

GLORIA PATRICIA CASTILLO URQUIZA

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE
BEGOMOVÍRUS EM DUAS REGIÕES PRODUTORAS DE TOMATE
DO SUDESTE DO BRASIL**

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Fitopatologia, para
obtenção do título de *Doctor
Scientiae*

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

GLORIA PATRICIA CASTILLO URQUIZA

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE
BEGOMOVÍRUS EM DUAS REGIÕES PRODUTORAS DE TOMATE
DO SUDESTE DO BRASIL**

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Fitopatologia, para
obtenção do título de *Doctor
Scientiae*

APROVADA: 19 de março de 2008.

Pesq. Poliane Alfenas Zerbini
(Co-orientadora)

Prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti
(Co-orientador)

Pesq. Alice Kazuko Inoue-Nagata

Prof^a Elizabeth Pacheco Batista Fontes

Prof. Francisco Murilo Zerbini Junior
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo amor, apoio incondicional, incentivo, pela compreensão e dedicação em todos os momentos da minha vida;

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade de realização deste curso;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo;

Ao meu orientador, Prof. Franciso Murilo Zerbini Jr., pela oportunidade, orientação, pela amizade, pelos ensinamentos e pela receptividade durante meu mestrado e doutorado;

À pesquisadora Poliane Alfenas Zerbini pela valiosa colaboração, orientação e amizade;

Ao professor Murilo Geraldo de Carvalho pela ajuda constante, atenciosa colaboração e amizade;

Ao meu amigo José Evando Aguiar Beserra, pela paciência, pela amizade, pelos ensinamentos e o constante apoio sempre;

Aos meus amigos do Laboratório de Virologia Vegetal Molecular: Ana Verônica, Eduardo Chumbinho, Dani, Alison, Miguel, Fábio, Carol, Alvaro, Antônio Wilson, Carlos de Ocesano, Fernanda, Renan, Riane, Carlos, pelo apoio, pela amizade, pelas sugestões e pela valiosa ajuda;

Aos funcionários do DFP que sempre foram atenciosos comigo, principalmente Fizinho e Joaquim, pela ajuda prestada no desenvolvimento deste trabalho;

A todos aqueles que de alguma forma ajudaram nesta etapa e cujo apoio foi muito válido. Sincera gratidão.

BIOGRAFIA

Gloria Patricia Castillo Uquiza, filha de Juan de la Cruz Castillo e Gloria Amparo de Castillo, nasceu em 2 de maio de 1975 em Bogotá (Cundinamarca), Colômbia.

Em 1993 iniciou o curso de Agronomia na Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colômbia, vindo a graduar-se em julho de 1999.

Em maio de 2002 ingressou no curso de Mestrado em Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), defendendo tese em fevereiro de 2004. Em fevereiro de 2004, iniciou o curso de pós-graduação em Fitopatologia em nível de doutorado na Universidade Federal de Viçosa (UFV), na cidade de Viçosa, Minas Gerais. Em 19 de março de 2008, concluiu o doutorado com a defesa da tese.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
Introdução	1
Revisão de Literatura.....	6
Família <i>Geminiviridae</i>	6
Replicação viral	8
Interações geminivírus-hospedeiro	10
Biologia de populações e suas interfaces com o manejo de viroses vegetais.....	15
Técnicas para quantificar a variabilidade genética de populações de vírus	17
Evolução dos geminivírus.....	19
Diversidade e estrutura genética de populações de begomovírus.....	21
Variabilidade genética de begomovirus em tomateiro no Brasil.....	31
Referências Bibliográficas.....	37
Capítulo 1. Novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil.....	53
Abstract.....	55
Acknowledgements.....	59
References.....	59
Figure legends.....	69
Capítulo 2. Estrutura genética de duas populações de geminivírus infectando tomateiro na região Sudeste do Brasil	72
Introdução	73

Material e Métodos	77
1. Coleta de amostras	77
2. Confirmação da presença de begomovírus	77
3. Clonagem e seqüenciamento do genoma completo de begomovírus	78
4. Análise filogenética.....	79
5. Determinação da estrutura genética das populações virais	79
5.1. Descritores gerais	79
5.2. Parametrização de mecanismos evolutivos	80
5.2.1. Testes de neutralidade	80
5.2.2. Testes para detectar subdivisão na população	80
5.2.3. Testes para detectar migração.....	80
Resultados e Discussão	81
1. Detecção viral preliminar nas amostras	81
2. Clonagem de genomas virais e análise das sequências.....	81
3. Análise filogenética.....	86
4. Determinação da estrutura genética das populações de ToCmMV e ToYVSV	92
4.1. Análise dos mecanismos evolutivos.....	96
4.1.1. Testes de neutralidade	96
4.1.2. Testes para detectar migração.....	99
Conclusões	101
Referências Bibliográficas	103

RESUMO

Castillo-Urquiza, G.P., D.S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2008. **Diversidade e estrutura genética de begomovírus em duas regiões produtoras de tomate do Sudeste do Brasil.** Orientador: Francisco Murilo Zerbini Júnior. Co-orientadores: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti e Poliane Alfenas-Zerbini.

A incidência de begomovírus em tomateiros no Brasil vem aumentando gradativamente desde meados da década de 1990, após a introdução do biótipo B da mosca-branca *Bemisia tabaci*. O inseto vetor teria transferido vírus nativos que infectam plantas silvestres ou daninhas para o tomateiro. Após um rápido processo evolutivo, novas espécies mais adaptadas ao novo hospedeiro passaram a predominar no campo. Atualmente, cinco espécies de begomovírus que infectam o tomateiro encontram-se caracterizadas, e seis espécies tentativas foram parcialmente caracterizadas. Este trabalho teve como objetivos determinar a diversidade e a estrutura genética de populações de begomovírus em tomateiro e em plantas daninhas em duas regiões produtoras da região Sudeste do Brasil, os municípios de Paty do Alferes (RJ) e Coimbra (MG). A estrutura genética de populações refere-se à quantidade de variabilidade genética e a sua distribuição dentro e entre subpopulações, refletindo a história evolutiva da população. Um total de 115 amostras de tomateiro foram coletadas em Paty do Alferes em maio de 2005. Em Coimbra,

em julho de 2007, foram coletadas 17 amostras de tomateiro e 43 amostras de plantas daninhas. A partir de DNA extraído das amostras, os genomas de begomovírus foram clonados e completamente sequenciados. As seqüências foram comparadas com as de begomovírus previamente descritos, e foram realizadas análises filogenéticas e de determinação da estrutura genética das populações virais. Duas novas espécies virais em tomateiros foram detectadas em Paty do Alferes, três novas espécies nas plantas daninhas *Blainvillea rhomboidea*, *Sida micrantha* e *S. rhombifolia*, foram detectadas próximas a campos de tomateiro em Coimbra, e uma nova espécie presente em plantas de tomateiro nas duas localidades. As seis espécies virais possuem todas as características de begomovírus bissegmentados das Américas. Quatro das novas espécies (num total de 42 clones correspondentes a DNA-A) se agruparam com as demais espécies brasileiras na árvore filogenética. Entretanto, duas das novas espécies (num total de 27 clones correspondentes a DNA-A) foram agrupadas com vírus identificados no México e na América Central. Essas espécies podem pertencer a uma linhagem distinta de begomovírus, detectada no Brasil pela primeira vez. A análise da estrutura genética das populações de ToYVSV e ToCmMV indicou maior variabilidade genética em ToCmMV. Além disso, a comparação das subpopulações de Coimbra e Paty do Alferes do ToCmMV indica maior variabilidade em Coimbra. Considerando-se que a presença de begomovírus na região de Coimbra vem sendo constatada desde 2001, ao passo que em Paty do Alferes ocorreu apenas em 2005, os resultados obtidos são consistentes com a introdução recente das populações virais em Paty do Alferes, seguido de expansão populacional. Em Coimbra, o vírus e seu hospedeiro provavelmente estão co-evoluindo há mais tempo. Análises posteriores investigarão a existência de eventos de recombinação entre os diferentes vírus encontrados, bem como o relacionamento filogeográfico entre as espécies.

ABSTRACT

Castillo-Urquiza, G.P., DS, Universidade Federal de Viçosa, March 2008. **Diversity and genetic structure of begomovirus populations in tomatoes in two growing regions of Southeastern Brazil.** Advisor: Francisco Murilo Zerbini Júnior. Co-Advisers: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti and Poliane Alfenas-Zerbini.

The incidence of begomoviruses has sharply increased in Brazil since the mid 1990's, after the introduction of the B biotype of the whitefly *Bemisia tabaci*. It is believed that the insect vector transferred indigenous viruses infecting wild and weed hosts to tomato. After a rapid evolutionary process, novel species adapted to the new host became prevalent in the field. To date, five begomovirus species infecting tomatoes have been characterized, and six tentative species have been partially characterized. The objectives of this work were to determine the diversity and the genetic structure of begomovirus populations infecting tomatoes and associated weeds in two major tomato growing regions of Southeastern Brazil, the cities of Paty do Alferes (Rio de Janeiro state) and Coimbra (Minas Gerais state). The genetic structure of populations refers to the degree of genetic variability and its distribution within and between subpopulations, reflecting the evolutionary history and the potential of the population to evolve. A total of 119 tomato samples were collected in Paty do Alferes in May 2005. In Coimbra, 17 tomato samples

and 43 weed samples were collected in July 2007. Total DNA was extracted from the samples and full-length begomovirus genomes were cloned by rolling circle amplification. Clones were completely sequenced and the sequences were used for comparisons with previously described begomoviruses, for phylogenetic analysis and for the determination of the genetic structure of viral populations. Sequence comparisons indicated the presence of two novel begomovirus species in tomato plants collected in Paty do Alferes, three novel species in weed samples collected in Coimbra, and one novel species in tomato samples collected at both locations. Sequence features indicate that all six species are typical New World, bipartite begomoviruses. Four of the novel species (represented by 42 DNA-A clones) clustered with Brazilian viruses in the phylogenetic tree. Interestingly, the two other new species (represented by 27 DNA-A clones) clustered with begomoviruses from Mexico and Central America. These two species could represent a distinct lineage of New World begomoviruses, found in Brazil for the first time. Analysis of the genetic structure of ToYVSV and ToCmMV populations indicates a higher degree of genetic variability for ToCmMV. Furthermore, comparison between the ToCmMV subpopulations from Coimbra and Paty do Alferes indicates greater variability in Coimbra. Considering that the presence of begomoviruses in tomatoes has been verified in Coimbra since 2001, but was verified for the first time in Paty do Alferes only in 2005, these results are consistent with a recent introduction of viral populations in Paty do Alferes, followed by a rapid populational expansion. In Coimbra, the virus and its host may have been co-evolving for a longer time. Further analyses will investigate the existence of recombination events among the detected viruses, as well as their phylogeographic relationships.

