivated plants viruses, and the next phylogenetic relationships between these viral species suggests that non-cultivated plants act as reservoirs of the viruses and are an important source of inoculum for cultivated plants. The objective of this study was to identify and carry out a survey of begomovirus species existing in uncultivated plants in two states of northeastern Brazil. Samples of non-cultivated plants with typical symptoms of infection begomovirus were collected in the states Ceará and Piauí. After amplification, digestion and cloning, twenty-six clones were sequenced. Of these, 17 corresponded to DNA-A and 9 to DNA-B. Through sequence comparison analysis, begomovirus eight species were detected in plants *Euphorbia heterophylla*, *Macroptilium lathyroides*, *Sida* spp. and *Wissadula* sp., five of them, until them, unidentified. All species showed bipartite begomovirus characteristics of the New World. Phylogenetically, the most of the species grouped with other Brazilian begomovirus, however a species grouped with viruses identified in weed plants of the Mexico, which supports the existence of a distinct lineage begomovirus the New World. Recombination events were detected in all identified species. On the basis of their hosts and symptoms induced by each individual are proposed the names *Macroptilium* common mosaic virus (MaCMV), *Macroptilium* bright mosaic virus (MaBMV), *Sida* chlorotic vein virus (SiCVV), *Sida* angular mosaic virus (SiAMV) e *Wissadula* yellow mosaic virus (WYMV). These results demonstrate that the uncultivated plants are sources of new species begomovirus, which constitute threat to the cultivation of important agronomically species.

Keywords: Fabaceae, geminivirus, Malvaceae, new species, recombination.

1 INTRODUÇÃO

Os vírus da família *Geminiviridae* caracterizam-se pelo genoma composto de um ou dois componentes genômicos (DNA-A e DNA-B) de DNA fita simples circular encapsidados em partículas icosaédricas geminadas. São transmitidos por insetos e podem infectar plantas monocotiledôneas ou dicotiledôneas (ROJAS et al., 2005).

A família é atualmente composta por sete gêneros denominados *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus*. A classificação em cada gênero se dá de acordo com a organização genômica, tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros e relacionamento filogenético (BROWN et al., 2012; VARSANI et al., 2014). Os begomovírus correspondem ao gênero mais diversificado e com o maior número de espécies. São caracterizados por possuírem, na maioria, dois componentes genômicos (DNA-A e DNA-B) e infectarem apenas espécies dicotiledôneas (BROWN et al., 2012).

A infecção por geminivírus causa danos significativos em diversas culturas de várias regiões do mundo. Tendo em vista o impacto econômico causado por esses vírus e a relativa facilidade de clonagem de seus genomas, muitos geminivírus vêm sendo identificados e caracterizados (ALBUQUERQUE et al., 2012; BLAWID et al., 2013; FIALLO-OLIVÉ et al., 2015).

No Brasil, diversas culturas como feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), tomateiro (*Solanum lycopersicon* Mill.), pimentão (*Capsicum annum* L.) e soja (*Glycine max* L.), entre outras, já foram relatadas como hospedeiras de begomovírus. Os principais sintomas em plantas infectadas são o mosaico dourado, amarelecimento e enrolamento das folhas e redução do crescimento (FARIA et al., 2000).

Estudos populacionais em diferentes regiões do país têm demonstrado uma alta diversidade de espécies de begomovírus, assim como um elevado grau de variabilidade genética das populações virais (SILVA et al., 2011; ALBUQUERQUE et al., 2012; ROCHA et al., 2013).

Além de plantas cultivadas, uma ampla gama de plantas não-cultivadas são relatadas como hospedeiras naturais de begomovírus, inclusive de espécies virais inicialmente descritas em plantas cultivadas (BARBOSA et al., 2009). Além disso, algumas espécies de begomovírus anteriormente descritas em plantas não-cultivadas já foram encontradas infectando plantas cultivadas (CASTILLO-URQUIZA et al., 2008; SILVA et al., 2010; ARANHA et al., 2011). Esses estudos identificaram

relacionamento filogenético entre vírus que infectam plantas cultivadas e não-cultivadas, sugerindo que estas desempenham um papel significativo na manutenção e disseminação dos begomovírus no campo, atuando como fonte de inóculo e favorecendo a ocorrência de epidemias (SILVA et al., 2012; ROCHA et al., 2013).

Considerando o elevado número de espécies descritas em diferentes hospedeiros, assim como a ocorrência da alta variabilidade genética dos begomovírus, há a necessidade urgente do desenvolvimento de novas estratégias de controle. A identificação e caracterização de isolados virais infectando plantas não-cultivadas são cruciais para a realização de estudos posteriores visando uma melhor compreensão da interação e evolução desses vírus com as plantas hospedeiras, a fim de subsidiar pesquisas de resistência genética para o controle do patógeno.

Pesquisas nesse sentido têm sido realizadas nas regiões Central e Nordeste do país (FERNANDES et al., 2011; SILVA et al., 2011; TAVARES et al., 2012). Entretanto, até o momento não há nenhum relato e/ou estudo de diversidade genética e caracterização molecular de begomovírus infectando plantas não-cultivadas no estado do Piauí.

Este trabalho teve como objetivos a identificação e caracterização molecular de espécies de begomovírus que infectam plantas não-cultivadas nos estados do Ceará e Piauí.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Família *Geminiviridae*

Nos últimos vinte e cinco anos, os vírus da família *Geminiviridae* têm sido intensamente estudados devido à severidade das doenças causadas em diversas culturas de importância econômica como o feijão-comum, algodão (*Gossypium mustelinum* L.), milho (*Zea mays* L.), tomate e mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.) (FARIA et al., 2000; ALMEIDA et al., 2013). Grandes perdas causadas por geminivírus são relatadas em todo o mundo, especialmente nas áreas tropicais e subtropicais (MORALES; ANDERSON, 2001; MANSOOR et al., 2003; PATIL; FAUQUET, 2009).

Estima-se que uma epidemia de geminivírus afetando a mandioca, registrada em pelo menos nove países da África, causou perdas econômicas anuais equivalentes a 2 bilhões de dólares ao longo das décadas de 1980 e 1990 (PATIL; FAUQUET, 2009). Na República Dominicana, as perdas causadas por geminivírus em tomateiro no início da década de 1990 chegaram a 95% (POLSTON; ANDERSON, 1997).

No Brasil, a grande incidência de geminivírus associada a relevantes perdas econômicas em diversas regiões do país levou à necessidade de ampliar o conhecimento sobre os vírus pertencentes à família (ZERBINI et al., 2005). Em 1995, no Distrito Federal, os prejuízos causados por geminivírus em cultivos de tomate variaram de 40% a 100% (BEZERRA et al., 1996). No mesmo ano, no estado de São Paulo foi relatada uma incidência de 19% a 70% de geminivírus infectando tomateiro (FARIA et al., 1997). Em Pernambuco, perdas de até 100% em diversas áreas da, até então, principal região produtora de tomate para industrialização no país impossibilitaram o cultivo comercial e levaram ao abandono da cultura na região (BEZERRA et al., 1997). Esses estudos demonstram o impacto econômico e a ameaça desses vírus para a agricultura e a segurança alimentar no Brasil e no mundo.

Os vírus da família *Geminiviridae* caracterizam-se estruturalmente por possuir partículas de morfologia icosaédrica geminada, característica que dá nome à família. Possuem um ou dois componentes genômicos compostos por DNA circular de fita simples e são transmitidos por diferentes insetos sugadores, da ordem Hemiptera, a plantas monocotiledôneas ou dicotiledôneas (ROJAS et al., 2005). Outra

característica da família é a presença de uma região que compreende a sequência TAATATTAC associada ao sítio de início da replicação viral, altamente conservada e compartilhada entre praticamente todos os geminivírus (FARIA; ZERBINI, 2000).

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (“International Committee on Taxonomy of Viruses”, ICTV) a família é composta pelos gêneros *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus*, e *Turncurtovirus* (VARSANI et al., 2014). A classificação em cada gênero é determinada de acordo com a organização genômica, tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros e relacionamento filogenético (BROWN et al., 2012).

Com exceção do gênero *Begomovirus*, que inclui vírus com genoma mono ou bissegmentado, todos os demais gêneros da família incluem apenas vírus com genoma monossegmentado.

Os vírus do gênero *Mastrevirus* são constituídos por um único componente genômico com aproximadamente 2,6 Kb que codifica quatro proteínas, são transmitidos por espécies de cigarrinhas da família Cicadellidae e infectam predominantemente hospedeiras monocotiledôneas. A espécie-tipo desse gênero é o *Maize streak virus* (MSV), um patógeno economicamente importante para a cultura do milho (PALMER; RYBICKI, 1998). Acreditava-se que os vírus correspondentes a esse gênero estavam restritos ao “Velho Mundo” (Ásia, África, Europa e Austrália), porém estudos recentes relataram a presença de mastrevírus no “Novo Mundo” (ROSARIO et al., 2013).

O gênero *Curtovirus* compreende vírus com um componente genômico que codifica de seis a sete proteínas. São transmitidos por cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) e infectam espécies dicotiledôneas. O *Beet curly top virus* (BCTV) é a espécie-tipo do gênero (BROWN et al., 2012).

O gênero *Topocuvirus* possui apenas a espécie *Tomato pseudo curly top virus* (TPCTV), transmitido por cigarrinhas da família Membracidae a plantas dicotiledôneas. O genoma viral monossegmentado de aproximadamente 3 Kb codifica seis proteínas (ROJAS et al., 2005).

Os membros do gênero *Begomovirus* caracterizam-se por possuir um ou dois componentes genômicos (DNA-A e DNA-B), cada um com cerca de 2,6 Kb, transmitidos pela mosca-branca *Bemisia tabaci* a plantas dicotiledôneas. A espécie-tipo do gênero é o *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) (BROWN et al., 2012).

Dos três novos gêneros, recentemente estabelecidos pelo ICTV, *Becurtovirus* apresenta duas espécies: *Beet curly top Iran virus* (BCTIV) e *Spinach curly top Arizona virus* (SCTAV). O BCTIV é transmitido por cigarrinhas e SCTAV ainda não teve o vetor identificado. Os gêneros *Eragrovirus* e *Turncurtovirus* possuem apenas uma espécie cada um: *Eragrostis curvula streak virus* (ECSV) e *Turnip curly top virus* (TCTV), respectivamente, com a primeira sem vetor conhecido e a segunda transmitida por cigarrinhas. Uma diferença observada entre os gêneros *Becurtovirus* e *Eragrovirus* e os demais vírus da família refere-se à sequência conservada associada ao sítio de início da replicação viral. Geralmente os geminivírus possuem o nonanucleotídeo TAATATTAC, entretanto, os vírus de ambos gêneros possuem a sequência TAAGATTCC (VARSANI et al., 2014).

A constante identificação de novos geminivírus com características genômicas distintas, muitas vezes sem identidade significativa com quaisquer outros geminivírus até então conhecidos, sugere a necessidade de formação de novos gêneros na família no futuro (BERNARDO et al., 2013; ROUMAGNAC et al., 2015).

Os geminivírus são encontrados predominantemente no floema da planta hospedeira, embora alguns tenham a capacidade de atingir tecidos do mesófilo (MORRA; PETTY, 2000). O processo de infecção ocorre por meio do inseto vetor, que ao se alimentar da seiva introduz o vírus na célula vegetal. A partir de então o genoma viral se desassocia do capsídeo e é transportado ao núcleo, onde é convertido em um intermediário de fita dupla (dsDNA) denominado “forma replicativa” (RF), que serve de molde para a transcrição e síntese de novas moléculas de ssDNA (NAGAR et al., 1995). A amplificação é totalmente dependente do aparato enzimático do hospedeiro e uma vez que os vírus infectam células diferenciadas, o ciclo celular da célula vegetal deve ser modificado no sentido de ativar genes envolvidos na síntese de enzimas e outros fatores responsáveis e necessários à replicação viral (GUTIERREZ, 1999).

Os principais sintomas observados em plantas infectadas por geminivírus são o mosaico dourado, enrolamento e deformação foliar, redução de crescimento e consequente redução na quantidade e tamanho de frutos. Estes sintomas são influenciados por fatores como o genótipo e o estágio de desenvolvimento da planta infectada, fatores ambientais e a ocorrência de infecções mistas (FARIA et al., 2000; INOUE-NAGATA et al., 2009).

Recentemente, foi publicado o primeiro relato de transmissão de um geminivírus (*Tomato yellow leaf curl virus*) por semente na Coreia (KIL et al., 2016), entretanto, até o momento não há evidências de transmissão de geminivírus por semente no Brasil.

2.2 Evolução dos geminivírus

A maioria dos vírus fitopatogênicos possui genoma composto por RNA. Apenas as famílias *Caulimoviridae*, *Nanoviridae* e *Geminiviridae* possuem vírus com genoma composto de DNA, e destas, somente as duas últimas incluem vírus de DNA de fita simples, o que indica um caminho evolutivo único percorrido por estes vírus para estabelecer com eficácia o parasitismo em plantas (ROJAS et al., 2005).

A hipótese mais aceita em relação à origem dos geminivírus considera que estes podem ter sido originados a partir de bacteriófagos ou DNAs eubacterianos de fita simples. A demonstração de que o *Tomato leaf curl virus* (ToLCV) é capaz de replicar em *Agrobacterium tumefaciens* (RIGDEN et al., 1996), assim como a observação de que o promotor que codifica a proteína capsidial dos geminivírus é funcional em *Escherichia coli* (PETTY et al., 1986) reforçam esta hipótese.