INTRODUÇÃO

A família *Geminiviridae* é constituída por vírus que possuem partículas icosaédricas geminadas e um genoma composto por uma fita simples de DNA circular. A família é dividida em quatro gêneros (*Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus* e *Topocuvirus*), de acordo com o tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros, organização do genoma e relacionamento filogenético (Stanley *et al.*, 2005). Os begomovírus (gênero *Begomovirus*, família *Geminiviridae*), transmitidos pela mosca branca *Bemisia tabaci*, constituem um grupo de vírus de plantas de grande relevância para a agricultura, dado o aumento na incidência e severidade de doenças por eles causadas nas últimas décadas, em diversas culturas de importância econômica, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Polston e Anderson, 1997; Morales e Anderson, 2001; Monci *et al.*, 2002; Briddon, 2003; Were *et al.*, 2004). A cultura do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. = *Lycopersicon esculentum* Mill.) é uma das mais afetadas pelos begomovírus (Ribeiro *et al.*, 2003; Morales e Jones, 2004).

No Brasil, foram cultivados em 2006 aproximadamente 57 mil hectares de tomateiro, com uma produção de 3,3 milhões de toneladas, destinada a dois mercados distintos: processamento industrial e consumo *in natura*. As principais áreas de

produção concentram-se nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, com os estados de Goiás, São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro respondendo por 71% da produção total (Agrianual, 2007).

Nas Américas, as doenças causadas por begomovírus vêm causando danos significativos para a produção de tomate (Polston e Anderson, 1997; Ribeiro *et al.*, 2003; Morales e Jones, 2004). Desde a década de 1980, perdas substanciais têm sido relatadas em diversos países, incluindo-se os EUA (principalmente o estado da Flórida), México, países da América Central e Caribe, e Venezuela (Polston e Anderson, 1997; Varma e Malathi, 2003). A incidência pode ser tão severa a ponto de impossibilitar o cultivo comercial em determinadas regiões, a exemplo do *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) na República Dominicana nos anos de 1997 e 1998 (Salati *et al.*, 2002). No México, diversos begomovírus que infectam tomateiros foram descritos nos últimos vinte anos (Brown e Nelson, 1988; Brown e Poulos, 1990; Torres-Pacheco *et al.*, 1993; Paplomatas *et al.*, 1994). Com exceção do TYLCV, introduzido na República Dominicana a partir de mudas de tomateiro importadas de Israel (Nakhla *et al.*, 1994), todos os demais vírus isolados e caracterizados a partir de tomateiros nos países do continente americano são nativos desse continente, e nunca foram relatados em outros locais (Morales e Anderson, 2001; Morales e Jones, 2004). De fato, a filogenia da família *Geminiviridae* (e não apenas dos begomovírus que infectam o tomateiro) é altamente correlacionada com a distribuição geográfica das espécies virais (Rybicki, 1994; Stanley *et al.*, 2005), o que sugere que os geminivírus infectam espécies locais e são transmitidos para espécies cultivadas pelo inseto vetor (Ribeiro *et al.*, 2003).

O primeiro relato de begomovírus em tomateiro no Brasil foi feito na década de 1970 (Costa *et al.*, 1975). O agente etiológico foi caracterizado e denominado *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) (Matyis *et al.*, 1975). Esse vírus não se estabeleceu nas

áreas produtoras de tomate, provavelmente porque o biótipo A de *B. tabaci*, o único presente no Brasil naquela época, não coloniza eficientemente o tomateiro (Bellows *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1995). De fato, novo relato de infecção natural de tomateiro pelo TGMV só ocorreu duas décadas depois no estado do Rio de Janeiro (Alfenas *et al.*, 1998). A partir da década de 1990 observou-se um aumento considerável de relatos de begomovírus na cultura do tomateiro nas principais regiões produtoras do Brasil, provavelmente devido a introdução do biótipo B de *B. tabaci*, relatado pela primeira vez em 1992 no estado de São Paulo (Melo, 1992). O biótipo B apresenta uma gama de hospedeiros mais ampla em comparação ao biótipo A (incluindo o tomateiro), além de maior fecundidade e capacidade de dispersão (Bedford *et al.*, 1994; Santos *et al.*, 2004).

O biótipo B se disseminou rapidamente por todas as regiões quentes e secas do Brasil, incluindo as principais regiões produtoras de tomate (Lourenção e Nagai, 1994). Simultaneamente, sintomas típicos de infecção por begomovírus em tomateiros foram relatados no Distrito Federal (Ribeiro *et al.*, 1994), Triângulo Mineiro (Resende e Cupertino, 1996; Zerbini *et al.*, 1996b), São Paulo (Faria *et al.*, 1997), Rio de Janeiro (Galvão *et al.*, 1998) e na região Nordeste, incluindo o estado da Bahia (Ribeiro *et al.*, 1996) e a região do Sub-Médio São Francisco, então a principal região produtora de tomate para processamento industrial no Brasil (Bezerra *et al.*, 1997).

A caracterização preliminar das espécies de begomovírus associadas a alguns desses relatos indicou a presença de diversas novas espécies, sugerindo um grau elevado de diversidade genética (Ambrozevicius *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2003). Trabalhos subsequentes, baseados na determinação das seqüências completas dos genomas virais e na produção de clones infecciosos, levaram à descrição de cinco novas espécies: *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) (Fernandes *et al.*, 2006), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) (Ribeiro *et al.*, 2007), *Tomato yellow spot virus* (ToYSV)

(Calegario *et al.*, 2007), *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) e *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) (Fernandes *et al.*, 2008). Além dessas espécies, pelo menos seis espécies tentativas, ainda não totalmente caracterizadas, foram descritas (Ambrozevicius *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2003; Inoue-Nagata *et al.*, 2006). Algumas dessas espécies encontram-se amplamente distribuídas pelo país, enquanto outras estão restritas a certas regiões. Por exemplo, o ToSRV já foi relatado nos estados de Goiás, Minas Gerais, Pernambuco, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo (Rezende *et al.*, 1997; Lima *et al.*, 2006; Castillo-Urquiza *et al.*, 2007; Cotrim *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2008). Por outro lado, o ToYSV foi relatado apenas em Minas Gerais (Calegario *et al.*, 2007).

A explicação mais provável para o rápido surgimento e disseminação de begomovírus na cultura do tomateiro é a colonização de plantas silvestres e daninhas pelo biótipo B de *B. tabaci*, possibilitando que vírus nativos presentes nestas plantas sejam transferidos para o tomateiro. Três observações corroboram essa hipótese. Em primeiro lugar, todas as espécies de begomovírus detectadas até o presente são de ocorrência restrita ao Brasil. Em segundo lugar, a caracterização biológica de algumas espécies (ToRMV, ToCMoV e ToYSV) confirmou que plantas daninhas como *Nicandra physaloides*, *Solanum nigrum* e *Datura stramonium* são hospedeiras (Fernandes *et al.*, 2006; Calegario *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007). Por fim, begomovírus originalmente encontrados em plantas silvestres/daninhas, como o *Sida mottle virus* (SiMoV) e o *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV), já foram encontrados infectando naturalmente o tomateiro (Castillo-Urquiza *et al.*, 2007; Cotrim *et al.*, 2007).

A presença de diversas espécies no campo, todas transmitidas pelo mesmo inseto vetor, torna comum a ocorrência de infecções mistas, com dois ou mais vírus presentes simultaneamente na mesma planta (Ribeiro *et al.*, 2003; Castillo-Urquiza *et al.*, 2007).

A presença de dois ou mais begomovírus na mesma planta aumenta a probabilidade de eventos de recombinação e/ou pseudo-recombinação entre componentes do genoma viral, o que pode levar ao surgimento de novas espécies mais adaptadas ao novo hospedeiro (Pita *et al.*, 2001; Monci *et al.*, 2002; Andrade *et al.*, 2006; Inoue-Nagata *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007).

Estudos sobre a distribuição e prevalência de diferentes espécies de begomovírus, assim como de possíveis recombinantes, fornecem informações úteis para programas de melhoramento na busca de fontes de resistência duráveis. Este tipo de estudo também é importante para entender a dinâmica populacional e genética dos processos que direcionam a emergência e evolução de novas espécies virais. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo determinar a estrutura genética de populações de begomovírus em tomateiro e plantas daninhas associadas em duas regiões produtoras do Sudeste brasileiro, os municípios de Paty do Alferes (RJ) e Coimbra (MG).

REVISÃO DE LITERATURA

Família *Geminiviridae*

Os vírus pertencentes à família *Geminiviridae* são caracterizados pela morfologia de partículas icosaédricas geminadas e genoma composto por DNA de fita simples circular (Stanley *et al.*, 2005). A família é formada por quatro gêneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus*, com base no tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros, organização do genoma e relacionamento filogenético (Stanley *et al.*, 2005). O gênero *Mastrevirus* inclui os geminivírus com um componente genômico transmitidos por diferentes espécies de cigarrinhas (Homoptera: Cicadellidae) a plantas monocotiledôneas. Este gênero inclui patógenos importantes de culturas como o milho (*Maize streak virus*, MSV) e o trigo (*Wheat dwarf virus*, WDV). O gênero *Curtovirus* engloba os geminivírus com um componente genômico transmitidos por diversas espécies de cigarrinhas a espécies dicotiledôneas. O *Beet curly top virus* (BCTV) é a principal espécie de importância econômica. O gênero *Topocuvirus* possui apenas uma espécie (*Tomato pseudo-curly top virus*, TPCTV), com um componente genômico, e transmitida pela cigarrinha *Micrutalis malleifera* (Homoptera: Auchenorrhyncha) a espécies dicotiledôneas. O gênero *Begomovirus* inclui as espécies com um ou dois

componentes genômicos, transmitidas pela mosca-branca *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) a espécies dicotiledôneas. Begomovírus com um componente genômico (monossegmentados) estão presentes no “Velho Mundo” (Europa, Ásia e África) e são freqüentemente associados a um DNA satélite denominado DNA β . Os begomovírus nativos das Américas possuem dois componentes genômicos (bissegmentados), denominados DNA-A e DNA-B, cada um com aproximadamente 2600 nucleotídeos (nt). Os dois componentes genômicos de uma mesma espécie viral não possuem identidade em suas seqüências, exceto por uma região com aproximadamente 200 nt denominada região comum, que inclui a origem de replicação (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). Atualmente, mais de 180 espécies de begomovírus já foram descritas, incluindo mais de 50 espécies que podem infectar o tomateiro (Fauquet *et al.*, 2008).

O DNA-A dos begomovírus bissegmentados codifica de quatro a seis proteínas: uma proteína associada à replicação (Rep, “replication-associated protein”, anteriormente denominada AL1 ou AC1), iniciadora do mecanismo de replicação por círculo rolante, com propriedade de ligação a ácidos nucléicos, endonuclease e ATPase (Fontes *et al.*, 1992; Orozco *et al.*, 1997); uma proteína transativadora (TrAP, “trans-activating protein”, anteriormente AL2 ou AC2), fator transcricional dos genes *CP* e *NSP*, que também atua na supressão de respostas de defesa da planta (Sunter e Bisaro, 1992; Voinnet *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2005); a proteína Ren (“replication-enhancer protein”, anteriormente AL3 ou AC3), fator acessório (não-essencial) da replicação viral (Sunter *et al.*, 1990; Pedersen e Hanley-Bowdoin, 1994); e a proteína capsidial (CP, “coat protein”, anteriormente AR1 ou AV1), que além de formar o capsídeo viral é essencial para a transmissão do vírus pelo inseto vetor (Bridson *et al.*, 1990; Hofer *et al.*, 1997a). O gene AV2 (“pre-coat”) está presente apenas nos begomovírus do “Velho Mundo”, e atua no movimento do vírus na planta (Padidam *et al.*, 1996). O gene AC4

codifica uma proteína supressora de silenciamento gênico (Vanitharani *et al.*, 2004). O DNA-B codifica as proteínas MP (“movement protein”, anteriormente BC1 ou BL1) e NSP (“nuclear shuttle protein”, anteriormente BV1 ou BR1), a primeira envolvida no movimento célula-a-célula do vírus por meio do aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas (Noueiry *et al.*, 1994), e a segunda responsável pelo transporte do DNA através do envelope nuclear (Noueiry *et al.*, 1994; Sanderfoot *et al.*, 1996).

A maioria dos begomovírus monossegmentados está associada a um DNA satélite com aproximadamente 1.400 nt denominado DNA-β, o qual possui apenas uma ORF que codifica uma proteína supressora de silenciamento gênico denominada βC1 (Bridson *et al.*, 2001; Bridson *et al.*, 2003; Bull *et al.*, 2004). Outros agentes subvirais associados a begomovírus são o DNA satélite do *Tomato leaf curl virus* (ToLCV-sat DNA) e o DNA-1, similar a vírus da família *Nanoviridae* e que codifica uma proteína similar a Rep (Dry *et al.*, 1997; Mansoor *et al.*, 1999; Saunders e Stanley, 1999).

Replicação viral

A replicação dos geminivírus ocorre no núcleo das células infectadas, dependendo em grande parte da maquinaria do hospedeiro. O genoma circular de fita simples de DNA (ssDNA) é replicado por meio de um intermediário de fita dupla, denominado forma replicativa ou RF, utilizando um mecanismo de círculo rolante semelhante ao utilizado pelos bacteriófagos φX174 e M13 (Stenger *et al.*, 1991; Stanley, 1995). A RF serve como molde para a síntese dos novos componentes genômicos e também para a transcrição dos genes virais.

A origem de replicação (*ori*) está localizada na região intergênica comum entre os dois componentes genômicos. A sequência da *ori* é conservada entre componentes de um mesmo vírus, porém variável entre espécies, com exceção de uma região de

aproximadamente 30 nt conservada entre todas as espécies (Davies *et al.*, 1987; Lazarowitz, 1992). Nesta região se localiza uma seqüência repetida e invertida composta predominantemente por guanina e citosina, formando uma estrutura conservada (“structurally-conserved element”, SCE) em forma de grampo, com uma seqüência invariável (5'-TAATATTAC-3') encontrada em todos os geminivírus, que constitui o domínio funcional da origem de replicação (Heyraud-Nitschke *et al.*, 1995; Orozco e Hanley-Bowdoin, 1998). É neste nonanucleotídeo que ocorre a clivagem que inicia o processo de replicação por círculo rolante (Fontes *et al.*, 1994a; Laufs *et al.*, 1995b). A clivagem é realizada pela proteína Rep, que atua como uma endonuclease sítio-específica com requerimento de estrutura e seqüência (Laufs *et al.*, 1995a; Orozco e Hanley-Bowdoin, 1998). Na região comum encontram-se também seqüências específicas para a ligação da proteína Rep (Fontes *et al.*, 1992; Fontes *et al.*, 1994b) e regiões promotoras da RNA polimerase tipo II de plantas, responsável pela transcrição dos genes virais (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999).

O sítio de ligação de Rep ao DNA viral está localizado entre a caixa TATA do gene *rep* e a SCE (Orozco *et al.*, 1998), e é constituído por duas seqüências idênticas repetidas denominadas “iterons”. A ligação de Rep aos iterons é essencial para o início da replicação. Após a ligação de Rep ao DNA viral e estabilização do complexo formado por Rep, Ren e fatores do hospedeiro, a proteína Rep cliva o nonanucleotídeo localizado na SCE, dando início à replicação por círculo rolante (Fontes *et al.*, 1994a; Laufs *et al.*, 1995b). O reconhecimento dos iterons por Rep é considerado vírus-específico (Argüello-Astorga *et al.*, 1994; Harrison e Robinson, 1999; Ramos *et al.*, 2003), de modo que Rep só inicia a replicação de DNAs cognatos. O domínio funcional da proteína Rep responsável pelo reconhecimento foi mapeado em sua região N-terminal (Jupin, 1995; Gladfelter *et al.*, 1997; Chatterji *et al.*, 1999), e inclui o domínio

de ligação a DNA, conservado entre todas as proteínas Rep. Partindo-se da premissa de que o reconhecimento e ligação aos iterons por Rep é específico, foi proposto que certos aminoácidos do domínio de ligação a DNA de Rep determinam essa especificidade (Arguello-Astorga e Ruiz-Medrano, 2001). No entanto, a formação de pseudo-recombinantes (vírus híbridos compostos pelo DNA-A de um vírus e o DNA-B de outro) viáveis entre componentes genômicos com diferentes iterons indica que a interação Rep-iterons não é a única forma de reconhecimento da origem de replicação pela proteína Rep (Garrido-Ramirez *et al.*, 2000; Andrade *et al.*, 2006). A descoberta dos agentes sub-virais associados a begomovírus, que de modo geral não possuem iterons conservados com o vírus auxiliar, veio evidenciar esta versatilidade de Rep no reconhecimento e ligação à origem de replicação (Lin *et al.*, 2003; Stanley, 2004).

Interações geminivírus-hospedeiro

A replicação dos geminivírus tem um impacto significativo em diversas vias metabólicas utilizadas pela célula hospedeira. Este impacto inclui mudanças na estrutura e função dos plasmodesmas (Lazarowitz, 1999), a supressão de mecanismos de defesa do hospedeiro (Voinnet *et al.*, 1999; Peele *et al.*, 2001; Vanitharani *et al.*, 2005), a interação com reguladores de desenvolvimento ou senescência (Stanley e Latham, 1992; Latham *et al.*, 1997; Xie *et al.*, 1999; Selth *et al.*, 2005) e mudanças na expressão de genes nas células infectadas, principalmente no sentido de ativar genes envolvidos na síntese de DNA e na divisão celular (Settlage *et al.*, 2001; Luque *et al.*, 2002; Arguello-Astorga *et al.*, 2004).

O genoma dos geminivírus não codifica uma DNA polimerase, e portanto esses vírus dependem do sistema enzimático do hospedeiro para a síntese da forma replicativa (RF) e de novas fitas de ssDNA. Dessa forma, é fundamental que as células infectadas

por geminivírus estejam sintetizando DNA, caso contrário as enzimas responsáveis pela síntese não estarão presentes em concentração suficiente para permitir a replicação do vírus. Uma vez que os geminivírus infectam células completamente diferenciadas onde a síntese de DNA não ocorre, o vírus modifica o ciclo celular do hospedeiro no sentido de ativar a transcrição de genes envolvidos na síntese de enzimas de replicação e de outros fatores necessários à replicação do DNA (revisado por Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999; Gutierrez, 2000).

Nagar *et al.* (1995) demonstraram que células totalmente diferenciadas infectadas pelo *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) apresentavam concentração elevada de proteínas associadas à replicação de DNA, que normalmente não estão presentes em níveis detectáveis. Também observaram que a replicação do TGMV causa o acúmulo do antígeno nuclear de proliferação celular (“proliferating cell nuclear antigen”, PCNA), um fator de processividade da DNA polimerase δ encontrado na fase S do ciclo celular em células diferenciadas. Estudos utilizando plantas transgênicas expressando a proteína Rep do TGMV confirmaram que estes efeitos são mediados por Rep, evidenciando uma interação da proteína com fatores do hospedeiro responsáveis pelo controle do ciclo celular (Palmer *et al.*, 1998). A habilidade de Rep em ativar a expressão de PCNA está diretamente relacionada a sua capacidade de interagir com a proteína pRB, homóloga do regulador do ciclo celular retinoblastoma (Kong *et al.*, 2000; Arguello-Astorga *et al.*, 2004). A segunda proteína envolvida da replicação dos begomovírus, Ren, interage com Rep e com pRB (Settlage *et al.*, 2001). A interação entre PCNA e REn/Rep durante a infecção viral recrutaria a maquinaria de replicação da planta necessária para replicar o DNA viral, posicionando-a na origem de replicação do vírus (Settlage *et al.*, 2001; Luque *et al.*, 2002; Castillo *et al.*, 2003).

Outras interações foram demonstradas entre Rep e proteínas celulares de plantas. Uma proteína cinase serina/treonina, uma cinecina e uma histona H3 interagem com a Rep do TGMV e do *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) (Kong e Hanley-Bowdoin, 2002). Esses resultados indicam que a interação entre Rep e as proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular do hospedeiro permite que a célula acumule as proteínas e fatores acessórios necessários para a replicação de DNA, porém sem entrar no estado de divisão celular propriamente dito, situação que favorece a infecção por geminivírus (Kong e Hanley-Bowdoin, 2002).

O ToLCV induz em tomateiro a expressão de uma proteína com domínio NAC (um domínio funcional presente em diversas proteínas de plantas envolvidas na regulação do desenvolvimento e em respostas de defesa), denominada SINAC1 (Selth *et al.*, 2005). SINAC1 é induzida e interage com REn, e parece estar envolvida no aumento do acúmulo do DNA viral mediado por REn (Selth *et al.*, 2005).

O transporte do ssDNA viral do núcleo para o citoplasma e daí para células vizinhas através dos plasmodesmas, um processo essencial para a infecção sistêmica da planta, é facilitado pela ação coordenada das proteínas de exportação nuclear (NSP), de movimento (MP) e capsidial (CP). A NSP do CaLCuV interage com uma proteína de transporte nuclear de *Arabidopsis thaliana* denominada AtNSI, que acetila a si própria e à CP (McGarry *et al.*, 2003). A CP recruta o ssDNA viral nascente a partir do complexo de replicação para que este seja transportado por NSP para o citoplasma. A superexpressão de AtNSI aumenta a suscetibilidade ao CaLCuV, sugerindo que esta proteína facilita a transferência do DNA entre CP e NSP (McGarry *et al.*, 2003). Uma vez presente no citoplasma em associação com NSP, o DNA é transferido para a proteína MP, encarregada de movê-lo através dos plasmodesmas (Noueiry *et al.*, 1994). Essa etapa exige a interação entre NSP e MP, comprovada por meio de análise

mutagênica em ambas as proteínas em ensaios de expressão transiente em células de insecto e protoplastos de *Nicotiana tabacum* cv Xanthi (Sanderfoot e Lazarowitz, 1995; 1996). Embora o processo de movimento através dos plasmodesmas ainda não tenha sido totalmente elucidado, é consenso que deve ocorrer interação entre MP e fatores do hospedeiro (Gilbertson *et al.*, 2003).