Estudos filogenéticos indicaram que os *Mastrevirus* são mais divergentes entre si em comparação aos demais gêneros da família, o que sugere que evoluíram por um período de tempo mais longo (RYBICKI, 1994). Acredita-se que os geminivírus derivaram de um ancestral comum que possuía apenas um componente genômico, transmitido por cigarrinhas e que infectava monocotiledôneas. No decorrer da coevolução com seus hospedeiros, adquiriram genes que possibilitaram o surgimento de novas características como a capacidade de infectar plantas dicotiledôneas e, posteriormente, a possibilidade de serem transmitidos por mosca-branca, visto que se tem conhecimento de mastrevírus que infectam dicotiledôneas, mas não de mastrevírus transmitidos por mosca-branca (RYBICKI, 1994; ROJAS et al., 2005).

Padidam et al. (1999) analisaram filogeneticamente diversos geminivírus e propuseram que o gênero *Curtovirus* é resultado de uma recombinação entre *Mastrevirus* e *Begomovirus*, uma vez que contém regiões genômicas estreitamente relacionadas com os dois gêneros.

Análises filogenéticas de membros da família *Geminiviridae* evidenciaram a formação de agrupamentos entre diferentes espécies do mesmo gênero, amplamente associadas à localização geográfica (RYBICKI, 1994). Os membros do gênero *Mastrevirus* podem ser divididos em grupos denominados “African streak group” e “Australasian striate mosaic group”, enquanto os begomovírus podem ser divididos entre “Velho mundo” (Europa, Ásia e África) e “Novo mundo” (Américas) (BROWN et al., 2012). De acordo com esse agrupamento e com os diversos estudos realizados, uma característica evolutiva compartilhada entre todos os begomovírus do Novo Mundo seria a presença de dois componentes genômicos. Entretanto, estudos recentes demonstram a presença de begomovírus monossegmentados em países das Américas (MELGAREJO et al., 2013).

O sequenciamento do genoma completo do TPCTV, única espécie do gênero *Topocuvirus*, demonstrou que sua sequência possui a ORF Rep homóloga à Rep de begomovírus e a ORF CP mais relacionada com *Curtovirus*, porém com a AV2 distinta deste (BROWN et al., 2012).

Esses estudos revelam a ocorrência de eventos constantes de recombinação entre diferentes geminivírus, cruciais para o surgimento de novas espécies com características distintas e capazes de infectar novos hospedeiros.

2.3 Organização genômica de begomovírus

Atualmente, a família *Geminiviridae* compreende 325 espécies. Destas, 288 correspondem a espécies do gênero *Begomovirus*, o que representa 88,6% do total (ICTV, disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>; acesso em 29/03/2016). Os begomovírus são, até o presente, os únicos geminivírus encontrados no Brasil. São caracterizados por serem transmitidos pelo aleirodídeo *B. tabaci*, comumente conhecido como mosca-branca, e infectarem apenas plantas dicotiledôneas (BROWN et al., 2012).

Os begomovírus monossegmentados são amplamente distribuídos pelo Velho Mundo e estão frequentemente associados a DNAs satélites, enquanto os bissegmentados são principalmente encontrados no Novo Mundo sem associação com moléculas satélites (BRIDDON et al., 2010). Entretanto, estudos recentes demonstram a existência de um begomovírus monossegmentado no Peru e no Equador (MELGAREJO et al., 2013), bem como a existência de DNAs satélites

associados a begomovírus bissegmentados no Brasil, Cuba e Venezuela (PAPROTKA et al., 2010; ROMAY et al., 2010; FIALLO-OLIVÉ et al., 2012).

O genoma típico de um begomovírus bissegmentado consiste em dois componentes genômicos (DNA-A e DNA-B) cada um com aproximadamente 2,6 Kb encapsidados em uma partícula icosaédrica geminada com 18 x 30 nm (BROWN et al., 2012). Os dois componentes não possuem identidade de sequência entre si, exceto por uma região de aproximadamente 200 nucleotídeos denominada Região Comum (RC), altamente conservada entre os dois componentes de uma mesma espécie (geralmente acima de 90% de identidade). Na RC está localizada a sequência de reconhecimento da proteína Rep responsável pela replicação viral, bem como regiões responsáveis pela transcrição dos genes virais (HANLEY BOWDOIN et al., 2000).

Ambos os componentes são necessários para a infecção sistêmica, embora alguns trabalhos tenham relatado que a espécie *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMV) seja capaz de infectar plantas como *Nicotiana benthamiana* e, inclusive, tomateiro na ausência do DNA-B (GALVÃO et al., 2003; FONTENELLE et al., 2007).

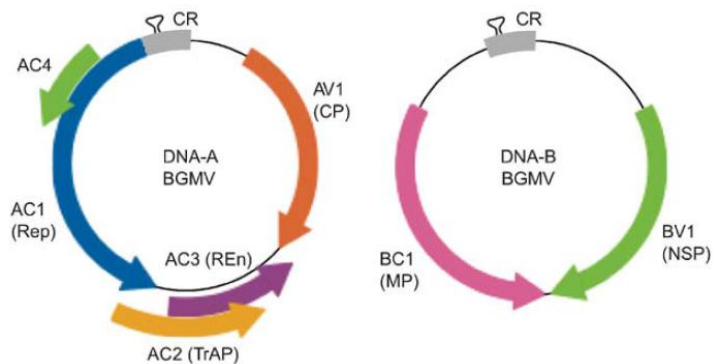


Figura 1: Representação esquemática do genoma de begomovírus bissegmentados do Novo Mundo. Fonte: Rojas et al (2005).

Nos begomovírus bissegmentados, o DNA-A possui cinco ou seis genes, um ou dois no sentido viral (*CP* e, nos vírus do Velho Mundo, *AV2*) e quatro no sentido complementar (*Rep*, *TrAP*, *REn* e *AC4*) (Figura 1). A função da proteína Rep (*Replication-associated protein*) é ligar-se à origem de replicação e iniciar a síntese de DNA (FONTES et al., 1992). A proteína TrAP (*Trans-Activating Protein*) é encarregada de ativar a transcrição dos genes *CP* e *NSP*, além de atuar na supressão de respostas de defesa da planta. A proteína REn (*Replication-Enhancer protein*) intensifica a replicação, levando a um aumento da concentração do DNA

viral (SUNTER et al., 1990). A proteína AC4 está relacionada com a supressão de silenciamento gênico e, nos begomovírus monossegmentados, no movimento viral (VANITHARANI et al., 2004). Uma ORF AC5 está presente em algumas espécies de begomovírus e um estudo recente demonstrou que o produto codificado possui papel importante na supressão de respostas de defesa da planta (LI et al., 2015). A proteína CP é responsável pelo encapsidamento viral e especificidade com o inseto-vetor e, nos begomovírus monossegmentados, atua no movimento viral (BRIDDON et al., 1990). O gene AV2 está presente apenas nos begomovírus do Velho Mundo e sua função está relacionada com o movimento viral (PADIDAM et al., 1996).

O DNA-B possui os genes *NSP* no sentido viral e *MP* no sentido complementar (Figura 1). A proteína *NSP* (*Nuclear Shuttle Protein*) é responsável pelo transporte do DNA viral do núcleo para o citoplasma, e a proteína *MP* (*Movement Protein*) transporta o DNA viral célula-a-célula através dos plasmodesmas (NOUEIRY et al., 1994).

2.4 Diversidade de begomovírus infectando plantas cultivadas e não-cultivadas no Brasil

Os begomovírus têm sido alvo de diversos estudos devido às crescentes perdas causadas em culturas como feijoeiro, tomateiro, feijão-caupi, pimentão e soja (FARIA; ZERBINI, 2000; RIBEIRO et al., 2003).

COSTA, 1965 descreveu o primeiro begomovírus, denominado *Bean golden mosaic virus* (BGMV), agente causador do mosaico dourado do feijão. Na época a doença era de importância secundária, entretanto a partir da década de 1970 esse vírus tornou-se uma ameaça para a produção de feijão em diversos estados do Brasil (FARIA; MAXWELL, 1999).

O primeiro relato de begomovírus infectando tomateiro no Brasil foi feito por COSTA (1975). O vírus foi denominado *Tomato golden mosaic virus* (TGMV). A partir de 1990, observou-se um aumento significativo na incidência de begomovírus em diversos estados, incluindo Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Alagoas e Pernambuco (BEZERRA et al., 1997; FARIA et al., 1997; RIBEIRO et al., 2003; ZERBINI et al., 2005). Essa alta frequência de relatos de doenças causadas por begomovírus em várias regiões do país foi precedida pela introdução e disseminação da espécie Middle East - Asia Minor 1 – MEAM1 (conhecida como biótipo B) de *B. tabaci* (BARBOSA et al., 2014) que transmite os begomovírus com

maior eficiência, possui maior taxa de oviposição e maior gama de hospedeiros, facilitando a disseminação dos begomovírus no campo (ROCHA et al., 2013).

Desde então, diversos estudos vêm sendo realizados com a finalidade de investigar, detectar e caracterizar begomovírus em diferentes regiões do país e em diferentes hospedeiros. Esses estudos evidenciaram uma grande diversidade de espécies de begomovírus (RIBEIRO et al., 2003; CASTILLO-URQUIZA et al., 2008; SILVA et al., 2012; TAVARES et al., 2012), bem como um elevado grau de variabilidade genética das populações virais (ROCHA et al., 2013).

Um levantamento realizado em campos de tomateiro em diferentes estados da região Sudeste e Nordeste, compreendendo as maiores regiões produtoras de tomate do país no período de 1996 a 1999, relatou a ocorrência de sete novas espécies de begomovírus, além de fortes indícios de recombinação entre os vírus (RIBEIRO et al., 2003).

Na região central do Brasil foi relatada a presença de três begomovírus associados à soja: *Bean golden mosaic virus* (BGMV), *Sida micrantha mosaic virus* (SiMoV) e *Okra mottle virus* (OMoV). O primeiro infecta também o feijoeiro, o segundo foi descrito originalmente a partir de uma planta não-cultivada e o terceiro infecta também o quiabeiro (*Abelmoschus esculentus*) (FERNANDES et al., 2009). Isso demonstra a variedade de begomovírus associados a uma mesma cultura no campo, o que pode resultar em uma multiplicidade de sintomas e maior dificuldade de controle, além de facilitar a ocorrência de eventos de recombinação (MONCI et al., 2002).

Além de espécies cultivadas, muitas espécies não-cultivadas, especialmente das famílias Malvaceae, Euphorbiaceae e Fabaceae, são naturalmente infectadas por begomovírus e, a exemplo do que ocorre com várias culturas domesticadas, a variabilidade genética de begomovírus infectando plantas não-cultivadas é elevada (RIBEIRO et al., 2003; ASSUNÇÃO et al., 2006; CALEGARIO et al., 2007; SILVA et al., 2011). De fato, estudos recentes demonstraram que a variabilidade genética de begomovírus que infectam plantas não-cultivadas é ainda maior que a de begomovírus que infectam plantas cultivadas (LIMA et al., 2013; ROCHA et al., 2013; SOBRINHO et al., 2014).

A análise de plantas não-cultivadas com sintomas típicos de infecção por begomovírus em três estados do Nordeste (Alagoas, Pernambuco e Bahia)

evidenciou alta variabilidade genética das espécies virais e relatou novas espécies de plantas hospedeiras (ASSUNÇÃO et al., 2006).

Uma análise de 26 componentes genômicos de begomovírus provenientes de plantas não-cultivadas e cultivadas da região Sudeste demonstrou a ampla variedade genética das espécies, além da detecção de seis novas espécies (CASTILLO-URQUIZA et al., 2008). Um outro estudo de caracterização de begomovírus infectando plantas não-cultivadas coletadas nos estados Alagoas e Minas Gerais indicou um resultado semelhante: a presença de 10 begomovírus distintos em um total de 26 amostras analisadas, incluindo quatro novas espécies (TAVARES et al., 2012).

Esse grande número de espécies de begomovírus descritas, assim como a frequente ocorrência de eventos de recombinação entre vírus em plantas não-cultivadas sugere que begomovírus provenientes de plantas não-cultivadas podem ser transmitidos para espécies cultivadas e que essas plantas podem atuar como reservatórios naturais e fonte de novos begomovírus, desempenhando um papel significativo na manutenção e disseminação desses vírus em campo e favorecendo a ocorrência de epidemias (FERNANDES et al., 2006; SILVA et al., 2010; ROCHA et al., 2013).

A espécie *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV) foi originalmente descrita em plantas de *Sida* e já foi relatada infectando o tomateiro (CASTILLO-URQUIZA et al., 2008), a soja (FERNANDES et al., 2009), o feijoeiro (FERNANDES-ACIOLI et al., 2011) e o quiabeiro (ARANHA et al., 2011). Outro exemplo que retrata a capacidade de uma espécie viral proveniente de uma planta não-cultivada infectar uma planta cultivada é o *Sida mottle virus* (SiMoV), que é capaz de infectar naturalmente o tomateiro (COTRIM et al., 2007). Alguns estudos também demonstram que begomovírus provenientes de plantas cultivadas são capazes de infectar plantas não-cultivadas como é o caso do *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) infectando *Nicandra physaloides* (BARBOSA et al., 2009).