Outro pré-requisito para o sucesso da infecção viral é a capacidade do vírus em suprimir os mecanismos de defesa da planta. A superexpressão das proteínas de transativação Trap do TGMV e C2 do BCTV em plantas transgênicas leva a maior suscetibilidade da planta aos vírus, caracterizada por um aumento da concentração viral (Wang *et al.*, 2003). Esta maior suscetibilidade foi atribuída à interação da AC2 e C2 com uma adenosina cinase (ADK) e uma cinase homóloga a SNF1 (“sucrose non-fermenting 1”) de levedura (Hao *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003). A ADK catalisa a síntese de 5'-AMP, o qual por sua vez ativa SNF1, um regulador do nível de ATP celular. O fato de Trap interagir com SNF1 e ADK sugere que as respostas metabólicas mediadas por SNF1 são um componente importante da resposta de defesa a vírus, e que os geminivírus desenvolveram uma estratégia de contra-ataque baseada na inativação dos dois componentes iniciais dessa via de defesa (ADK e SNF1). Esses resultados demonstram ainda que genes responsáveis por processos metabólicos primários (“housekeeping genes”) também podem participar de respostas de defesa a estresses bióticos.

Além desse efeito, as proteínas TrAP do *African cassava mosaic virus* (ACMV) e do *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) foram identificadas como proteínas com propriedade de inativar o mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional (Voinnet *et al.*, 1999; Van Wezel *et al.*, 2003). Embora o mecanismo de atuação dessas proteínas ainda não tenha sido elucidado, foi demonstrada uma relação de causa e efeito

entre a inativação da cinase ADK e a supressão de silenciamento, ambas mediadas por Trap (Wang *et al.*, 2005). Esses resultados sugerem que a atividade de ADK é necessária para o silenciamento, e que os geminivírus suprimem essa resposta de defesa via inibição de ADK.

A interação de proteínas cinase do tipo serina/treonina, denominadas LeNIK (*Lycopersicon esculentum* “NSP-interacting kinase”) e GmNIK (*Glycine max* “NSP-interacting kinase”) com a proteína NSP foi demonstrada utilizando-se o sistema duplo-híbrido de levedura (Mariano *et al.*, 2004). Esta interação foi associada à hipótese do modelo guarda de resistência em plantas, ou seja, NSP seria um fator de virulência que se liga a NIK para que não ocorra a indução de uma resposta de resistência (Mariano *et al.*, 2004). A interação entre as proteínas NIK e NSP foi alvo de um estudo subsequente com o objetivo de elucidar sua função no ciclo de infecção viral (Fontes *et al.*, 2004). Neste estudo foi feita sua caracterização bioquímica, demonstrando-se que as cinases que interagem com NSP são proteínas que se localizam em membranas com propriedades de receptores, e que a interação com NSP inibe essa atividade. Dessa forma, a interação entre NSP e NIK seria uma outra forma de suprimir uma resposta de defesa da planta ao vírus.

As infecções causadas por geminivírus normalmente se restringem às células associadas ao floema (Petty *et al.*, 2000). Entretanto, alguns begomovírus são capazes de infectar, além dos feixes vasculares, os tecidos associados ao mesófilo foliar (p.ex., TGMV em *N. benthamiana*) (Morra e Petty, 2000). Esta propriedade é conhecida como tropismo de tecido (Tyler e Fields, 1996), e possui dois componentes principais: fatores genéticos virais, que no caso do TGMV foram mapeados às regiões correspondentes aos genes Trap e NSP/MP e à região reguladora da transcrição do gene NSP, denominada BRi; e fatores do hospedeiro, pois embora os fatores genéticos do TGMV capacitem-no

a infectar células do mesófilo foliar em *N. benthamiana*, esse vírus é restrito ao floema em feijoeiro (Morra e Petty, 2000).

Biologia de populações e suas interfaces com o manejo de viroses vegetais

As estratégias de manejo de viroses vegetais devem ser estabelecidas com uma base epidemiológica (Nutter, 1997; Jones, 2004). Epidemiologia é o estudo da dinâmica espacial e temporal de epidemias (Campbell e Madden, 1990), o que por sua vez é o resultado da interação entre populações do hospedeiro e do patógeno (Zadoks e Schein, 1979). Assim, o estudo de epidemias de viroses vegetais deve ter uma abordagem populacional (Sacristan *et al.*, 2004). Biologia de população é o estudo dos aspectos genéticos e ecológicos de populações, e consiste na “síntese da epidemiologia e da genética de populações” (Milgroom e Peever, 2003). Nesse contexto, definir a estrutura genética é o primeiro passo lógico para estudar as populações virais, pois a estrutura genética reflete a história evolutiva e o potencial da população para evoluir (Pinel *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2004; Font *et al.*, 2007).

A estrutura genética de populações de vírus de plantas refere-se à quantidade de variabilidade genética e a sua distribuição dentro e entre subpopulações (Garcia-Arenal *et al.*, 2001). A variabilidade genética é resultado do processo evolutivo atuando sobre a população. Assim, o entendimento dos mecanismos evolutivos que dão forma às populações é um objetivo comum nos estudos de biologia de populações (Lin *et al.*, 2004; Tomitaka e Ohshima, 2006; Font *et al.*, 2007). Do ponto de vista evolutivo, a variabilidade genética de populações é importante porque esta determina o potencial de adaptação de um organismo ao ambiente. A variabilidade genética de populações virais afeta diretamente o manejo de viroses vegetais. Por exemplo, mutações pontuais podem

resultar na mudança da gama de espécies vetoras de um vírus alterando a eficiência de métodos de controle baseados no controle do inseto vetor (Moreno *et al.*, 2005). A seleção de determinadas variantes pode afetar fortemente a efetividade e a durabilidade de variedades resistentes (Van Den Bosch *et al.*, 2006).

O controle de viroses por meio do uso de variedades resistentes é uma prática altamente influenciada pelos processos evolutivos que atuam nas populações virais (Mallowa *et al.*, 2006; Seal *et al.*, 2006b; Van Den Bosch *et al.*, 2006). A durabilidade da resistência pode ser estimada com base no conhecimento da estrutura populacional do patógeno (Van Den Bosch *et al.*, 2006). O mosaico da alface causado pelo *Lettuce mosaic virus* (LMV) é uma das doenças de maior importância econômica da cultura (Le Gall, 2003). A resistência à doença é conferida por diversos genes com herança recessiva ($mo1^1$, $mo1^2$) ou dominante ($Mo2$, $Mo3$) (Pink *et al.*, 1992). A resistência proporcionada pelos genes recessivos $mo1^1$ e $mo1^2$ é altamente durável, possivelmente devido ao custo de adaptabilidade (“fitness cost”) associado a mutações no gene de avirulência correspondente no patógeno (Nicaise *et al.*, 2003). De fato, um levantamento da ocorrência das estirpes “Common” e “Most” do LMV (a primeira incapaz de infectar cultivares contendo os genes $mo1^1$ ou $mo1^2$, a segunda capaz de infectar essas cultivares) no estado de São Paulo indicou a prevalência da estirpe “Common”, apesar do plantio em larga escala de cultivares contendo os genes de resistência (Firmino *et al.*, 2005).

O entendimento da dinâmica da variabilidade de populações de vírus de plantas é necessário para compreender como as populações evoluem, bem como as implicações para a durabilidade de medidas de manejo da virose (Seal *et al.*, 2006a). Para a maior parte dos objetivos, a genética de populações fornece a ferramenta mais conveniente para estimar a diversidade genética de populações de patógenos. Os principais

mecanismos evolutivos que afetam a variabilidade das populações são seleção, deriva genética, migração, mutação e recombinação (Hartl e Clark, 2007). Quantificar a contribuição de cada mecanismo é importante e constitui o objetivo de vários estudos de biologia de populações de vírus de plantas (Bull *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Garcia-Andres *et al.*, 2007).

Técnicas para quantificar a variabilidade genética de populações de vírus

A variabilidade genética pode ser avaliada de diversas maneiras. Entre os diversos marcadores para o estudo de populações de fitopatógenos, marcadores morfológicos e patogênicos foram os primeiros a serem utilizados (Brown, 1996). Entretanto, o uso de marcadores possui pouca aplicabilidade no caso de populações de vírus. Com as técnicas atuais de clonagem e seqüenciamento em larga escala, e levando-se em consideração o tamanho reduzido dos genomas de vírus de plantas, a variabilidade genética pode ser investigada de forma altamente informativa com o seqüenciamento e análise de genomas completos (Carrasco *et al.*, 2007; Garcia-Andres *et al.*, 2007; Ge *et al.*, 2007). O seqüenciamento de um ou mais genes ligados diretamente a características como resistência ou virulência também fornece informações úteis, e tem sido empregado para vírus com genomas de RNA para os quais a clonagem do genoma completo é mais difícil (Sanchez *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2004; Tomimura *et al.*, 2004; Zhong *et al.*, 2005).

Com as seqüências disponíveis podem-se adiantar diversas análises para determinar a estrutura genética das populações virais mediante descritores gerais de variabilidade genética (número de sítios polimórficos, número de mutações, diversidade nucleotídica, número de haplótipos, diversidade haplotípica), testes para caracterizar o grau de diferenciação genética entre subpopulações (índices de fixação, análises de

variância), testes para tentar determinar os possíveis mecanismos evolutivos que atuam nas populações (testes de neutralidade para testar hipótese de ocorrência de seleção em populações, como o teste D de Tajima, testes de migração) assim como análises filogenéticas. A análise da genealogia de genes baseada no processo de coalescência é uma técnica poderosa e uma ferramenta de alta resolução utilizada em estudos de genética de populações de microrganismos. Quando seqüências de um grande número de indivíduos de uma mesma espécie estão disponíveis, informações genealógicas podem ser obtidas e árvores gênicas podem ser inferidas (Hudson, 1991). É possível determinar quais seqüências amostradas são mais relacionadas a outras baseadas na análise das árvores gênicas (Hudson, 1991). A coalescência é uma aproximação matemática (modelo) da estrutura ancestral de uma população (Carbone e Kohn, 2004). Trata-se de um processo estocástico capaz de modelar a genealogia de uma seqüência de DNA levando em consideração os resultados de seu histórico de mutação, recombinação e coalescência de linhagens na ancestralidade da amostra (Rosenberg e Nordborg, 2002). As propriedades estocásticas da genealogia de um gene podem ser utilizadas para estimar parâmetros da população, tais como taxas de mutação, migração, recombinação e seleção (Carbone e Kohn, 2004).

Genealogia gênica e processo coalescente foram introduzidos recentemente na análise de população de vírus. Um estudo foi conduzido para estimar a migração de *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1), um vírus de RNA de dupla fita, entre genótipos do fungo *Cryphonectria parasitica* (Carbone *et al.*, 2004). Isto é importante porque a infecção pelo CHV-1 pode resultar no controle biológico do fungo. Em um estudo com o begomovírus *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), isolados virais foram coletados na Ilha de La Réunion ao longo de um período de 8 anos. A análise de seqüências de duas regiões do genoma viral permitiu estimar a velocidade de geração da sua

variabilidade genética assim como o efeito de diferentes fatores que direcionam a evolução da população de vírus. A baixa diversidade constatada entre os isolados é consistente com uma única e recente introdução, seguida de uma diversificação moderada da população viral (Delatte *et al.*, 2007).

As informações obtidas em estudos de biologia de populações podem contribuir para a solução de questões epidemiológicas práticas. Para vírus com diferentes modos de transmissão (p.ex., pela semente e por meio de um inseto vetor), a contribuição de cada modo de transmissão pode afetar distintamente o manejo da doença, determinando estratégias de controle direcionadas ao modo de transmissão mais importante (Grogan, 1980; Walkey *et al.*, 1985). A análise de eventos de migração pode auxiliar no rastreamento das vias de introdução de novas variantes do patógeno em uma área e, mais importante, identificar quais os substratos (sementes, mudas, solo, etc.) podem disseminar o patógeno ou seu inseto vetor. A determinação da origem de uma espécie introduzida ou invasora é útil para: (i) inferir a história evolutiva e prever o grau de adaptabilidade dessa espécie ao ambiente local; (ii) identificar fontes de resistência do hospedeiro; (iii) decifrar o histórico de introduções e o padrão de disseminação por via humana; e (iv) facilitar esforços de quarentena (Downie, 2002).

Evolução dos geminivírus

Os geminivírus podem ter evoluído a partir de um replicon primitivo de DNA extracromossomal, presente em procariotos ou em ancestrais primitivos das plantas (revisado por Rojas *et al.*, 2005). Evidências indiretas, como características conservadas com as proteínas iniciadoras da replicação de replicons de procariotos e eucariotos contemporâneos (Ilyina e Koonin, 1992; Campos-Olivas *et al.*, 2002), presença de mRNAs policistrônicos, e a capacidade dos geminivírus de replicarem em

Agrobacterium tumefaciens (Ridgen *et al.*, 1996; Selth *et al.*, 2002), apóiam esta hipótese. Durante a co-evolução com seus hospedeiros, estes replicons de DNA teriam adquirido novos genes por meio de recombinação com o DNA do hospedeiro ou com outros replicons (revisado por Rojas *et al.*, 2005).

Estudos filogenéticos propõem que os geminivírus teriam sido derivados de um ancestral comum, que possuía apenas um componente, infectava monocotiledôneas e era transmitido por cigarrinhas (Rybicki, 1994; Rojas *et al.*, 2005). Comparações de seqüências de espécies do gênero *Mastrevirus* com aquelas dos gêneros *Curtovirus* e *Begomovirus* demonstraram que as primeiras são mais divergentes entre si, o que sugere que os mastrevírus evoluíram por um período de tempo mais longo. O processo evolutivo levou à capacidade de infecção de plantas dicotiledôneas e em seguida à transmissão pela mosca-branca, uma vez que existem mastrevírus (transmitidos por cigarrinhas) que infectam dicotiledôneas, mas até o presente não foram encontrados geminivírus transmitidos por mosca-branca que infectem monocotiledôneas. Esse ancestral dos begomovírus modernos possuía apenas um componente. A aquisição do segundo componente teria ocorrido antes da separação dos continentes, uma vez que os begomovírus bissegmentados são encontrados tanto no Velho Mundo como no Novo Mundo. Begomovírus monossegmentados adquiriram DNA satélites, como o DNA β , em um ponto da sua evolução após a separação dos begomovírus do Novo e Velho Mundo, uma vez que, até o presente, os DNA satélites só foram encontrados em associação com begomovírus monossegmentados nativos do Velho Mundo (Mansoor *et al.*, 2003). Análises filogenéticas dos DNAs β e seus begomovírus associados sugerem que o satélite e o vírus auxiliar co-evoluíram como consequência do isolamento geográfico e adaptação ao hospedeiro (Zhou *et al.*, 2003; Rojas *et al.*, 2005).

Membros do gênero *Curtovirus* seriam derivados de antigas recombinações entre mastrevírus e begomovírus, resultando na aquisição da CP de um mastrevírus ancestral transmitido por uma cigarrinha primitiva, ao passo que um begomovírus teria contribuído com os genes associados à replicação (Rybicki, 1994; Padidam *et al.*, 1995). Outro evento de recombinação foi identificado para o TPCTV, o único membro do gênero *Topocuvirus*. O seqüenciamento do genoma completo desse vírus demonstrou que sua seqüência é totalmente distinta de todos os outros geminivírus, apresentando 19-22% de identidade com *Mastrevirus*, 34-37% com *Curtovirus* e 32-38% com *Begomovirus* (Briddon *et al.*, 1996). Além disso, verificou-se que esse vírus surgiu após recombinação entre um curtovírus ancestral e um outro vírus que não possui semelhança com nenhum outro geminivírus, o que sugere que outros geminivírus, não relacionados com vírus pertencentes aos quatro gêneros atualmente reconhecidos, podem estar presentes no campo (Briddon *et al.*, 1996).

Diversidade e estrutura genética de populações de begomovírus

Populações de geminivírus, incluindo os begomovírus, possuem um elevado grau de diversidade genética. A ocorrência de eventos frequentes de recombinação (Padidam *et al.*, 1999), a ocorrência de pseudo-recombinação entre vírus com genoma bissegmentado (Andrade *et al.*, 2006), e a alta taxa de evolução molecular (Duffy e Holmes, 2008) contribuem para esse elevado grau de diversidade. Diversos estudos já foram realizados com o objetivo de investigar a estrutura genética de populações de geminivírus, em diversos hospedeiros e em diferentes regiões geográficas. Recentemente, com o advento de técnicas de amplificação do genoma viral completo (“rolling circle amplification”, RCA), novas possibilidades foram criadas para a análise

de populações virais em escala genômica (Haible *et al.*, 2006), e pelo menos um trabalho nesse sentido já foi publicado (Owor *et al.*, 2007).

Mutação, recombinação e pseudo-recombinação são as principais fontes de variabilidade genética de vírus em plantas (Garcia-Arenal *et al.*, 2003; Seal *et al.*, 2006b). Sob diferentes condições de seleção, como presença de um efeito gargalo (população inicial pequena do vírus, período curto de aquisição pelo vetor), transferências sucessivas entre hospedeiros sem emprego do vetor, e inoculação em plantas resistentes, isolados de MSV apresentaram alta frequência de mutação, da ordem de 10^{-4} a 10^{-5} (Isnard *et al.*, 1998). Resultados similares foram obtidos num experimento controlado de análise da taxa de variabilidade genética do begomovírus *Tomato yellow leaf curl China virus* (TYLCCNV) onde foi encontrada uma frequência média de mutação de $3,5 \times 10^{-4}$ e $5,3 \times 10^{-4}$ após 60 dias de infecção em *N. benthamiana* e tomateiro, respectivamente (Ge *et al.*, 2007). Taxas de mutação para o TYLCV foram estimadas em $2,88 \times 10^{-4}$ subs/sítio/ano para o genoma completo (Duffy e Holmes, 2008). A região que codifica a proteína capsidial apresentou uma taxa maior ($4,63 \times 10^{-4}$ subs/sítio/ano) e a região intergênica (não codificadora) apresentou uma taxa ainda maior ($1,56 \times 10^{-3}$ subs/sítio/ano). Entretanto, as mutações observadas foram na maioria sinônimas, sugerindo que as altas taxas de mutação observadas refletem mais uma rápida dinâmica mutacional do que uma freqüente evolução adaptativa (Duffy e Holmes, 2008). Estas taxas de mutação foram similares as estabelecidas para vírus de RNA, que estão entre 10^{-3} e 10^{-5} subs/sítio/ano (Jenkins *et al.*, 2002). Altas taxas de mutação foram observadas para begomovírus infectando plantas daninhas (Ooi *et al.*, 1993) e plantas cultivadas (Sanz *et al.*, 1999; Duffy e Holmes, 2008). Por outro lado, mutantes para a proteína Rep do TGMV e do CaLCuV que não permitem a interação com a proteína pRB, inoculados em protoplastos de fumo e em plantas de *N.*

benthamiana, apresentaram até 100% de frequência de reversão da mutação, evidenciando a capacidade de populações de geminivírus de evoluir rapidamente para alterar mudanças deletérias em seu genoma (Arguello-Astorga *et al.*, 2007).

As frequências de mutação e as taxas de substituição de nucleotídeos observadas para geminivírus apresentam valores similares aos verificados para vírus de RNA, apesar da expectativa de que fossem menores devido à utilização da maquinaria de replicação do hospedeiro, que permite corrigir as incorporações incorretas de nucleotídeos, aumentando a fidelidade da replicação (Duffy e Holmes, 2008). É possível que os geminivírus não utilizem os mecanismos de correção de erro da síntese de DNA do hospedeiro, permitindo o incremento das taxas de mutação de forma que mutações não deletérias sejam mantidas (Sanz *et al.*, 1999).

A recombinação intermolecular é considerada fundamental para a geração de variabilidade genética dos geminivírus. O conhecimento da existência e frequência de recombinação em uma população de vírus pode ajudar a entender quais genes são intercambiados e o surgimento de novas variantes de vírus. Esta informação é essencial, por exemplo, para tentar determinar a durabilidade da resistência genética, pois novas variantes recombinantes poderiam ser formadas com incremento da adaptabilidade a genótipos resistentes (Awadalla, 2003).

A alta frequência de recombinação dos geminivírus pode ser explicada em parte por uma possível estratégia de replicação dependente de recombinação (Preiss e Jeske, 2003), pela ocorrência frequente de infecções mistas (Torres-Pacheco *et al.*, 1996; Harrison *et al.*, 1997; Sanz *et al.*, 2000; Pita *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.*, 2003), e pela característica de infecção do mesmo núcleo da célula por mais de um begomovírus (Morilla *et al.*, 2004).

A emergência frequente de novas espécies de geminivírus devido a eventos de recombinação foi demonstrada por meio de análise de conversão gênica (Padidam *et al.*, 1999). Embora na época o número de genomas completos sequenciados fosse pequeno, os autores analisaram todas as combinações dois-a-dois possíveis, e identificaram 420 fragmentos recombinantes tanto entre espécies como entre gêneros da família *Geminiviridae*. A recombinação entre geminivírus é de fato um evento frequente, e um sítio frequente (“hot spot”) de recombinação está localizado na origem de replicação viral. A comparação de seqüências de begomovírus mono- e bissegmentados depositadas no GenBank até maio de 2006 (123 e 116 seqüências, respectivamente) indicou que a região do gene *Rep* que codifica a porção N-terminal da proteína Rep, assim como a região intergênica adjacente, são freqüentemente intercambiados durante a replicação. Também foram determinados sítios freqüentes de recombinação (“hot-spots”) localizados na região intergênica entre os genes CP e REn (Lefeuvre *et al.*, 2007).