Essa elevada diversidade de espécies é resultante de mecanismos como mutação, recombinação e pseudo-recombinação (ROJAS et al., 2005; INOUE-NAGATA et al., 2006). As frequências de mutação observadas para geminivírus apresentam valores similares aos verificados para vírus de RNA, o que não é esperado uma vez que a maquinaria de replicação do hospedeiro, utilizada pelos

geminivírus, possui a capacidade de corrigir possíveis erros durante a replicação (DUFFY; HOLMES, 2008). Eventos de recombinação e pseudo-recombinação são apontados como os principais mecanismos responsáveis pelo surgimento e adaptação de novos begomovírus, constituindo um papel decisivo na evolução desses vírus. Experimentos com pseudo-recombinantes são ferramentas úteis no estudo de funções de genes e podem revelar importantes informações acerca das relações filogenéticas. Estudos nesse sentido demonstraram a possibilidade de formação de pseudo-recombinantes infecciosos capazes de induzir diferentes sintomas no hospedeiro (MONCI et al., 2002; LIMA et al., 2013; SILVA et al., 2014).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, L. C.; INOUE-NAGATA, A. K.; PINHEIRO, B.; RIBEIRO, S. G.; RESENDE, R.O.; MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J. A novel monopartite begomovirus infecting sweet potato in Brazil. **Archives of Virology**, v. 156, n. 7, p. 1291-1294, 2011.
- ALBUQUERQUE, L. C.; VARSANI, A.; FERNANDES, F. R.; PINHEIRO, B.; MARTIN, D. P.; FERREIRA, P. T. O.; LEMOS, T. O.; INOUE-NAGATA, A. K. Further characterization of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. **Archives of Virology**, v. 157, n. 4, p. 747-752, 2012.
- ALMEIDA, M. M. S.; JAIN, S.; BARROSO, P.A.V; HOFFMANN, L.V.; LUCENA, M.G.; RESENDE, R.O.; INOUE-NAGATA, A.K. Complete Sequence of a New Bipartite Begomovirus Infecting Cotton Plants in Brazil. **Genome Announcements**, v. 1, n. 6, e00661-13, 2013.
- ARANHA, S. D. A.; ALBUQUERQUE, L. C. D.; BOITEUX, L. S.; INOUE-NAGATA, A. K. Detection and complete genome characterization of a begomovirus infecting okra (*Abelmoschus esculentus*) in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 1, p. 14-20, 2011.
- ASSUNÇÃO, I. P.; LISTIK, A. F.; BARROS, M. C. S.; AMORIN, E. P. R.; SILVA, S. J. C.; IZAEL, O.; SILVA, O.; RAMALHO NETO, C. E.; LIMA, G. S. A. Diversidade Genética de begomovírus que infectam plantas invasoras na região nordeste. **Planta Daninha**, v. 24, n. 2, p. 239-244, 2006.
- BARBOSA, J. C.; BARRETO, S. S.; INOUE-NAGATA, A. K.; REIS, M. S.; FIRMINO, A. C.; BERGAMIN, A.; REZENDE, J. A. M. Natural infection of *Nicandra physaloides* by *Tomato severe rugose virus* in Brazil. **Journal of General Plant Pathology**, v. 75, p. 440-443, 2009.
- BARBOSA, L. F.; MARUBAYASHI, J.M.; DE MARCHI, B.R.; YUKI, V.A.; PAVAN, M.A.; MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J.; KRAUSE-SAKATE, R. Indigenous American species of the Bemisia tabaci complex are still widespread in the Americas. **Pest Management Science**, v. 70, n. 10, p. 1440-1445, 2014.
- BERNARDO, P.; GOLDEN, M.; AKRAM, M.; NAIMUDDIN, NADARAJAN, N.; FERNANDEZ, E.; GRANIER, M.; REBELO, A. G.; PETERSCHMITT, M.; MARTIN, D. P.; ROUMAGNAC, P. Identification and characterization of a highly divergent geminivirus: Evolutionary and taxonomic implications. **Virus Research**, v. 177, n. 1, p. 35-45, 2013.
- BEZERRA, I. C.; RIBEIRO, S. G.; ÁVILA, A. C.; GIORDANO, L. B. Survey of geminivirus infection in tomato producing areas in Federal District. **VIII Encontro Nacional de Virologia**, v. 16 (Resumo), p. 289, 1996.
- BEZERRA, I. C.; LIMA, M. F.; RIBEIRO, S. G.; GIORDANO, L. de B.; ÁVILA, A. C. de. Occurrence of geminivirus in tomato producing areas in Submedio São Francisco. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22 (Suplemento) p. 331, 1997.

BLAWID, R.; FONTENELE, R. S.; LACORTE, C.; RIBEIRO, S. G. Molecular and biological characterization of corchorus mottle virus, a new begomovirus from Brazil. **Archives of Virology**, v. 158, n. 12, p. 2603-2609, 2013.

BRIDDON, R. W.; PINNER, M. S.; STANLEY, J.; MARKHAM, P. G. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. **Virology**, v. 177, n. 1, p. 85-94, 1990.

BRIDDON, R.W.; PATIL, B. L.; BAGEWADI, B.; NAWAZ-UL-REHMAN, M.S.; FAUQUET, C.M. Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, n. 1, p. 97-108, 2010.

BROWN, J. K.; FAUQUET, C. M.; BRIDDON, R. W.; ZERBINI, F. M.; MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J. Geminiviridae. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: **Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. In: KING A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E.J. (Editores) London: Elsevier/ Academic Press, p. 351-373, 2012.

BROWN, J. K.; ZERBINI, F. M.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E.; SOBRINHO, R. R.; SILVA, J. C. F.; FIALLO- OLIVÉ, E.; BRIDDON, R. W.; HERNÁNDEZ- ZEPEDA, C.; IDRIS, A.; MALATHI, V. G.; MARTIN, D. P.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.; UEDA, S.; VARSANI, A. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. **Archives of Virology**, v. 160, n. 6, p. 1593-1619, 2015.

CALEGARIO, R. F.; FERREIRA, S. D. S.; DE ANDRADE, E. C.; ZERBINI, F. M. Characterization of tomato yellow spot virus, a novel tomato-infecting begomovirus in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 9, p. 1335-1343, 2007.

CASTILLO-URQUIZA, G. P.; BESERRA JR, J. E. A.; BRUCKNER, F. P.; LIMA, A. T. M.; VARSANI, A.; ALFENAS- ZERBINI, P.; ZERBINI, F. M. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Archives of Virology**, v. 153, n. 10, p. 1985-1989, 2008.

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

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

COTRIM, M. A., KRAUSE-SAKATE, R., NARITA, N., ZERBINI, F. M.; PAVAN, M. A. Diversidade genética de begomovirus em cultivo de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 33, p. 300-303, 2007.

DUFFY, S.; HOLMES, E. C. Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single- stranded DNA begomovirus Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). **Journal of Virology**, v. 82, n. 2, p. 957-965, 2008.

FARIA, J. C. SOUZA-DIAS, J. A. C., SLACK, S. e MAXWELL, D. P. A new geminivirus associated with tomato in the State of São Paulo, Brazil. **Plant Disease**, v. 81, n. 4, p. 423, 1997.

FARIA, J. C.; MAXWELL, D. P. Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. **Phytopathology**, v. 89, n. 3, p. 262-268, 1999.

FARIA, J. C.; ZERBINI, F. M. Família *Geminiviridae*: Taxonomia, replicação e movimento. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 8, p. 27- 57, 2000.

FARIA, J. C.; BEZERRA, I. C.; ZERBINI, F. M.; RIBEIRO, S. G.; LIMA, M. F. Situação atual das geminiviroses no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 125-137, 2000.

FERNANDES, F. R.; CRUZ, A. R.; FARIA, J. C.; ZERBINI, F. M.; ARAGÃO, F. J. L. Three distinct begomoviruses associated with soybean in central Brazil. **Archives of Virology**, v. 154, n. 9, p. 1567–1570, 2009.

FERNANDES, F. R.; ALBUQUERQUE, L. C.; DE OLIVEIRA, C. L.; CRUZ, A. R.; DA ROCHA, W. B.; PEREIRA, T. G.; NAITO, F. Y.; DIAS, N. M.; NAGATA, T.; FARIA, J. C.; ZERBINI, F. M.; ARAGÃO, F. J.; INOUE-NAGATA, A. K. Molecular and biological characterization of a new Brazilian begomovirus, Euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV), infecting *Euphorbia heterophylla* plants. **Archives of Virology**, v. 156, n. 11, p. 2063- 2069, 2011.

FERNANDES, J. J.; CARVALHO, M. G.; ANDRADE, E. C.; BROMMONSCHENKEL, S. H.; FONTES, E. P. B.; ZERBINI, F. M. Biological and molecular properties of Tomato rugose mosaic virus (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. **Plant Pathology**, v. 55, n. 4, p. 513-522, 2006.

FERNANDES-ACIOLI, N. A.N.; CARVALHO, R. C. P.; FONTENELE, R. S.; LACORTE, C.; RIBEIRO, S. G.; FONSECA, M. E. N.; BOITEUX, L. S. First report of *Sida micranta mosaic virus* in *Phaseolus vulgaris* in Brazil. **Plant Disease**, v. 95, n. 9, p. 1196, 2011.

FIALLO-OLIVÉ, E.; MARTÍNEZ-ZUBIAUR, Y.; MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J. A novel class of DNA satellites associated with New World begomoviruses. **Virology**, v. 426, n. 1, p. 1-6, 2012.

FIALLO - OLIVÉ, E.; ZERBINI, F. M.; NAVAS - CASTILLO, J. Complete nucleotide sequences of two new begomoviruses infecting the wild malvaceous plant *Melochia* sp. in Brazil. **Archives of Virology**, v. 160, n. 12, p. 3161-3164, 2015.

FONTENELLE, M. R.; LUZ, D. F.; GOMES, A. P.; FLORENTINO, L. H.; ZERBINI, F. M.; FONTES, E. P. B. Functional analysis of the naturally recombinant DNA-A of the bipartite begomovirus *Tomato chlorotic mottle virus*. **Virus Research**, v.126, n. 1, p. 262-267, 2007.

FONTES, E. P. B.; LUCKOW, V. A.; HANLEY-BOWDOIN, L. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. **The Plant Cell**, v. 4, n. 5, p. 597-608, 1992.

GALVÃO, R. M.; MARIANO, A. C.; LUZ, D. F.; ALFENAS, P. F.; ANDRADE, E. C.; ZERBINI, F. M.; ALMEIDA, M. R.; FONTES, E. P. B. A naturally occurring recombinant DNA-A of a typical bipartite begomovirus does not require the cognate DNA-B to infect *Nicotiana benthamiana* systemically. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 3, p. 715-726, 2003.

GUTIERREZ, C. Geminivirus DNA replication. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 56, n. 3, p. 313-329, 1999.

HANLEY-BOWDOIN, L.; SETTLAGE, S. B.; OROZCO, B. M.; NAGAR, S.; ROBERTSON, D. Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 18, n. 2, p. 71–106, 2000.

INOUE-NAGATA, A. K.; MARTIN, D. P.; BOITEUXL, L. S.; GIORDANO, L. B.; BEZERRA, I. C.; DE ÁVILA, A.C. New species emergence via recombination among isolates of the Brazilian tomato infecting Begomovirus complex. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 8, p. 1329-1332, 2006.

INOUE-NAGATA, A. K.; ÁVILA, A. C.; VILLAS BÔAS, G. L. Os geminivírus em sistema de produção integrada de tomate indústria. **Embrapa Hortaliças**. Circular Técnica, 71; 12p, 2009.

KIL, E. J.; KIM, S.; LEE, Y.; BYUN, H.; PARK, J.; SEO, H.; KIM, C.; SHIM, J.; LEE, J.; KIM, J.; LEE, K.; CHOI, H.; LEE, S. Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV-IL): a seed-transmissible geminivirus in tomatoes. **Scientific Reports**, 6, 19013, 2016.

LI, F.; XU, X.; HUANG, C.; GU, Z.; CAO, L.; HU, T.; DING, M.; LI, Z.; ZHOU, X. The AC5 protein encoded by Mungbean yellow mosaic India virus is a pathogenicity determinant that suppresses RNA silencing-based antiviral defenses. **New Phytologist**, v. 208, n.2, p. 555-569, 2015.

LIMA, A. T.; SOBRINHO, R. R.; GONZÁLEZ-AGUILERA, J.; ROCHA, C. S.; SILVA, S. J.; XAVIER, C. A.; SILVA, F. N.; DUFFY, S.; ZERBINI, F. M. Synonymous site variation due to recombination explains higher genetic variability in begomovirus populations infecting non-cultivated hosts. **Journal of General Virology**, v. 94, n. 2, p. 418-431, 2013.

MANSOOR, S.; BRIDDON, R. W.; ZAFAR, Y.; STANLEY, J. Geminivirus disease complexes: An emerging threat. **Trends in Plant Sciences**, v. 8, n.3, p. 128-134, 2003.

MELGAREJO, T. A.; KON, T.; ROJAS, M. R.; PAZ-CARRASCO, L.; ZERBINI, F. M.; GILBERTSON, L. R. Characterization of a New World Monopartite Begomovirus Causing Leaf Curl Disease of Tomato in Ecuador and Peru Reveals a New Direction in Geminivirus Evolution. **Journal of Virology**, v. 87, n. 10, p. 5397-5413, 2013.