A existência de dois componentes genômicos na maioria dos begomovírus promove um mecanismo alternativo, conhecido como pseudo-recombinação, pelo qual a troca de material genético pode ocorrer sem necessidade de recombinação intermolecular, ocorrendo apenas a troca de componentes entre dois vírus distintos (Gilbertson *et al.*, 1993b; Sung e Coutts, 1995; Andrade *et al.*, 2006; revisado por Rojas *et al.*, 2005). A ocorrência natural de pseudo-recombinantes no campo foi verificada no México, em tomateiros infectados pelo *Chino del tomate virus* (CdTV) (Paplomatas *et al.*, 1994).

Experimentos com pseudo-recombinação são ferramentas úteis no estudo de funções de genes e podem revelar relações filogenéticas, como é o caso da mistura de componentes genômicos do *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) e *Bean golden*

mosaic virus (BGMV), que possuem identidade inferior a 75% em suas seqüência de nucleotídeos e não formam pseudo-recombinantes infecciosos (Gilbertson *et al.*, 1993a). Por outro lado, pseudo-recombinantes formados a partir da mistura de componentes genômicos de dois isolados de BGYMV mostraram-se infecciosos. Quando inoculada, a mistura formada a partir do DNA-A do isolado da Guatemala (BGYMV-GA) e DNA-B do isolado da República Dominicana (BGYMV-DR) foi capaz de induzir os mesmos sintomas apresentados pelos vírus parentais, enquanto o pseudo-recombinante recíproco (DNA-A do BGYMV-DR e DNA-B do BGYMV-GA) induziu sintomas atenuados e tardios. Esses resultados demonstram que geminivírus com regiões comuns suficientemente similares podem formar pseudo-recombinantes infecciosos, mas ressaltam que freqüentemente os pseudo-recombinantes recíprocos apresentam diferenças na eficiência de replicação e infecção sistêmica (Faria *et al.*, 1994). Esse fato também foi observado para o ACMV (Stanley, 1995) e TGMV (Von Arnim e Stanley, 1992).

A especificidade da ligação da proteína Rep aos iterons é considerada o principal determinante da formação de pseudo-recombinantes viáveis entre diferentes espécies/estirpes de begomovírus (Argüello-Astorga *et al.*, 1994; Eagle *et al.*, 1994; Fontes *et al.*, 1994a; Chatterji *et al.*, 1999; Andrade *et al.*, 2006; Bull *et al.*, 2007). Outro fator importante é a conservação da seqüência de aminoácidos da proteína Rep, especialmente os três aminoácidos que estariam envolvidos diretamente na ligação aos iterons (Arguello-Astorga e Ruiz-Medrano, 2001). A viabilidade de pseudo-recombinantes indica que fatores envolvidos na replicação e movimento são intercambiáveis entre espécies altamente relacionadas, ou entre estirpes de uma mesma espécie. A assimetria entre pseudo-recombinantes recíprocos indica que a pseudo-

recombinação entre begomovírus é um fenômeno complexo que envolve interações entre fatores do vírus e do hospedeiro (Hill *et al.*, 1998).

Embora a pseudo-recombinação seja comum entre estirpes de uma mesma espécie de begomovírus, a formação de pseudo-recombinantes viáveis entre espécies distintas é mais difícil. Um pseudo-recombinante foi obtido entre o DNA-A do *Abutilon mosaic virus* (AbMV) e o DNA-B do *Sida golden mosaic Costa Rica virus* (SiGMCRV), porém o pseudo-recombinante recíproco não foi infeccioso (Hofer *et al.*, 1997b). Similarmente, um pseudo-recombinante viável foi formado pelo DNA-A de um isolado de SiGMV de Honduras (SiGMV-[Ho_{yy}]) e o DNA-B do SiGMCRV (Unsel *et al.*, 2000). Entretanto, dentre os pseudo-recombinantes recíprocos formados pelo DNA-A do SiGMCRV combinado ao DNA-B de três isolados de SiGMV-[Ho_{yy}] que possuíam pequenas diferenças na composição de nucleotídeos, apenas um mostrou-se viável, porém pouco eficiente, e não foi capaz de infectar a planta a partir da qual foi originalmente isolado (Unsel *et al.*, 2000). Pseudo-recombinantes infecciosos entre o DNA-A do CdTV e o DNA-B do BGYMV foram formados apesar da baixa identidade da região comum (68%), porém o pseudo-recombinante recíproco não foi infeccioso quando inoculado em feijoeiro (Garrido-Ramirez *et al.*, 2000).

Pseudo-recombinantes produzidos entre o DNA-A do *Tomato mottle virus* (ToMoV) e o DNA-B do *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV), embora infecciosos, apresentaram acúmulo reduzido do DNA-B e induziram sintomas atenuados em *N. benthamiana* (Gilbertson *et al.*, 1993b; Hou e Gilbertson, 1996). Entretanto, após três passagens mecânicas sucessivas nesse hospedeiro, os sintomas tornaram-se idênticos aos produzidos pelo ToMoV e o nível do DNA-B tornou-se igual ao do DNA-A. A análise das regiões comuns dos DNAs -A e -B do pseudo-recombinante comprovou a ocorrência de recombinação intermolecular na região comum do BDMV, que foi

substituída quase que totalmente pela região comum do DNA-A do ToMoV (Hou e Gilbertson, 1996). Assim, o DNA-B passou a ser reconhecido com 100% de eficiência pela proteína Rep do ToMoV. Esse resultado evidencia a importância da pseudo-recombinação na evolução de geminivírus e em sua adaptação a novos hospedeiros.

A formação de pseudo-recombinantes viáveis não depende somente da relação filogenética e conservação dos iterons, já que pseudo-recombinantes infecciosos foram formados entre o DNA-A do TGMV e o DNA-B do *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), que possuem iterons distintos. Além disso, a assimetria na formação do pseudo-recombinante recíproco sugere que a proteína Rep do TGMV tem maior versatilidade em termos de reconhecimento de componentes de DNA heterólogos comparada à do ToYSV (Andrade *et al.*, 2006).

Além de fatores virais, fatores relacionados ao hospedeiro determinam o grau de variabilidade genética da população viral. Por exemplo, foi demonstrado que a propagação sexuada de plantas de *Eupatorium* leva a um maior grau de variabilidade genética da população viral em relação à propagação assexuada do mesmo hospedeiro (Ooi e Yahara, 1999). Além disso, a frequência de infecção foi maior nas plantas propagadas assexuadamente, provavelmente em consequência da menor variabilidade genética do hospedeiro. Levando em consideração os efeitos da reprodução sexuada nas populações do patógeno e do hospedeiro, os autores concluem que a reprodução sexuada é vantajosa para o hospedeiro. Entretanto, a metodologia utilizada (análise dos padrões de conformação de DNA de fita simples) fornece informações limitadas. Atualmente, com a possibilidade do sequenciamento em larga escala de genomas completos, informações mais confiáveis podem ser obtidas.

Diversos trabalhos realizados ao longo das décadas de 1990 e 2000 avaliaram a estrutura populacional de begomovírus infectando mandioca na África Sub-Sahariana e

no Sub-Continente Indiano. Nos países dessas regiões, a mandioca pode ser infectada por sete espécies de begomovírus (Fauquet e Fargette, 1990; Fargette *et al.*, 1993; Legg e Raya, 1993) (curiosamente, não existem relatos de begomovírus que infectam mandioca no Brasil, o centro de origem e diversidade genética da planta). Os estudos realizados demonstraram um elevado grau de variabilidade genética da população viral em diversos países. A ocorrência frequente de infecções mistas facilita a ocorrência de pseudo-recombinação e recombinação, e em pelo menos dois casos foi demonstrada a emergência de novas espécies como consequência direta desses mecanismos (Zhou *et al.*, 1997; Fondong *et al.*, 2000). Um recombinante entre o DNA-A do ACMV e do *East African cassava mosaic virus* (EACMV), denominado EACMV-UG2, e um DNA-B pseudo-recombinante foram associados com a epidemia severa que atingiu diversos países da África Sub-Sahariana ao longo da década de 1990 (Legg e Thresh, 2000; Pita *et al.*, 2001).

Na Tanzânia, todas as sete espécies de begomovírus que infectam mandioca já foram relatadas (Ndunguru *et al.*, 2005). Diversos eventos de recombinação foram detectados entre as estirpes TZ1 e TZ7 do *East African cassava mosaic Cameroon virus* (EACMCV). A análise de sequências indicou que as duas estirpes têm a mesma origem local, e portanto não foram introduzidas recentemente. A variabilidade genética da população viral foi analisada também com base no DNA-B de isolados de EACMV, o que também indicou a existência de diversos eventos de recombinação. Os resultados indicam que a região central do continente africano é um centro de diversidade genética viral (Ndunguru *et al.*, 2005).

Além dos begomovírus que infectam a mandioca, a África também é o centro de origem dos mastrevírus que infectam gramíneas (Palmer e Rybicki, 1998). Um estudo recente utilizando RCA analisou a estrutura genética da população viral em Uganda, um

dos países mais afetados pelo estriado do milho causado pelo MSV (Owor *et al.*, 2007). Amostras foram coletadas em 155 locais cobrindo todo o país. Inicialmente, fragmentos do genoma viral foram amplificados via PCR e a variabilidade foi analisada por meio de PCR-RFLP. Um total de 49 variantes foram identificadas a partir de 391 isolados virais. A partir dessas 49 variantes, um total de 62 genomas completos foram sequenciados, e uma origem recombinante foi demonstrada para 52 desses genomas. Entretanto, um único recombinante, denominado MSV-A(1)UgIII, estava presente em infecção simples em mais de 60% das amostras infectadas em todo o país. Os autores concluem que, embora a ocorrência de recombinação entre mastrevírus seja tão ou mais frequente em comparação com os begomovírus, o MSV deve estar sujeito a gargalos que limitam a variabilidade genética das populações naturais.

Na Europa e demais países do Mediterrâneo, a cultura do tomateiro é severamente afetada pelo enrolamento amarelo causado pelo complexo de espécies relacionadas ao TYLCV (Moriones e Navas-Castillo, 2000). Na Espanha, as espécies TYLCV e *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) coexistem no campo e são frequentemente encontradas em infecções mistas. Um recombinante natural entre as duas espécies, denominado ES421/99, foi detectado e caracterizado (Monci *et al.*, 2002). O recombinante ES421/99 apresenta um fenótipo mais agressivo em relação aos vírus que lhe deram origem, o que foi sugerido ser uma vantagem adaptativa. Essa hipótese foi comprovada em levantamentos de campo que confirmaram a prevalência do recombinante nas regiões geográficas onde ele foi inicialmente detectado (Monci *et al.*, 2002).