- MONCI, F.; SANCHEZ-CAMPOS, S.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E. A natural recombinant between the geminivirus Tomato yellow leaf Curl Sardinia virus and tomato yellow leaf curl virus exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. **Virology**, v. 303, n. 2, p. 317-326, 2002.
- MORALES, F. J.; ANDERSON, P. K. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. **Archives of Virology**, v. 146, n. 3, p. 415-441, 2001.
- MORRA, M. R.; PETTY, I. T. D. Tissue Specificity of Geminivirus Infection Is Genetically Determined. **The Plant Cell**, v. 12, n. 11, p. 2259-2270, 2000.
- NAGAR, S.; PEDERSEN, T. J.; CARRICK, K. M.; HANLEY-BOWDOIN, L.; ROBERTSON, D. A Geminivirus Induces Expression of a Host DNA Synthesis Protein in Terminally Differentiated Plant Cells. **The Plant Cell**, v. 7, p. 705-719, 1995.
- NOUEIRY, A. O.; LUCAS, W. J.; GILBERTSON, R. L. Two Proteins of a Plant DNA Virus Coordinate Nuclear and Plasmodesmal Transport. **Cell**, v.76, n. 5, p. 925-932, 1994.
- PADIDAM, M.; SAWYER, S.; FAUQUET, C. M. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. **Virology**, v. 265, n. 2, p. 218-224, 1999.
- PADIDAM, M.; BEACHY, R. N.; FAUQUET, C. M. The Role of AV2 ("Precoat") and Coat Protein in Viral Replication and Movement in Tomato Leaf Curl Geminivirus. **Virology**, v. 224, n. 2, p. 390-404, 1996.
- PALMER, K. E.; RYBICKI, E. P. The Molecular Biology of Mastreviruses. **Advances in Virus Research**, v. 50, p. 183-234, 1998.
- PAPROTKA, T.; METZLER, V.; JESKE, H. The first DNA 1-like α satellites in association with New World begomoviruses in natural infections. **Virology**, v. 404, n.2, p. 148–157, 2010.
- PATIL, B. L.; FAUQUET, C. M. Cassava mosaic geminiviruses: actual knowledge and perspectives. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, n. 5, p. 685-701, 2009.
- PAZ-CARRASCO, L. C.; CASTILLO-URQUIZA, G. P.; LIMA, A. T. M.; XAVIER, C. A. D.; VIVAS-VIVAS, L. M.; MIZUBUTI, E. S. G.; ZERBINI, F. M. Begomovirus diversity in tomato crops and weeds in Ecuador and the detection of a recombinant isolate of Rhynchosia golden mosaic Yucatan virus infecting tomato. **Archives of Virology**, v. 159, n. 8, p. 2127-2132, 2014.
- PETTY, I. T. D.; COUTTS, R. H. A.; BUCK, K. W. Geminivirus coat protein gene promoter sequences can function in *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Research**, v. 14, n. 12, p. 5113, 1986.

POLSTON, J. E.; ANDERSON, P. K. The emergence of whitefly-transmitted Geminiviruses in Tomato in the Western Hemisphere. **Plant Disease**, v. 81, n. 12, p. 1358-1369, 1997.

RIBEIRO, S. G.; AMBROZEVICIUS, L. P.; ÁVILA, A. C.; BEZERRA, I. C.; CALEGARIO, R. F.; FERNANDES, J. J.; LIMA, M. F., MELLO, R. N., ROCHA, H.; ZERBINI, F. M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. **Archives of Virology**, v. 148, n.2, p. 281-295, 2003.

RIDGEN, J. E.; DRY, I. B.; KRAKE, L. R.; RZAIAN, M. A. Plant virus DNA replication processes in *Agrobacterium*: insight into the origins of the geminivirus? **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 19, p. 10280-10284, 1996.

ROCHA, C. S. R.; CASTILLO-URQUIZA, G. P.; LIMA, A. T. M.; SILVA, F. N.; XAVIER, C. A. D.; HORA-JÚNIOR, B. T.; BESERRA- JÚNIOR, J. E. A.; MALTA, A. W. O.; MARTIN, D. P.; VARSANI, A.; ALFENAS-ZERBINI, P.; MIZUBUTI, E. S. G.; ZERBINI, F. M. Brazilian Begomovirus Populations are Highly Recombinant, Rapidly Evolving, and Segregated Based on Geographical Location. **Journal of Virology**, v. 87, n. 10, p. 5784–5799, 2013.

ROJAS, M. R.; HAGEN, C.; LUCAS, W. J.; GILBERTSON, R. L. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 361-394, 2005.

ROMAY, G.; CHIRINOS, D.; GERAUD-POUEY, F.; DESBIEZ, C. Association of an atypical alphasatellite with a bipartite New World begomovirus. **Archives of Virology**, v. 155, n. 11, p. 1843-1847, 2010.

ROSARIO, K.; PADILLA-RODRIGUEZA, M.; KRABERGERB, S.; STANTONB, D.; MARTIN, D. P.; BREITBARTA, M.; VARSANI, A. Discovery of a novel mastrevirus and alphasatellite-like circular DNA in dragonflies (Ephemeroptera) from Puerto Rico. **Virus Research**, v. 171, n. 1, p. 231-237, 2013.

ROUMAGNAC, P.; GRANIER, M.; BERNARDO, P.; DESHOUX, M.; FERDINAND, R.; GALZI, S.; FERNANDEZ, E.; JULIAN, C.; ABT, I.; FILLOUX, D.; MESLÉARD, F.; VARSANI, A.; BLANC, S.; MARTIN, D. P.; PETERSCHMITTA, M. Alfalfa Leaf Curl Virus: an Aphid-Transmitted Geminivirus. **Journal of Virology**, v. 89, n. 18, p. 9683-9688, 2015.

RYBICKI, E. P. A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of Geminiviridae. **Archives of Virology**, v.139, n. 1, p. 49-77, 1994.

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

SILVA, S. J. C.; CASTILLO-URQUIZA, G. P.; HORA-JÚNIOR, B. T.; ASSUNÇÃO, I. P.; LIMA, G. S. A.; PIO-RIBEIRO, G.; MIZUBUTI, E. S. G.; ZERBINI, F. M. High genetic variability and recombination in a begomovirus population infecting the ubiquitous weed *Cleome affinis* in northeastern Brazil. **Archives of Virology**, v. 156, n. 12, p. 2205-2213, 2011.

SILVA, S. J. C.; CASTILLO-URQUIZA, G. P.; HORA-JÚNIOR, B. T.; ASSUNÇÃO, I. P.; LIMA, G. S. A.; PIO-RIBEIRO, G.; MIZUBUTI, E. S. G.; ZERBINI, F. M. Species diversity, phylogeny and genetic variability of begomovirus populations infecting leguminous weeds in northeastern Brazil. **Plant Pathology**, v. 61, n. 3, p. 457-467, 2012.

SILVA, F. N.; LIMA, A. T. M.; ROCHA, C. S.; CASTILLO-URQUIZA, G. P.; ALVES-JÚNIOR, M.; ZERBINI, F. M. Recombination and pseudorecombination driving the evolution of the begomoviruses *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) and *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV): two recombinant DNA-A components sharing the same DNA-B. **Virology Journal**, v. 11, p. 66-76, 2014.

SOBRINHO, R. R.; XAVIER, C. D. A.; PEREIRA, H. M.; LIMA, G. S.; ASSUNÇÃO, I. P.; MIZUBUTI, E. S.; ZERBINI, F. M. Contrasting genetic structure between two begomoviruses infecting the same leguminous hosts. **Journal of General Virology**, v. 95, n. 11, p. 2540-2552, 2014.

SUNTER, G.; HARTITZ, M. D.; HORMUZDI, S. G.; BROUGH, C. L.; BISANO, D. M. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required for coat protein accumulation while ORF L3 is necessary for efficient DNA replication. **Virology**, v. 179, n. 1, p. 69-77, 1990.

TAVARES, S. S.; SOBRINHO, R. R.; GONZÁLEZ-AGUILERA, J.; LIMA, G. S. A.; ASSUNÇÃO, I.P.; ZERBINI, F.M. Further molecular characterization of weed-associated begomovirus in Brazil with emphasis on *Sida* spp. **Planta Daninha**, v. 30, n. 2, p. 305-315, 2012.

VANITHARANI R.; CHELLAPPAN, P.; PITA, J. S.; FAUQUET, C. M. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. **Journal of Virology**, v. 78, n. 17, p. 9487-9498, 2004.

VARSANI, A.; NAVAS-XASTILLO, J.; MORIONES, E.; HERNÁNDEZ-ZEPEDA, C.; IDRIS, A.; BROWN, J. K.; ZERBINI, F. M.; MARTIN, D. P. Establishment of three new genera in the family Geminiviridae: Becurtovirus, Eragrovirus and Turncurovirus. **Archives of Virology**, v.159, n. 8, p. 2193-2203, 2014.

ZERBINI, F.M.; ANDRADE, E.C.; BARROS, D. R.; FERREIRA, S. S.; LIMA, A. T. M.; ALFENAS, P. F.; MELLO, R. N. Traditional and novel strategies for geminivirus management in Brazil. **Australasian Plant Pathology**, v.34, n. 4, p. 475-480, 2005.

CAPÍTULO 1

3. DIVERSIDADE DE ESPÉCIES E FILOGENIA DE BEGOMOVÍRUS QUE INFECTAM PLANTAS NÃO-CULTIVADAS NOS ESTADOS DO CEARÁ E PIAUÍ

Resumo

Este estudo foi realizado a fim de identificar as espécies de begomovírus que infectam plantas não-cultivadas, de diferentes famílias, em dois estados da região nordeste do Brasil. O DNA total foi extraído a partir de amostras foliares com sintomas de mosaico e submetido à amplificação por círculo rolante. Após a clivagem com endonucleases de restrição, as amostras foram clonadas e sequenciadas. Foram obtidos 26 clones (17 DNA-A e 9 DNA-B) de begomovírus, incluindo cinco pares cognatos (DNA-A e DNA-B). Com base na comparação de sequências completas do DNA-A foram identificadas oito espécies de begomovírus, sendo cinco delas novas. Na análise filogenética, sete espécies agruparam com outros begomovírus brasileiros, mas uma espécie agrupou com vírus identificados em plantas não-cultivadas do México. É demonstrada evidência de recombinação entre isolados das espécies descritas. Além disso, é relatada pela primeira vez, no Brasil, a infecção de *Wissadula* sp. por begomovírus. Com base nos hospedeiros e nos sintomas induzidos por cada isolado, são propostos os nomes *Macroptilium common mosaic virus* (MaCMV), *Macroptilium bright mosaic virus* (MaBMV), *Sida chlorotic vein virus* (SiCVV), *Sida angular mosaic virus* (SiAMV) e *Wissadula yellow mosaic virus* (WYMV).

Palavras-chave: Geminivirus, *Macroptilium*, novas espécies, *Sida*.

SPECIES DIVERSITY AND PHYLOGENY OF BEGOMOVIRUS INFECTING NON-CULTIVATED PLANTS IN THE STATES OF CEARÁ AND PIAUÍ

Abstract

This study was carried in order to identify the species of begomovirus that infect non-cultivated plants, from different families, in two states of northeastern region of Brazil. The DNA total was extracted from leaf samples with mosaic symptoms and subjected to rolling circle amplification. After digestion with restriction endonucleases, the samples were cloned and sequenced. Twenty-six clones were obtained (17 DNA-A and 9 DNA-B) begomoviruses, including five cognate pairs (DNA-A and DNA-B). On the basis of comparison of complete sequences of DNA-A component, eight species of begomovirus were identified, five of them new. In phylogenetic analysis, seven species grouped with other Brazilian begomovirus, but one them grouped with virus identified in non-cultivated plants of the México. It is demonstrated evidence of recombination between isolates of the species described. Moreover, it is reported for the first time, in Brazil, the infection *Wissadula* sp. by begomovirus. On the basis on hosts and symptoms induced by each individual, are proposed the names *Macrotillium* common mosaic virus (MaCMV), *Macrotillium* bright mosaic virus (MaBMV), *Sida* chlorotic vein virus (SiCVV), *Sida* angular mosaic virus (SiAMV) and *Wissadula* yellow mosaic virus (WYMV).

Keywords: Geminivirus, *Macrotillium*, new species, *Sida*.

3.1 Introdução

A família *Geminiviridae*, composta pelos gêneros *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus*, e *Turncurtovirus*, compreende vírus constituídos por DNA de fita simples circular encapsidados em uma partícula icosaédrica, capazes de infectar plantas monocotiledôneas ou dicotiledôneas (BROWN et al., 2012; VARSANI et al., 2014). A classificação em cada gênero ocorre de acordo com a organização genômica, tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros e relacionamento filogenético (ROJAS et al., 2005).

Os begomovírus são caracterizados por possuírem, na maioria, dois componentes genômicos (DNA-A e DNA-B) e infectarem apenas plantas dicotiledôneas (BROWN et al., 2012). A infecção por esses vírus causa perdas significativas em várias culturas de importância econômica em todo o mundo (MORALES; ANDERSON, 2001; PATIL; FAUQUET, 2009).

No Brasil, culturas como o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), tomate (*Solanum lycopersicon* Mill), quiabo (*Abelmoschus esculentus* L. Moench), pimentão (*Capsicum annuum* L.) e soja (*Glycine max* L.), dentre outras, são infectadas por begomovírus (FERNANDES et al., 2008; ARANHA et al., 2011; COCO et al., 2013). Estudos em diferentes regiões do país apontam uma elevada diversidade de espécies de begomovírus nessas hospedeiras, assim como elevado grau de variabilidade genética (CASTILLO-URQUIZA et al., 2008; FERNANDES et al., 2009; ALBUQUERQUE et al., 2012).

Além de espécies cultivadas, uma ampla gama de plantas não-cultivadas também é infectada por begomovírus e estudos apontam uma variabilidade genética até maior que a encontrada em plantas cultivadas (SILVA et al., 2012; TAVARES et al., 2012; SOBRINHO et al., 2014). O estreito relacionamento filogenético entre vírus que infectam plantas cultivadas e vírus que infectam plantas não-cultivadas sugere que estas desempenham um papel importante na manutenção e disseminação desses vírus em campo, atuando como fonte de inóculo e reservatório natural. Isso favorece a ocorrência de eventos de recombinação e pseudo-recombinação (ROCHA et al., 2013; PAZ-CARRASCO et al., 2014; SILVA et al., 2014) e assim propicia a ocorrência de epidemias, uma vez que já foi relatada a infecção natural de plantas daninhas por begomovírus que infectam plantas cultivadas e vice-versa (CASTILLO-URQUIZA et al., 2008; BARBOSA et al., 2009; ARANHA et al., 2011).

A identificação e caracterização de begomovírus infectando plantas não-cultivadas são cruciais para subsidiar estudos que visem uma melhor compreensão da interação e evolução destes vírus com as plantas hospedeiras, permitindo, portanto, o desenvolvimento de pesquisas que visem a obtenção de resistência genética e o respectivo controle do patógeno.

O objetivo deste estudo foi caracterizar begomovírus que infectam plantas não-cultivadas em dois estados da região nordeste do Brasil.

3.2 Material e métodos

Material vegetal

Trinta e cinco amostras de plantas não-cultivadas de quatro diferentes famílias (Brassicaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae e Malvaceae) com sintomas típicos de infecção por begomovírus foram coletadas em municípios dos estados do Piauí e Ceará, em diferentes épocas e anos, a fim de verificar sua ocorrência e diversidade (Figuras 1 e 2; Tabela 1). A identificação das plantas foi realizada por especialistas do Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí. As amostras foram prensadas, dessecadas, e preservadas a temperatura ambiente.

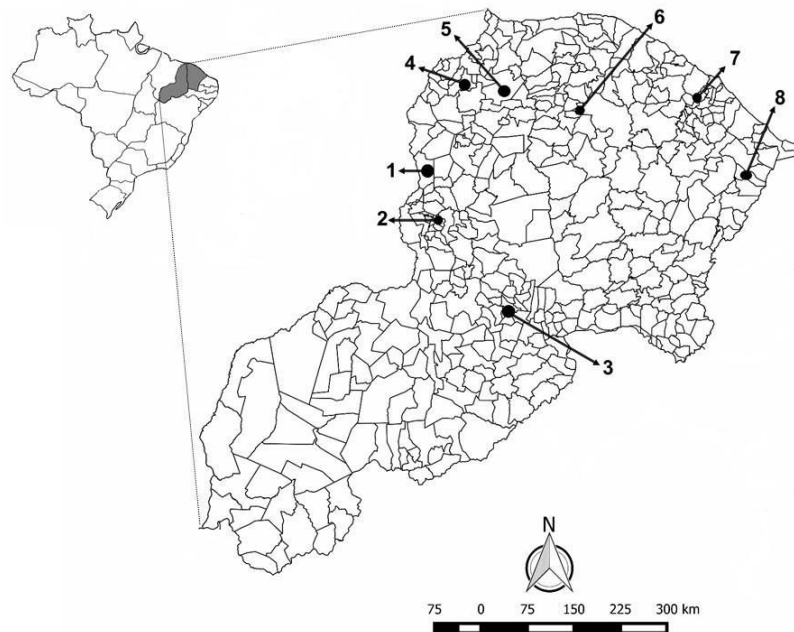


Figura 1: Localização geográfica dos estados e municípios onde as amostras foram coletadas: Teresina (1); Barro Duro (2); Picos (3); Esperantina (4) e Piracuruca (5) no estado do Piauí e Varjota (6), Maranguape (7) e Limoeiro (8) no estado do Ceará.

Amplificação e clonagem

As amostras coletadas foram submetidas à extração de DNA conforme Dellaporta et al. (1983). A partir do DNA total extraído, foi realizada a reação de amplificação por círculo rolante (RCA) utilizando-se a DNA polimerase do fago phi29, de acordo com o método descrito por Inoue-Nagata et al. (2004). O produto da reação de amplificação foi submetido à clivagem com as endonucleases de restrição *Apal*, *BamHI*, *ClaI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *KpnI*, *SacI* e *XhoI* a fim de se obter unidades monoméricas dos genomas virais. Posteriormente, foram clonados no vetor pBluescript KS+ (Stratagene) e sequenciados (Macrogen, Inc., Seul, Coréia do Sul) por “primer walking”.

Comparações de sequência e análise filogenética

As sequências correspondentes a cada componente genômico foram inicialmente submetidas ao algoritmo BLAST n (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), onde foram comparadas com outras sequências de begomovírus disponíveis no banco de dados. As sequências foram alinhadas com MUSCLE (EDGAR, 2004) utilizando-se o programa MEGA v. 6.0 (TAMURA et al., 2013) e, a seguir, aquelas mais relacionadas foram determinadas pela ferramenta de demarcação de espécies SDT v.1.2 (MUHIRE et al., 2014). As árvores filogenéticas dos DNA-A e DNA-B foram geradas usando inferência Bayesiana, utilizando MrBayes v.3.0b4 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001) com o modelo de substituição de nucleotídeos selecionado pelo MrModeltest v. 2.2 baseado no “Information Criterion” (AIC). As análises foram realizadas por 30,000,000 gerações e a amostragem em cada 1,000 passos para produzir a árvore de distribuição. A caracterização das ORFs foi feita com o programa online ORF Finder (www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html).

Análise de recombinação

Para identificar possíveis recombinantes, uma análise de filogenia reticulada foi realizada utilizando o software SplitsTree4 (HUSON; BRYANT, 2006). Para confirmar os possíveis eventos de recombinação utilizou-se o software RDP3 v. 3.4 (MARTIN et al., 2010), a partir do alinhamento gerado no MEGA v.6.0. Como forma de evitar resultados não confiáveis, foram considerados apenas eventos de recombinação detectados, no mínimo, por quatro dos sete métodos implementados no programa.

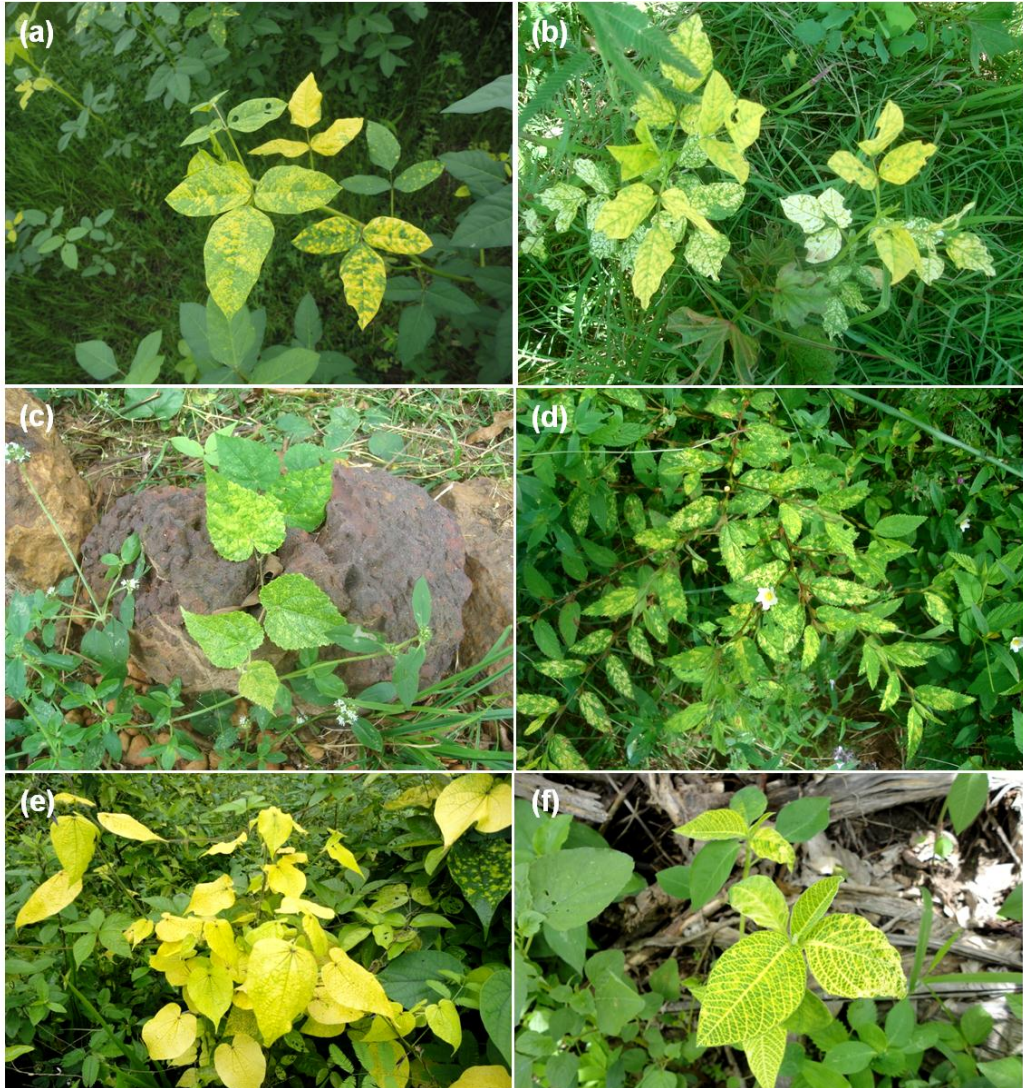


Figura 2: Sintomas em plantas não-cultivadas infectadas por begomovírus no nordeste do Brasil: a) *Macropodium lathyroides* (amostra 2); b) *M. lathyroides* (amostra 28); c) *Sida urens* (amostra 15); d) *Sida acuta* (amostra 30); e) *Wissadula* sp. (amostra 35); f) *Euphorbia heterophylla* (amostra 23).

3.3 Resultados e discussão

Comparação de sequências

Das 35 amostras coletadas, 21 foram positivas para infecção por begomovírus. Foram obtidos 175 clones e 26 foram selecionados para sequenciamento, dos quais consistiram em 17 DNA-A e 9 DNA-B, dentre eles cinco pares cognatos (Tabela 1). Com base no critério de demarcação de espécies de begomovírus, que considera o valor mínimo de 91% de identidade entre sequências completas do DNA-A, foi possível evidenciar a presença de oito espécies de begomovírus, sendo cinco delas novas.

A porcentagem de identidade nucleotídica correspondente às sequências completas de DNA-A dos clones obtidos neste estudo e outros begomovírus já descritos encontra-se na Tabela 2. As amostras representadas pelos clones ALS1_2E (2678 nt) e ALS39_4B (2677 nt) (95% de identidade entre si), provenientes de *Sida* sp. correspondem a um isolado da espécie *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV), com a sequência completa do componente DNA-A apresentando 94% de identidade com o isolado SimMV (NC005330). O clone ALM13_2X (2658 nt) oriundo de *Macroptilium lathyroides* apresentou 95% de identidade com o isolado *Macroptilium yellow spot virus* (MaYSV) (NC016000) pertencendo, portanto, a esta espécie. O isolado obtido de *Euphorbia heterophylla* (clone ALE23_1A, 2604 nt) pertence à espécie *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV), visto que apresentou 95% de identidade com a sequência do isolado EuYMV (NC012553).

Os clones ALM2_5B (2632 nt) e ALM9_2A (2629 nt) (97% de identidade entre si), ambos provenientes também de *M. lathyroides*, correspondem a uma nova espécie, uma vez que apresentou o maior valor de identidade (87%) com *Macroptilium yellow vein virus* (MaYVV) (NC017000) e *Bean golden mosaic virus* (BGMV) (NC004042) (Tabela 2), ambas espécies virais identificadas em fabáceas. Propomos o nome de *Macroptilium common mosaic virus* (MaCMV) para esta espécie.

Os clones ALS15_2C (2654 nt) e ALS21_2E (2654 nt) provenientes de *Sida urens* apresentaram 96% de identidade entre si e o maior valor de identidade foi de 82% com *Tomato leaf distortion virus* (ToLDV) (KC706605) (Tabela 2), um begomovírus descrito inicialmente em tomateiro (CASTILLO-URQUIZA et al., 2008), e para o qual propomos o nome de *Sida chlorotic vein virus* (SiCVV).

Tabela 1- Procedência e clones correspondentes aos componentes completos de DNA-A e DNA-B obtidos das amostras de daninhas coletadas no estado do Piauí (PI) e Ceará (CE).

Amostra	Hospedeiro	Procedência	Data da coleta	Clone		Espécie viral ^c
				DNA-A ^a	DNA-B	
1	<i>Sida spinosa</i>	Teresina, PI	Mai/09	ALS1_2E	-	SimMV
2	<i>Macroptilium lathyroides</i>	Teresina, PI	Mai/09	ALM2_5B	BLM2_1S	<u>MaCMV^d</u>
4	<i>Sidastrum micranthum</i>	Manguarape, CE	Mai/09	- ^b	BLS4_2B	
9	<i>M. lathyroides</i>	Limoeiro, CE	Dez/08	ALM9_2A	-	MaCMV
13	<i>M. lathyroides</i>	Varjota, CE	Jul/08	ALM13_2X	-	MaYSV
15	<i>Sida urens</i>	Teresina, PI	Jun/08	ALS15_2C	BLS15_2E	<u>SiCVV</u>
16	<i>Sida acuta</i>	Piracuruca, PI	Fev/14	-	BLS16_3B	
17	<i>S. spinosa</i>	Piracuruca, PI	Fev/14	ALS17_1A	-	<u>SiAMV</u>
20	<i>S. acuta</i>	Teresina, PI	Fev/14	ALS20_1C	-	SiAMV
21	<i>S. urens</i>	Teresina, PI	Fev/14	ALS21_2E	BLS21_2A	SiCVV
22	<i>Cleome affinis</i>	Teresina, PI	Fev/14	-	BLC22_2B	
23	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Teresina, PI	Fev/14	ALE23_1A	-	EuYMV
28	<i>M. lathyroides</i>	Esperantina, PI	Fev/14	ALM28_3A	-	<u>MaBMV</u>
29	<i>Sida</i> sp.	Esperantina, PI	Fev/14	ALS29_1E	-	SiAMV
30	<i>S. acuta</i>	Esperantina, PI	Fev/14	ALS30_4C	BLS30_2H	SiAMV
31	<i>S. acuta</i>	Esperantina, PI	Fev/14	ALS31_5B	-	SiAMV
33	<i>M. lathyroides</i>	Esperantina, PI	Fev/14	ALM33_5B	-	MaBMV
34	<i>S. micranthum</i>	Esperantina, PI	Fev/14	-	BLS34_5B	
35	<i>Wissadula</i> sp.	Esperantina, PI	Fev/14	ALW35_5B	-	<u>WYMV</u>

Tabela 1- Procedência e clones correspondentes aos componentes completos de DNA-A e DNA-B obtidos das amostras de daninhas coletadas no estado do Piauí (PI) e Ceará (CE).