Uma análise mais ampla, com mais de 1900 amostras de dois hospedeiros (tomateiro e feijoeiro comum) coletadas ao longo de quatro anos em diferentes países da região mediterrânea, identificou isolados pertencentes a três espécies (TYLCV,

TYLCSV e *Tomato yellow leaf curl Malaga virus*, TYLCMV), além de um novo recombinante (Garcia-Andres *et al.*, 2007). Apesar da ocorrência frequente de infecções mistas, as populações virais eram altamente estruturadas, com base no hospedeiro, na região geográfica e no tempo. Com exceção da estirpe típica do TYLCV, subpopulações únicas, não diferenciadas, foram encontradas para cada espécie e estirpe viral, provavelmente como consequência de um efeito fundador pronunciado. Resultados bastante semelhantes foram encontrados após a análise de 358 isolados de TYLCV e TYLCSV coletados na Espanha de 1997 a 2001 (Font *et al.*, 2007), e de 111 isolados de TYLCV coletados nas Ilhas La Réunion de 1997 a 2004 (Delatte *et al.*, 2007). Nesse último caso, a baixíssima variabilidade genética encontrada inicialmente foi seguida de um aumento praticamente linear da variabilidade ao longo do período amostral. Além disso, o tamanho efetivo da população aumentou repentinamente de 2001 a 2004, o que é consistente com um efeito fundador devido à introdução de uma população pequena em um ambiente geograficamente isolado.

Em contraste com a baixa variabilidade genética encontrada em populações naturais do TYLCV na Europa, uma elevada taxa de evolução de isolados do *Tomato yellow leaf curl China virus* (TYLCCNV) foi relatada após a inoculação artificial de plantas de tomateiro e *N. benthamiana* (Ge *et al.*, 2007). A população de TYLCCNV nessas plantas consistia em uma sequência consenso e um grupo de mutantes bastante relacionados a essa sequência consenso, o que está de acordo com o conceito de *quasispecies* proposto para populações de vírus de RNA. A frequência de mutação encontrada foi de $3,5 \times 10^{-4}$ e $5,3 \times 10^{-4}$ após 60 dias de infecção em *N. benthamiana* e tomateiro, respectivamente, valores comparáveis aos relatados para vírus de RNA. Os resultados sugerem que o TYLCCNV possui uma rápida taxa de evolução e adaptação em resposta a práticas agrícolas. Entretanto, é fundamental ressaltar que esses estudos

foram feitos sem o emprego do inseto vetor. Portanto, seria mais correto afirmar que o TYLCCNV apresenta uma taxa potencial de evolução molecular elevada. É razoável supor que populações naturais possuem variabilidade genética inferior ao potencial, devido ao gargalo genético imposto pelo inseto vetor.

Uma análise recente utilizando técnicas de genealogia por processos coalescentes estimou a taxa de evolução molecular do TYLCV com base em seqüências depositadas em bancos de dados (e, conseqüentemente, provenientes de populações naturais transmitidas pelo inseto vetor) entre 1988 e 2006 (Duffy e Holmes, 2008). Eliminando seqüências com origem recombinante, os autores encontraram uma taxa média de substituição para o gene que codifica a proteína capsidial de $4,63 \times 10^{-4}$ subs/sítio/ano. A região intergênica, supostamente mais variável, de fato apresentou uma taxa ainda maior de $1,56 \times 10^{-3}$ subs/sítio/ano. Essas taxas são semelhantes às que foram encontradas para vírus de ssDNA infectando mamíferos e também para vírus de RNA, e sugerem que a alta taxa de evolução dos geminivírus, independentemente da ocorrência de eventos de recombinação, poderia explicar a freqüente emergência de novas espécies em diferentes hospedeiros. Os autores utilizaram esses dados para calibrar o “relógio molecular” do vírus e assim calcular o tempo ao mais recente ancestral comum, determinando que o complexo TYLCV diversificou-se antes do advento da agricultura (Duffy e Holmes, 2008).

Variabilidade genética de begomovírus em tomateiro no Brasil

O primeiro relato de geminivírus em tomateiro no Brasil foi feito na década de 1970 (Costa *et al.*, 1975). O vírus foi caracterizado e denominado *Tomato golden mosaic virus* (TGMV). Além do TGMV, cinco outros vírus transmitidos por mosca-branca foram identificados, porém sem causar danos de importância econômica (Matyis

et al., 1975). Isso provavelmente ocorreu porque o biótipo A de *B. tabaci*, o único presente no Brasil na época, coloniza o tomateiro com baixa eficiência (Bedford *et al.*, 1994).

Em 1992, no estado de São Paulo, constatou-se a presença do biótipo B de *B. tabaci*, provavelmente introduzido pela importação de plantas ornamentais da Europa ou dos EUA (Melo, 1992). Comparado ao biótipo A, o biótipo B apresenta maior grau de adaptação e dispersão, com uma gama de hospedeiros muito mais ampla, incluindo solanáceas como o tomateiro, e diversas espécies de plantas silvestres e/ou daninhas (Bedford *et al.*, 1994).

A presença do biótipo B no Distrito Federal foi confirmada em 1993, associada a sintoma de infecção por begomovírus em tomateiros para processamento industrial (Ribeiro *et al.*, 1994; França *et al.*, 1996). A partir de plantas com sintomas típicos, fragmentos de DNA correspondentes aos dois componentes genômicos dos begomovírus foram amplificados via PCR. A seqüência de nucleotídeos desses fragmentos indicou tratar-se de nova espécie de begomovírus, distinta do TGMV e denominada Tomato chlorotic vein virus (TCIVV) (Bezerra *et al.*, 1996; Ribeiro *et al.*, 2003). Até o presente, a caracterização molecular do TCIVV ainda não foi completada.

Relatos adicionais de begomovírus em tomateiro foram feitos em São Paulo (Faria *et al.*, 1997), no Rio de Janeiro (Galvão *et al.*, 1998) e na região Nordeste, em amostras de tomateiro provenientes da Bahia (Ribeiro *et al.*, 1996) e de Pernambuco (Bezerra *et al.*, 1997). Em 1997 a doença foi relatada no submédio São Francisco, na época a principal região produtora de tomate para processamento industrial no Brasil, acarretando perdas de até 100% em diversas áreas e levando ao abandono da tomaticultura intensiva na região (Bezerra *et al.*, 1997). Em todos esses casos, o aparecimento do vírus ocorreu logo após a introdução do biótipo B de *B. tabaci*.

No Triângulo Mineiro, uma nova espécie de begomovírus foi identificada em tomateiros em 1996 (Rezende *et al.*, 1996; Zerbini *et al.*, 1996b). A comparação da seqüência completa de nucleotídeos do DNA-A e DNA-B com as de outros begomovírus comprovou tratar-se de uma nova espécie, denominada *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) (Ribeiro *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2006). Levantamento de campo realizado em junho de 2000 nos municípios de Araguari, Indianópolis e Uberlândia indicou a prevalência do ToRMV, detectado em 73% das 148 amostras coletadas e positivas para begomovírus (Fernandes, 2001). O ToRMV foi caracterizado biologicamente e molecularmente (Fernandes *et al.*, 2006).

Na Zona Metalúrgica de Minas Gerais, outro begomovírus foi isolado de amostras de tomateiro no mesmo ano (Zerbini *et al.*, 1996a). A comparação da seqüência completa de nucleotídeos do DNA-A e DNA-B com outros begomovírus (incluindo o ToRMV) demonstrou tratar-se de nova espécie, designada *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) (Andrade *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2003). A identidade de seqüência entre o ToCMoV e o ToRMV é de aproximadamente 85% para o DNA-A e 80% para o DNA-B, indicando tratar-se de vírus distintos, porém altamente relacionados. Outros isolados do ToCMoV foram identificados na Bahia, Espírito Santo, Pernambuco e Rio de Janeiro (Ribeiro *et al.*, 2003). O isolado da Bahia foi caracterizado biologicamente e molecularmente (Ribeiro *et al.*, 2007).

Além do ToRMV e ToCMoV, um isolado de begomovírus foi detectado em São João de Bicas, Minas Gerais, causando sintomas severos em tomateiro. O isolado, denominado MG-Bi2, foi caracterizado biologicamente e molecularmente, demonstrando tratar-se de uma nova espécie denominada *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) (Calegario *et al.*, 2007). Curiosamente, apesar de ter sido isolado de tomateiro, o ToYSV apresenta relacionamento filogenético mais próximo com

begomovírus isolados de *Sida* sp., como o *Sida mottle virus* (SiMoV), *Sida yellow mosaic virus* (SiYMV) e *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV) (Andrade *et al.*, 2006).

A caracterização molecular parcial de begomovírus isolados de tomateiros nas principais regiões produtoras do Nordeste e Sudeste brasileiros (com exceção do estado de São Paulo) indicou a presença de pelo menos cinco novas espécies virais, incluindo o ToRMV, ToCMoV e ToYSV (Ribeiro *et al.*, 2003).

Esses relatos, considerados em conjunto, indicam claramente que a emergência de novos begomovírus em tomateiros no Brasil foi favorecida pela rápida disseminação do biótipo B de *B. tabaci* (Lourenção e Nagai, 1994; Haji *et al.*, 1999). Agindo como vetor, o inseto teria permitido que vírus nativos infectando plantas silvestres e daninhas chegassem ao tomateiro e se adaptassem ao novo hospedeiro em um rápido processo evolutivo, culminando com o surgimento de novas espécies. Estudos realizados no México e nos EUA sugerem que esse processo de evolução e adaptação pode ocorrer em períodos de tempo da ordem de 5-10 anos (Hou e Gilbertson, 1996; Torres-Pacheco *et al.*, 1996).

Evidências de recombinação e pseudo-recombinação já foram encontradas em associação ao complexo de begomovírus infectando o tomateiro no Brasil. Galvão *et al.* (2003) e Ribeiro *et al.* (2007) sugeriram que os isolados MG-Bt1 e BA-Se1, respectivamente, do ToCMoV, possuem origem recombinante. A formação de pseudo-recombinantes viáveis entre clones infecciosos do TGMV (DNA-A) e ToYSV (DNA-B), e entre o ToYSV (DNA-A) e o *Tomato crinkle leaf yellow virus* (ToCrLYV) (DNA-B), foi demonstrada em experimentos de inoculação com clones infecciosos (Andrade *et al.*, 2006). Além disso, foi sugerida a pseudo-recombinação entre o ToRMV e um novo vírus em condições naturais (planta infectada no campo) (Fernandes *et al.*, 2006).

Levantamentos realizados nos últimos cinco anos (Castillo-Urquiza *et al.*, 2007; Cotrim *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2008) indicam que determinadas espécies tornaram-se prevalentes em diferentes regiões do país. Seqüenciamento direto de fragmentos de PCR de amostras de tomateiro coletadas na região central do estado de São Paulo nos anos de 2003 e 2004 indicou como espécie predominante o *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), presente em 50% das amostras analisadas. A presença do *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) e do SiMoV também foi detectada (Cotrim *et al.*, 2007). Também mediante o seqüenciamento de fragmentos de PCR obtidos de amostras de tomateiro, coletadas entre 2002 e 2004 no Distrito Federal e nos estados da Bahia, Goiás, Minas Gerais, Pernambuco e São Paulo, verificou-se a presença do ToSRV em 61% das amostras, além do *Tomato golden vein virus* (TGVV), *Tomato mottle leaf curl virus*, ToYVSV e duas possíveis novas espécies (Fernandes *et al.*, 2008).