Amostra	Hospedeiro	Procedência	Data da coleta	Clone		Espécie viral ^c
				DNA-A ^a	DNA-B	
37	<i>Sida</i> sp.	Barro Duro, PI	Mai/14	ALS37_1B	-	WYMV
39	<i>Sida</i> sp.	Picos, PI	Mai/14	ALS39_4B	BLS39_2B	SimMV

Clones destacados em negrito correspondem a novas espécies, de acordo com o critério de demarcação de espécies de begomovírus estabelecido pelo ICTV que considera o mínimo de 91% de identidade nucleotídica entre sequências completas de DNA-A;

^b Componente genômico não obtido;

^c SimMV (*Sida micranta mosaic virus*); MaCMV (*Macroptilium common mosaic virus*), MaYSV (*Macroptilium yellow spot virus*); SiCVV (*Sida chlorotic vein virus*), SiAMV (*Sida angular mosaic virus*), EuYMV (*Euphorbia yellow mosaic virus*); MaBMV (*Macroptilium bright mosaic virus*), WYMV (*Wissadula yellow mosaic virus*).

^d Espécies sublinhadas são descritas pela primeira vez.

conclusão

Os clones ALS17_1A (2689 nt) proveniente de *Sida spinosa*, ALS20_1C (2696 nt), ALS29_1E (2691 nt), ALS30_4C (2692 nt) e ALS31_5B (2690 nt) de *Sida* sp. representam uma única espécie, de nome proposto *Sida angular mosaic virus* (SiAMV), e apresentaram menos de 84% de identidade com outros begomovírus descritos (Tabela 2). Os clones apresentaram o maior valor de identidade (82%) com a espécie ToLDV, exceto o clone ALS20_1C que apresentou 83% de identidade com *Sida yellow blotch virus* (SiYBV) (NC020254). De fato, dos cinco clones, o ALS20_1C foi o que apresentou o menor valor de identidade entre si (91%), enquanto os outros quatro tiveram mais que 94%.

Os clones ALM28_3A (2629 nt) e ALM33_5B (2636 nt) obtidos de *M. lathyroides* representam a quarta nova espécie, com o maior valor de identidade (82%) com MaYSV (NC016000) a qual propomos o nome de *Macroptilium bright mosaic virus* (MaBMV). A quinta nova espécie é representada pelos clones ALW35_3B (2621 nt) e ALS37_1B (2618 nt) obtidos de *Wissadula* sp. e *Sida* sp. respectivamente, e que apresentaram 81% de identidade com a espécie *Abutilon golden mosaic Yucatan virus* (AbGMYuV) (KC430935), um vírus obtido a partir de plantas não-cultivadas do México (Tabela 2). Para esta espécie propomos o nome de *Wissadula yellow mosaic virus* (WYMV).

Foram obtidos os pares de DNA (A e B) das amostras 2, 15, 21, 30 e 39, e todos apresentaram iterons idênticos, confirmando serem componentes cognatos: GGTG para a amostra 2, GAGTA para as amostras 15, 21 e 30 e GGGG para 39.

A espécie representada pelos clones ALS15_2C e ALS21_2E é diferente da representada pelos clones ALS17_1A, ALS29_1E, ALS30_4C e ALS31_5B, mas ambas as espécies apresentaram a mesma sequência de iterons (GAGTA), o que infere a possibilidade de ocorrência de evento de pseudorecombinação entre elas. O clone ALS20_1C, embora represente a mesma espécie dos clones ALS17_1A, ALS29_1E, ALS30_4C e ALS31_5B, apresenta iteron diferente deles (GGTG).

Foi obtido apenas o DNA-B das amostras 4 (clone BLS4_2B, 2519 nt), 16 (clone BLS16_3B, 2633 nt), 22 (clone BLC22_2B, 2612 nt) e 34 (clone BLS34_5B, 2640 nt) (Tabela 1). As sequências de DNA-B das amostras 16, 30 e 34 apresentaram 92% ou mais de identidade entre si, o que sugere a possibilidade de pertencerem à mesma espécie (dados não mostrados).

Tabela 2: Porcentagem de identidade nucleotídica entre as sequências completas de DNA-A dos isolados obtidos no estudo e outros begomovírus descritos. O número de acesso de cada isolado encontra-se na Tabela 3.

	AhGMYuV	BGMV	DeLDV	EuYMV	MaYSV	MaYVW	OxYVW	SimMV	SiYBV	ToLDV	ALS1_2E	ALM2_5B	ALM9_2A	ALM13_2X	ALS15_2C	ALS17_1A	ALS20_1C	ALS21_2E	ALE23_1A	ALM28_3A	ALS29_1E	ALS30_4C	ALS31_5B	ALM33_5B	ALW35_5B	ALS37_1B	ALS39_4B
AbGMYuV	73	85	77	74	73	75	74	76	76	75	74	73	73	75	74	74	75	77	74	74	74	74	74	74	81	81	75
BGMV	-	73	72	80	86	77	76	76	79	77	87	86	80	76	76	76	76	72	79	76	76	76	76	79	73	73	76
DeLDV		-	77	75	73	75	74	74	76	75	73	73	74	74	75	76	75	78	74	76	75	75	74	81	80	75	
EuYMV			-	72	72	73	71	73	74	71	73	72	73	72	72	73	95	73	73	71	72	72	72	75	75	71	
MaYSV				-	80	77	76	78	78	77	82	82	95	76	76	77	76	72	82	76	75	76	82	72	72	77	
MaYVW					-	78	76	76	79	77	87	87	81	76	76	75	77	72	80	77	76	76	80	73	73	77	
OxYVW						-	83	82	84	82	77	77	77	81	82	81	82	72	77	82	82	83	77	75	74	82	
SimMV							-	82	84	95	76	76	76	80	81	81	80	72	76	81	81	82	77	73	73	94	
SiYBV								-	83	82	76	76	79	80	81	83	79	73	78	81	81	82	79	74	73	82	
ToLDV									-	83	79	79	79	82	82	82	82	74	77	83	82	83	77	74	73	84	
ALS1_2E										-	77	77	77	80	81	82	80	73	77	82	81	82	77	73	72	95	
ALM2_5B											-	97	82	76	76	75	76	74	79	76	76	76	79	73	73	77	
ALM9_2A												-	82	76	75	75	77	74	79	76	75	76	79	73	72	77	
ALM13_2X													-	76	76	77	76	73	82	76	76	76	82	73	72	77	
ALS15_2C														-	83	79	96	73	76	83	83	83	76	74	74	80	
ALS17_1A															-	91	84	72	76	95	97	96	76	74	74	81	
ALS20_1C																-	79	72	77	91	91	91	76	74	74	81	

continua

Tabela 2: Porcentagem de identidade nucleotídica entre as sequências completas de DNA-A dos isolados obtidos no estudo e outros begomovírus descritos. O número de acesso de cada isolado encontra-se na Tabela 3.

	AbGMYuV	RGMV	DeLDV	EuYMV	MaYSV	MaYVW	OxYVW	SimMV	SiYBV	ToLDV	ALS1_2E	ALM2_5B	ALM9_2A	ALM13_2X	ALS15_2C	ALS17_1A	ALS20_1C	ALS21_2E	ALE23_1A	ALM28_3A	ALS29_1E	ALS30_4C	ALS31_5B	ALM33_5B	ALW35_5B	ALS37_1B	ALS39_4B
ALS21_2E																		-	72	76	84	83	84	76	75	74	79
ALE23_1A																			-	72	73	71	72	72	76	75	73
ALM28_3A																				-	76	76	76	97	72	72	77
ALS29_1E																					-	94	94	76	74	74	81
ALS30_4C																						-	96	76	74	73	80
ALS31_5B																							-	77	74	74	82
ALM33_5B																								-	72	72	77
ALW35_5B																									-	93	73
ALS37_1B																										-	72
ALS39_4B																											-

conclusão

Tabela 3: Sequências de begomovírus do Novo Mundo (NW) utilizadas na comparação de identidade nucleotídica de DNA-A utilizadas neste estudo.

Espécie	Acrônimo	Nº de acesso GenBank
<i>Abutilon golden mosaic Yucatan virus</i>	AbGMYuV	KC430935
<i>Bean golden mosaic virus</i>	BGMV	NC004042
<i>Desmodium leaf distortion virus</i>	DeLDV	NC008494
<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i>	EuYMV	NC012553
<i>Macroptilium yellow spot virus</i>	MaYSV	NC016999
<i>Macroptilium yellow vein virus</i>	MaYVV	NC017000
<i>Oxalis yellow vein virus</i>	OxYVV	NC026253
<i>Sida micrantha mosaic virus</i>	SimMV	NC005330
<i>Sida yellow blotch virus</i>	SiYBV	NC020254
<i>Tomato leaf distortion virus</i>	ToLDV	KC706605

Todos os clones apresentaram organização genômica típica de begomovírus do Novo Mundo, com pelo menos cinco ORFs no DNA-A e duas ORFs no DNA-B; adicionalmente alguns apresentaram também a ORF AC5 (Tabela 4). Curiosamente, a sequência dos clones ALS21_2E, ALE23_1A e ALS37_1B apresentou a AC4 acima do tamanho esperado para os begomovírus. Isto pode inferir uma variação genética necessária à adaptação destes vírus, entretanto estudos envolvendo mutações em regiões específicas são necessários para confirmar tal suposição. A Região Comum (RC) de todas as espécies descritas possui o nonanucleotídeo conservado (5'-TAATATT//AC-3') como parte do "stem-loop" da origem de replicação.

Análise filogenética

A análise filogenética foi realizada com base na sequência completa dos componentes DNA-A e DNA-B de todos os isolados obtidos neste estudo e outros begomovírus das Américas. Com base na análise das sequências de DNA-A foi possível visualizar a formação de três grupos monofiléticos (Figura 3). O grupo I consiste predominantemente por begomovírus das Américas Central e do Norte, enquanto os grupos II e III são formados predominantemente por begomovírus brasileiros.

O primeiro grupo, com 78% “Bayesiana posterior probability” (Bpp), inclui o isolado EuYMV (clone ALE23_1A), e a nova espécie WYMV (clones ALW35_3B e ALS37_1B) obtidos de *Wissadula* sp. e *Sida* sp., e outros begomovírus das Américas (Brasil, Porto Rico, Estados Unidos e México) (Figura 3). WYMV apresentou-se estreitamente relacionado com CLCrV (*Cotton leaf crumple virus*) (78% Bpp), um begomovírus brasileiro que infecta algodoeiro na Califórnia e com AbGMYuV (100% Bpp), um begomovírus identificado em *Abutilon* sp. no México (HERNÁNDES-ZEPEDA et al., 2009). Este fato demonstra relacionamento próximo entre vírus identificados no Brasil e vírus de outros países das Américas, o que já foi relatado anteriormente (CASTILLO-URQUIZA et al., 2008). Levando em consideração os dados do grupo I, é possível observar um relacionamento filogenético próximo entre diversos isolados virais provenientes de diferentes hospedeiros e de diferentes países, assim como uma única espécie viral infectando hospedeiras diferentes, o que reflete a diversidade e a capacidade desses vírus infectarem diferentes hospedeiras, favorecendo a ocorrência de eventos de recombinação podendo levar ao surgimento de novas espécies (SILVA et al., 2014).

O segundo grupo, com 69% Bpp, incluiu as novas espécies de *Sida* spp., SiCVV (clones ALS15_2C e ALS21_2E) e SiAMV (clones ALS17_1A, ALS20_1C, ALS29_1E, ALS30_4C e ALS31_5B), as quais são filogeneticamente relacionadas com ToMIMV, uma espécie isolada de tomateiro, mas que tem relacionamento filogenético com vírus de *Sida* spp. (CASTILLO-URQUIZA et al., 2008). Nesse grupo também está presente o isolado de SimMV (clones ALS1-2E e ALS39-4B), juntamente com espécies brasileiras de begomovírus de *Sida* (SimMV, SiMoV e SiYMV), *Leonurus* sp. (LeMV), tomateiro (ToYSV) e quiabeiro (OMoV) (Figura 3).

O terceiro grupo (100% Bpp) foi formado por espécies brasileiras e bolivianas de begomovírus que infectam espécies não-cultivadas (*Sida*, *Blainvillea*, *Cleome* e *Macroptilium*) e cultivadas (tomateiro, feijoeiro e maracujazeiro), juntamente com as novas espécies MaCMV (ALM2_5B e ALM9_2A) e MaBMV (clones ALM28_3A e ALM33_5B) (Figura 3). As novas espécies MaCMV e MaBMV apresentou-se próximas filogeneticamente entre si, e das espécies BGMV e MaYSV, ambas infectam fabáceas, além de

Blainvillea yellow spot virus (BIYSV), também um begomovírus que infecta planta não-cultivada no Brasil (Figura 3).

Tabela 4: Caracterização das ORF's correspondentes aos componentes DNA-A e DNA-B das espécies virais obtidas neste estudo.

Clone	DNA-A (nt/aa)						Clone	DNA-B (nt/aa)	
	Rep	Trap	Ren	AC4	AC5	CP		NSP	MP
ALS1_2E	1080/359	390/129	399/132	261/86	276/91	756/251			
ALM2_5B	1092/363	399/132	402/133	258/85	318/105	756/251	BLM2_1S	771/256	882/293
ALM9_2A	1092/363	396/131	399/132	258/85	318/105	756/251			
ALM13_2X	1047/348	390/129	399/132	258/85	318/105	756/251			
ALS15_2C	1101/366	405/134	399/132	258/85	- ^a	756/251	BLS15_2E	771/256	882/293
ALS17_1A	1086/361	390/129	399/132	258/85	318/105	750/249			
ALS20_1C	1086/361	390/129	399/132	258/85	318/105	750/249			
ALS21_2E	1101/366	405/134	399/132	258/85	-	756/251	BLS21_2A	771/256	792/263*
ALE23_1A	1077/358	390/129	399/132	363/120	-	750/249			
ALM28_3A	1086/361	390/129	399/132	258/85	-	756/251			
ALS29_1E	1089/362	390/129	399/132	258/85	318/105	750/249			
ALS30_4C	1089/362	390/129	399/132	258/85	318/105	750/249			
ALS31_5B	1086/361	390/129	399/132	258/85	318/105	750/249			
ALM33_5B	1089/362	390/129	399/132	258/85	-	756/251			
ALW35_5B	1083/360	390/129	399/132	396/131	-	756/251			
ALS37_1B	1065/354	390/129	399/132	393/130	-	756/251			
ALS39_4B	1077/358	420/139	399/132	258/85	276/91	756/251			
							BLS4_2B	771/256	882/293
							BLS16_3B	771/256	882/293
							BLC22_2B	774/257	882/293
							BLS34_5B	771/256	882/293

^a ORF não identificada

*ORF truncada



0.2

Figura 3: Reconstrução da árvore filogenética usando a inferência Bayesiana. A árvore foi baseada na sequência completa de DNA-A dos begomovírus descritos neste trabalho e outros begomovírus do Novo Mundo. Um isolado de begomovírus do Velho Mundo foi utilizado como out group. AbGMYuV, *Abutilon golden mosaic Yucatan virus*; AbMBV, *Abutilon mosaic Brazil virus*; AbMBoV, *Abutilon mosaic Bolívia virus*; AbMV, *Abutilon mosaic virus*; ACMV, *Africa cassava mosaic virus*; BDMV, *Bean dwarf mosaic virus*; BGMV, *Bean golden mosaic virus*; BIYSV, *Blainvillea yellow spot virus*; CILCV, *Cleome leaf crumple virus*; CoYSV, *Corchorus yellow spot virus*; CLCrV, *Cotton leaf crumple virus*; EuMV, *Euphorbia mosaic virus*; EuYMV, *Euphorbia yellow mosaic virus*; LeMV, *Leonurus mosaic virus*; MaYSV, *Macroptilium yellow spot virus*; OMoV, *Okra mottle virus*; PSLDV, *Passionfruit severe leaf distortion virus*; RhGMYuV, *Rhynchosia golden mosaic Yucatan virus*; SiGMV, *Sida golden mosaic virus*; SiMMV, *Sida micrantha mosaic virus*; SiMBoV, *Sida mosaic Bolívia virus*; SiMoV, *Sida mottle virus*; SiYLCV, *Sida yellow leaf curl virus*; SiYMV, *Sida yellow mosaic virus*; SLCV, *Squash leaf curl virus*; TGMV, *Tomato golden mosaic virus*; ToMiMV, *Tomato mild mosaic virus*; ToMoV, *Tomato mottle virus*; ToRMV, *Tomato rugose mosaic virus*; ToSRV, *Tomato severe rugose virus*; ToYSV, *Tomato yellow spot virus*.

Na árvore filogenética baseada na sequência do DNA-B das amostras (Figura 4), foi possível notar que as espécies representadas pelos clones BLM2_1S (2598 nt) e BLS39_2B (2657 nt) apresentam-se fortemente associadas (100% Bpp) com a sequência representante dos vírus BGMV (NC004043) e SiMMV (NC005331), respectivamente, evidenciando assim a conservação do genoma destas espécies, visto que as sequências de DNA-A também agruparam com as mesmas espécies. Além disso, essas duas espécies também se apresentam ligadas com vírus de tomateiro.

Supõe-se que a espécie representada pelo clone BLC22_2B, proveniente de *C. affinis* seja CILCrV, uma vez que sua sequência de DNA-B apresentou-se ligada (100% Bpp) ao isolado CILCrV (NC016572) e, além disso, este foi o único vírus, até então, encontrado neste hospedeiro (SILVA et al., 2011; TAVARES et al., 2012).

Sugere-se que a espécie proveniente das amostras 4, 16 e 34 seja a mesma da amostra 30 (BLS30_2H, 2657 nt), uma vez que elas apresentaram um alto valor de identidade nucleotídica entre si e mantiveram-se próximas filogeneticamente, formando um grupo monofilético (99% Bpp), porém sequências completas de DNA-A destas amostras são necessárias para confirmar tal suposição. A sequência de DNA-B da amostra 30, diferentemente da sequência de DNA-A, apresentou-se mais distante filogeneticamente da espécie representada pelos clones BLS15_2E e BLS21_2A. Esta variação reflete o distinto processo evolutivo sofrido pelos dois componentes genômicos, assim como possíveis trocas ocorridas entre componentes de espécies virais diferentes (BRIDDON et al., 2010; FIALLO-OLIVÉ et al., 2010).

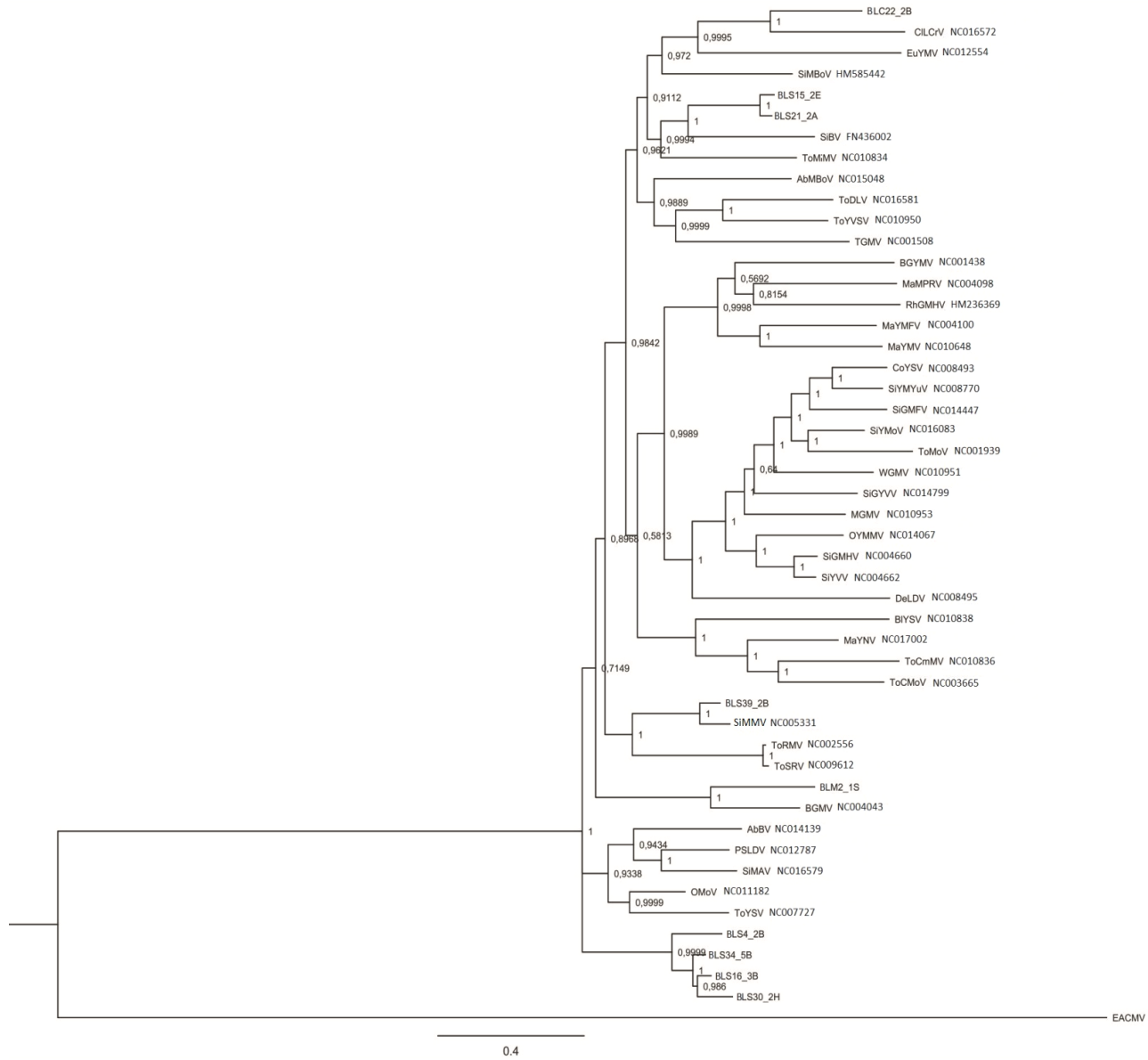


Figura 4: Reconstrução da árvore filogenética usando a inferência Bayesiana. A árvore foi baseada na sequência completa de DNA-B dos begomovírus descritos neste trabalho e outros begomovírus do Novo Mundo. Um isolado de begomovírus do Velho Mundo foi utilizado como out group.

Análise de recombinação

O relacionamento filogenético inferido pelo método “neighbour-net” implementado no Splits Tree4 revelou evidência de recombinação entre os isolados (Figura 5).

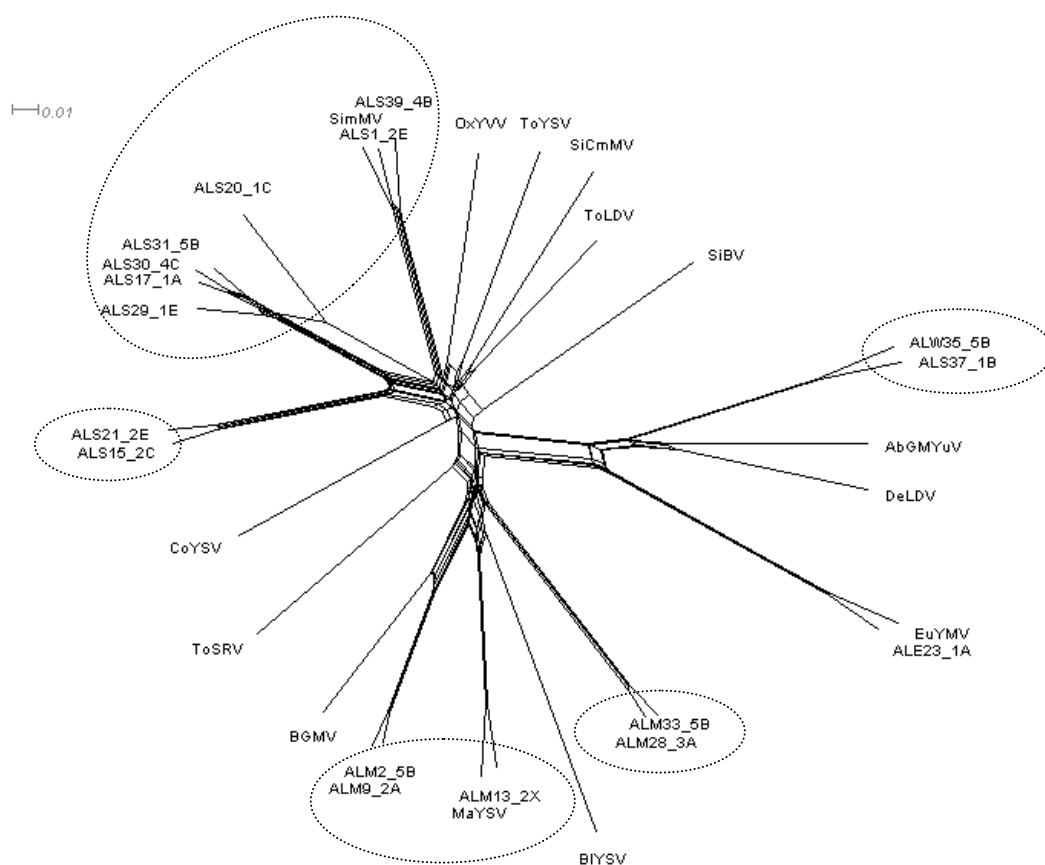


Figura 5: Evidência filogenética de recombinação incluindo todos os isolados obtidos neste trabalho e outros begomovírus descritos. Análise neighbor-net foi realizada utilizando Splits Tree 4. A formação de uma rede reticular evidencia pontos de recombinação. Os isolados obtidos neste estudo apresentam-se destacados em círculos.

Para confirmar os supostos eventos de recombinação, o mesmo conjunto de dados foi submetido ao software RDP3 (Tabela 5). Um evento de recombinação foi detectado envolvendo a espécie representada pelos clones ALS15_2C e ALS21_2E, apontando uma espécie desconhecida como possível

parental. Na espécie representada pelos clones ALM2_5B e ALM9_2A foi detectado um evento de recombinação, apresentando a espécie representada pelo clone ALM13_2X como possível parental. O clone LS20_1C, apesar de representar a mesma espécie dos clones ALS17_1A, ALS29_1E, ALS30_4C e ALS31_5B, apresentou evento de recombinação distinto destes (com “breakpoints” e parentais diferentes). De fato, de todas as análises envolvendo essas cinco amostras, o clone ALS20_1C foi o que se apresentou mais distinto. A espécie representada pelos clones ALW35_5B e ALS37_1B apresentou um evento de recombinação apontando a espécie CILCrV como parental (tabela 5), ambas espécies apresentaram-se próximas filogeneticamente.

A maioria dos possíveis eventos de recombinação foi detectada na região correspondente à ORF CP ou Região Intergênica (RI), corroborando estudos que demonstram ser frequentes os eventos de recombinação nestas regiões (GARCIA-ANDRES et al., 2007; LEFREUVE et al., 2007).

Em resumo, foram obtidos isolados pertencentes às espécies SimMV, MaYSV e EuYMV, duas novas espécies infectando plantas do gênero *Sida*, duas novas espécies infectando plantas do gênero *Macropitium* e uma nova espécie infectando representante do gênero *Wissadula*, sendo esta última espécie viral também encontrada em planta de *Sida*. Este é o primeiro relato de begomovírus infectando plantas do gênero *Wissadula* no Brasil. Os resultados obtidos neste estudo indicam que as plantas não-cultivadas, dentre elas aquelas pertencentes às famílias Malvaceae e Fabaceae, atuam como fontes de novas espécies de begomovírus, uma vez que de 17 sequências completas de DNA-A analisadas, cinco consistem em novas espécies. Além disso, a recombinação é um mecanismo comum verificado entre essas espécies, o que caracteriza a alta diversidade das mesmas. Estudos posteriores são necessários visando a caracterização biológica dessas espécies a fim de compreender melhor a interação com seus hospedeiros.

A presença de cinco novas espécies em um baixo número de amostras infere a existência de muitas espécies virais ainda não identificadas e evidencia a importância dessas hospedeiras para as culturas agronomicamente importantes, visto que elas são amplamente distribuídas pelo Brasil e em outros países das Américas.

Tabela 5: Eventos de recombinação detectados nas sequências de DNA-A dos isolados virais obtidos neste estudo utilizando software RDP3.

Evento	Isolado viral ^a	Pontos de recombinação		Parental principal	Métodos que detectaram recombinação ^b						
		Início	Término		P-valor						
					R	G	B	M	C	S	3S
1	SimMV (ALS1_2E, ALS39_4B)	1656	1911	ALS17_1A	6×10^{-04}	- ^c	4×10^{-05}	1×10^{-03}	9×10^{-04}	9×10^{-03}	-
2	ALM2_5B, ALM9_2A	1073	1136	ALM13_2X	3×10^{-02}	4×10^{-02}	-	1×10^{-02}	-	-	1×10^{-02}
3	EuYMV (ALE23_1A)	1953	2502	SiBV	1×10^{-19}	4×10^{-12}	3×10^{-14}	1×10^{-10}	1×10^{-13}	1×10^{-18}	3×10^{-10}
4	MaYSV (ALM13_2X)	2131	2372	ALM33_5B	7×10^{-08}	6×10^{-05}	6×10^{-06}	6×10^{-03}	8×10^{-04}	3×10^{-06}	2×10^{-04}
5	ALS15_2C, ALS21_2E	1970	48	Desconhecido	1×10^{-19}	3×10^{-14}	1×10^{-18}	3×10^{-13}	7×10^{-12}	6×10^{-17}	3×10^{-13}
6	ALS17_1A, ALS29_1E, ALS30_4C, ALS31_5B	85	863	OxYVV	2×10^{-02}	-	-	1×10^{-03}	6×10^{-05}	1×10^{-06}	-
7	ALS20_1C	2033	2659	ALS29_1E	3×10^{-39}	4×10^{-32}	1×10^{-36}	2×10^{-20}	2×10^{-23}	4×10^{-20}	1×10^{-64}
8	ALW35_5B, ALS37_1B	2000	2507	CILCrV	6×10^{-12}	-	2×10^{-11}	3×10^{-08}	4×10^{-08}	3×10^{-16}	-

^a Número de acesso de cada isolado disponível na figura 2.

^b R, RDP; G, GENECONV; B, BootScan; M, MaxChi; C, Chimaera; S, SiScan; 3S, 3Seq.

^c Nenhum evento de recombinação detectado.

3.4 CONCLUSÕES

Foi constatada elevada diversidade de espécies de begomovírus infectando plantas não-cultivadas nos estados do Piauí e Ceará;

A recombinação é um evento frequente entre as espécies virais identificadas;

Foi relatada, pela primeira vez no Brasil, a infecção de *Wissadula* sp. por begomovírus;

Há relacionamento filogenético próximo entre os vírus que infectam plantas cultivadas e os vírus que infectam plantas não-cultivadas;

Os dados obtidos neste trabalho reforçam a existência de uma linhagem distinta de begomovírus do Novo Mundo no Brasil.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela FAPEPI/CNPq e desenvolvido no Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular / Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí (UFPI), e no Laboratório de Virologia Vegetal Molecular da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG. LSP foi beneficiário de bolsa de estudo da CAPES.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, L. C.; VARSANI, A.; FERNANDES, F. R.; PINHEIRO, B.; MARTIN, D. P.; FERREIRA, P. T. O.; LEMOS, T. O.; INOUE-NAGATA, A. K. Further characterization of tomato - infecting begomoviruses in Brazil. **Archives of Virology**, v. 157, n. 4, p. 747-752, 2012.

ARANHA, S. D. A.; ALBUQUERQUE, L. C. D.; BOITEUX, L. S.; INOUE-NAGATA, A. K. Detection and complete genome characterization of a begomovirus infecting okra (*Abelmoschus esculentus*) in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 1, p. 14-20, 2011.

BARBOSA, J. C.; BARRETO, S. S.; INOUE-NAGATA, A. K.; REIS, M. S.; FIRMINO, A. C.; BERGAMIN, A.; REZENDE, J. A. M. Natural infection of *Nicandra physaloides* by *Tomato severe rugose virus* in Brazil. **Journal of General Plant Pathology**, v. 75, p. 440-443, 2009.

BRIDDON, R.W.; PATIL, B. L.; BAGEWADI, B.; NAWAZ-UL-REHMAN, M.S.; FAUQUET, C.M. Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, n. 1, p. 97-108, 2010.

BROWN, J. K.; FAUQUET, C. M.; BRIDDON, R. W.; ZERBINI, F. M.; MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J. **Geminiviridae: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. In: KING A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E.J. (Editores) London: Elsevier/ Academic Press, p. 351-373, 2012.

CASTILLO-URQUIZA, G. P.; BESERRA JR, J. E. A.; BRUCKNER, F. P.; LIMA, A. T. M.; VARSANI, A.; ALFENAS- ZERBINI, P.; ZERBINI, F. M. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Archives of Virology**, v. 153, n. 10, p. 1985-1989, 2008.

COCO, D.; CALIL, I.P.; BRUSTOLINI, O.J.B.; SANTOS, A.A.; INOUE-NAGATA, A.K.; FONTES, E.P.B. Soybean chlorotic spot virus, a novel begomovirus infecting soybean in Brazil. **Archives of Virology**, v.158, n. 2, p. 457-462, 2013.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 1, n. 4, p. 19-21, 1983.

EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v.32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.

FERNANDES, F. R.; ALBUQUERQUE, L. C.; GIORDANO, L. B.; BOITEUX, L. S.; ÁVILA, A. C.; INOUE-NAGATA, A. K. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. **Virus Genes**, v. 36, n. 1, p. 251-258, 2008.

FERNANDES, F. R.; CRUZ, A. R.; FARIA, J. C.; ZERBINI, F. M.; ARAGÃO, F. J. L. Three distinct begomoviruses associated with soybean in central Brazil. **Archives of Virology**, v. 154, n. 9, p. 1567-1570, 2009.

FIALLO- OLIVÉ, E.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E.; ZUBIAUR, Y. M. Two novel begomoviruses belonging to different lineages infecting *Rhynchosia minima*. **Archives of Virology**, v. 155, n. 12, p. 2053-2058, 2010.

GARCIA-ANDRES, S.; TOMAS, D.M.; SANCHEZ-CAMPOS, S.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E. Frequent occurrence of recombinants in mixed infections of tomato yellow leaf curl disease-associated begomoviruses. **Virology**, v. 365, n.1, p. 210-219, 2007.

HERNÁNDEZ-ZEPEDA, C.; ARGUELLO-ASTORGA, G.; IDRIS, A.M.; CARNEVALI, G.; BROWN, J.K.; MORENO-VALENZUELA, A.O. Molecular characterization and phylogenetic relationships of Desmodium leaf distortion virus (DeLDV): a new begomovirus infecting *Desmodium glabrum* in Yucatan, Mexico. **Virus Genes**, v. 39, n. 3, p. 371-374, 2009.

HUSON, D.; BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 2, p. 254-267, 2006.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, n. 18, p. 754-755, 2001.

INOUE-NAGATA, A. K.; ALBUQUERQUE, L. C.; ROCHA, W.B.; NAGATA, T. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi 29 DNA polymerase. **Journal of Virological Methods**, v.116, n. 2, p. 209-211, 2004.

LEFREUVRE, P.; MARTIN, D.P.; HOAREAU, M.; NAZE, F.; DELATTE, H.; THIERRY, M.; VARSANI, A.; BECKER, N.; REYNAUD, B.; LETT, J.M. Begomovirus 'melting pot' in the south-west Indian Ocean islands: molecular diversity and evolution through recombination. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 12, p. 3458-3468, 2007.

MARTIN, D.P.; LEMEY, P.; LOTT, M.; MOULTON, V.; POSADA, D.; LEFREUVRE, P. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. **Bioinformatics**, v. 26, n. 19, p. 2462-2463, 2010.

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

MUHIRE, B.; VARSANI, A.; MARTIN, D.P. SDT: A virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. **PLoS One** v.9, n. 9, e108277, 2014.

PATIL, B. L.; FAUQUET, C. M. Cassava mosaic geminiviruses: actual knowledge and perspectives. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, n. 5, p. 685-701, 2009.

PAZ-CARRASCO, L. C.; CASTILLO-URQUIZA, G. P.; LIMA, A. T. M.; XAVIER, C. A. D.; VIVAS-VIVAS, L. M.; MIZUBUTI, E. S. G.; ZERBINI, F. M. Begomovirus diversity in tomato crops and weeds in Ecuador and the detection of a recombinant isolate of

Rhynchosia golden mosaic Yucatan virus infecting tomato. **Archives of Virology**, v.159, n. 8, p. 2127-2132, 2014.

ROCHA, C. S. R.; CASTILLO-URQUIZA, G. P.; LIMA, A. T. M.; SILVA, F. N.; XAVIER, C. A. D.; HORA-JÚNIOR, B. T.; BESERRA- JÚNIOR, J. E. A.; MALTA, A. W. O.; MARTIN, D. P.; VARSANI, A.; ALFENAS-ZERBINI, P.; MIZUBUTI, E. S. G.; ZERBINI, F. M. Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly evolving, and segregated based on geographical location. **Journal of Virology**, v.87, n. 10, p. 5784-5799, 2013.

ROJAS, M. R.; HAGEN, C.; LUCAS, W. J.; GILBERTSON, R. L. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. **Annual Review of Phytopathology**, v.43, p. 361-394, 2005.

SILVA, S. J. C.; CASTILLO-URQUIZA, G. P.; HORA-JÚNIOR, B. T.; ASSUNÇÃO, I. P.; LIMA, G. S. A.; PIO-RIBEIRO, G.; MIZUBUTI, E. S. G.; ZERBINI, F. M. High genetic variability and recombination in a begomovirus population infecting the ubiquitous weed *Cleome affinis* in northeastern Brazil. **Archives of Virology**, v. 156, n. 12, p. 2205-2213, 2011.

SILVA, S.J.C.; CASTILLO-URQUIZA, G.P.; HORA-JÚNIOR, B.T.; ASSUNÇÃO, I.P.; LIMA, G.S.A.; PIO-RIBEIRO, G.; MIZUBUTI, E.S.G.; ZERBINI, F.M. Species diversity, phylogeny and genetic variability of begomovirus populations infecting leguminous weeds in northeastern Brazil. **Plant Pathology**, v.61, n. 3, p. 457-467, 2012.

SILVA, F. N.; LIMA, A. T. M.; ROCHA, C. S.; CASTILLO-URQUIZA, G. P.; ALVES-JÚNIOR, M.; ZERBINI, F. M. Recombination and pseudorecombination driving the evolution of the begomoviruses *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) and *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV): two recombinant DNA-A components sharing the same DNA-B. **Virology Journal**, v.11, p. 66-76, 2014.

SOBRINHO, R. R.; XAVIER, C. D. A.; PEREIRA, H. M.; LIMA, G. S.; ASSUNÇÃO, I. P.; MIZUBUTI, E. S. G.; ZERBINI, F. M. Contrasting genetic structure between two begomoviruses infecting the same leguminous hosts. **Journal of General Virology**, v. 95, n. 11, p. 2540-2552, 2014.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

TAVARES, S. S.; SOBRINHO, R. R.; GONZÁLEZ-AGUILERA, J.; LIMA, G. S. A.; ASSUNÇÃO, I.P.; DUFFY, S.; ZERBINI, F.M. Further molecular characterization of weed-associated begomoviruses in Brazil with emphasis on *Sida* spp. **Planta Daninha**, v. 30, n. 2, p. 305-315, 2012.

VARSANI, A.; NAVAS-XASTILLO, J.; MORIONES, E.; HERNÁNDEZ-ZEPEDA, C.; IDRIS, A.; BROWN, J. K.; ZERBINI, F. M.; MARTIN, D. P. Establishment of three new genera in the family *Geminiviridae*: *Becurtovirus*, *Eragrovirus* and *Turncurtovirus*. **Archives of Virology**, v. 159, n. 8, p. 2193-2203, 2014.