Diversas espécies de begomovírus infectando plantas daninhas como *Sida rhombifolia*, *S. micrantha* e *Agerantum conizoides* já foram isoladas e caracterizadas (Tan *et al.*, 1995; Frischmuth *et al.*, 1997; Jovel *et al.*, 2004). Diversos relatos podem ser encontrados na literatura associando infecções de plantas por geminivírus à presença de plantas daninhas nas lavouras (Creamer *et al.*, 1996; Roye *et al.*, 1997; Umaharan *et al.*, 1998; Sánchez-Campos *et al.*, 1999). O SiGMV, isolado a partir de *S. rhombifolia* e que não tem ocorrência no Brasil, é capaz de infectar também plantas de tomateiro e de feijoeiro (Frischmuth *et al.*, 1997).

O SiMoV, obtido de plantas de *S. rhombifolia* coletadas em Viçosa, MG (Fernandes *et al.*, 1999), foi encontrado em plantas de tomateiro na Zona Metalúrgica no estado de Minas Gerais (Calegario, 2004). No estado do Ceará, espécies de plantas daninhas pertencentes as famílias Amaranthacea, Asteraceae, Euphorbiaceae e

Rubiaceae (*Acanthospermum hispidum*, *Ageratum conyzoides*, *Amaranthus deflexus*, *A. spinosus*, *A. viridis*, *Bidens pilosa*, *Borreria capitata* e *Euphorbia heterophylla*), sem sintomas visíveis de infecção viral porém associadas a cultivos de tomateiro com sintomas típicos de infecção por begomovírus, foram identificadas como hospedeiras naturais de begomovírus (Santos *et al.*, 2003; Arnaud *et al.*, 2007). Plantas daninhas coletadas em municípios dos estados de Alagoas, Bahia e Pernambuco, com sintomas de mosaico amarelo, deformação do limbo foliar e redução do crescimento, foram avaliadas para a presença de begomovírus via PCR (Assunção *et al.*, 2006). A infecção viral foi confirmada em *Cleome affinis*, *Cnidoscolus urens*, *Desmodium* sp., *Herissantia crispa*, *Macroptilium lathyroides*, *Sidastrum micranthum*, *Sida rhombifolia*, *Sida spinosa*, *Triumfetta semitriloba* e *Waltheria indica* (pertencentes as famílias Capparaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Malvaceae e Sterculiaceae). Padrões distintos de clivagem obtidos em análise de PCR-RFLP sugeriram a existência de um alto grau de variabilidade genética (Assunção *et al.*, 2006). Entretanto, as espécies de begomovírus infectando estas plantas não foram identificadas e nem caracterizadas.

LITERATURA CITADA

- Agriannual. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Agroinformativos. 2007. 491 p.
- Alfenas, P.C., Galvão, R.M., Andrade, E.C., Mandelli, M.S., Fernandes, A.V., Zerbini, F.M. e Fontes, E.P.B. Detecção e caracterização molecular de novos geminivírus que infectam tomateiros. *Fitopatologia Brasileira*, v.23, p.311. 1998.
- Ambrozevicius, L.P., Calegario, R.F., Fontes, E.P.B., Carvalho, M.G. e Zerbini, F.M. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v.27, p.372-377. 2002.
- Andrade, E.C., Ambrozevicius, L.P., Calegario, R.F., Fontes, E.P.B. e Zerbini, F.M. Molecular cloning and characterization of *Tomato chlorotic mottle virus* (TCMV), a new tomato-infecting begomovirus. *Virus Reviews and Research*, v.7, p.153. 2002.
- Andrade, E.C., Manhani, G.G., Alfenas, P.F., Calegario, R.F., Fontes, E.P.B. e Zerbini, F.M. *Tomato yellow spot virus*, a tomato-infecting begomovirus from Brazil with a closer relationship to viruses from *Sida* sp., forms pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from *Sida*. *Journal of General Virology*, v.87, p.3687-3696. 2006.
- Arguello-Astorga, G., Ascencio-Ibanez, J.T., Dallas, M.B., Orozco, B.M. e Hanley-Bowdoin, L. High frequency reversion of geminivirus replication protein mutants during infection. *Journal of Virology*. 2007.
- Argüello-Astorga, G., Herrera-Estrella, L. e Rivera-Bustamante, R. Experimental and theoretical definition of geminivirus origin of replication. *Plant Molecular Biology*, v.26, p.553-556. 1994.
- Arguello-Astorga, G., Lopez-Ochoa, L., Kong, L.J., Orozco, B.M., Settlege, S.B. e Hanley-Bowdoin, L. A novel motif in geminivirus replication proteins interacts with the plant retinoblastoma-related protein. *Journal of Virology*, v.78, p.4817-4826. 2004.
- Arguello-Astorga, G.R. e Ruiz-Medrano, R. An iteron-related domain is associated to Motif 1 in the replication proteins of geminiviruses: identification of potential

- interacting amino acid-base pairs by a comparative approach. *Archives of Virology*, v.146, p.1465-1485. 2001.
- Arnaud, L.S.E.P., Santos, C.D.G., Lima, J.A.A. e Feitosa, F.A.A. Predominância de begomovírus em tomateiros na região produtora da Serra de Ibiapaba, Ceará, e sua detecção natural em plantas daninhas. *Fitopatologia Brasileira*, v.32, p.241-246. 2007.
- Assunção, I.P., Listik, A.F., Barros, M.C.S., Amorim, E.P.R., Silva, S.J.C., Izael, O.S., Ramalho-Neto, C.E. e Lima, G.S.A. Diversidade genética de begomovírus que infectam plantas invasoras na Região Nordeste. *Planta daninha*, v.24, p.239-244. 2006.
- Awadalla, P. The evolutionary genomics of pathogen recombination. *Nature Reviews Genetics*, v.4, p.50-60. 2003.
- Bedford, I.D., Briddon, R.W., Brown, J.K., Rosell, R.C. e Markham, P.G. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographical regions. *Annals of Applied Biology*, v.125, p.311-325. 1994.
- Bellows, T.S., Perring, T.M., Gill, R.J. e Headrick, D.H. Description of a new species of *Bemisia*. *Annals of the Entomological Society of America*, v.87, p.195-206. 1994.
- Bezerra, I.C., Lima, M.F., Ribeiro, S.G., Giordano, L.B., Zerbini, F.M. e Ávila, A.C. Occurrence of geminivirus in tomato-producing areas in Submédio São Francisco. *Fitopatologia Brasileira*, v.22, p.331. 1997.
- Bezerra, I.C., Ribeiro, S.G., Ávila, A.C. e Giordano, L.B. Survey of geminivirus infection in tomato producing areas in Federal District. VIII Encontro Nacional de Virologia. São Lourenço, MG, 1996. 289 p.
- Briddon, R.W. Cotton leaf curl disease, a multicomponent begomovirus complex. *Molecular Plant Pathology*, v.4, p.427-434. 2003.
- Briddon, R.W., Bedford, I.D., Tsai, J.H. e Markham, P.G. Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, tomato pseudo-curly top virus, suggests a recombinant origin. *Virology*, v.219, p.387-394. 1996.
- Briddon, R.W., Bull, S.E., Amin, I., Idris, A.M., Mansoor, S., Bedford, I.D., Dhawan, P., Rishi, N., Siwatch, S.S., Abdel-Salam, A.M., Brown, J.K., Zafar, Y. e Markham, P.G. Diversity of DNA beta, a satellite molecule associated with some monopartite begomoviruses. *Virology*, v.312, p.106-121. 2003.
- Briddon, R.W., Mansoor, S., Bedford, I.D., Pinner, M.S., Saunders, K., Stanley, J., Zafar, Y., Malik, K.A. e Markham, P.G. Identification of DNA components required for induction of cotton leaf curl disease. *Virology*, v.285, p.234-243. 2001.
- Briddon, R.W., Pinner, M.S., Stanley, J. e Markham, P.G. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology*, v.177, p.85-94. 1990.
- Brown, J.K., Coats, S., Frohlich, D.R., Bedford, I.D. e Markham, P.G. Characterization and distribution of esterase electromorphs in the whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae). *Biochemistry and Genetics*, v.33, p.205-214. 1995.
- Brown, J.K. e Nelson, M.R. Transmission, host range, and virus-vector relationships of chilo del tomate virus, a whitefly-transmitted geminivirus from Sinaloa, Mexico. *Plant Disease*, v.72, p.866-869. 1988.

- Brown, J.K. e Poulos, B.T. Serrano golden mosaic virus: A newly identified whitefly-transmitted geminivirus of pepper and tomato in the United States and Mexico. *Plant Disease*, v.74, p.720. 1990.
- Brown, J.K.M. The choice of molecular marker methods for population genetic studies of plant pathogens. *New Phytologist*, v.133, p.183-195. 1996.
- Bull, S.E., Briddon, R.W., Sserubombwe, W.S., Ngugi, K., Markham, P.G. e Stanley, J. Genetic diversity and phylogeography of cassava mosaic viruses in Kenya. *Journal of General Virology*, v.87, p.3053-3065. 2006.
- Bull, S.E., Briddon, R.W., Sserubombwe, W.S., Ngugi, K., Markham, P.G. e Stanley, J. Infectivity, pseudorecombination and mutagenesis of Kenyan cassava mosaic begomoviruses. *Journal of General Virology*, v.88, p.1624-1633. 2007.
- Bull, S.E., Tsai, W.S., Briddon, R.W., Markham, P.G., Stanley, J. e Green, S.K. Diversity of begomovirus DNA beta satellites of non-malvaceous plants in East and Southeast Asia. *Archives of Virology*, v.149, p.1193-1200. 2004.
- Calegario, R.F. Caracterização do isolado de begomovírus MG-Bi2, um possível membro da espécie *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV). (Tese M.S.). Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004. 48 p.
- Calegario, R.F., Ferreira, S.S., Andrade, E.C. e Zerbini, F.M. Characterization of *Tomato yellow spot virus*, (ToYSV), a novel tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.42, p.1335-1343. 2007.
- Campbell, C.L. e Madden, L.V. Introduction to plant disease epidemiology. New York: John Wiley & Sons. 1990. 532 p.
- Campos-Olivas, R., Louis, J.M., Clerot, D., Gronenborn, B. e Gronenborn, A.M. 1H, 13C, and 15N assignment of the N-terminal, catalytic domain of the replication initiation protein from the geminivirus TYLCV. *J Biomol NMR*, v.24, p.73-74. 2002.
- Carbone, I. e Kohn, L.M. Inferring process from pattern in fungal population genetics. In: Arora, D.K. e Khachatourian, G.G. (Ed.). *Applied Mycology and Biotechnology - Fungal Genomics*. Amsterdam: Elsevier B. V., v.4, 2004. p.29-58.
- Carbone, I., Liu, Y.-C., Hillman, B.I. e Milgroom, M.G. Recombination and migration of *Cryphonectria hypovirus 1* as inferred from gene genealogies and the coalescent. *Genetics*, v.166, p.1611-1629. 2004.
- Carrasco, P., De La Iglesia, F. e Elena, S.F. Distribution of fitness and virulence effects caused by single-nucleotide substitutions in tobacco etch virus. *Journal of Virology*, v.81, p.12979-12984. 2007.
- Castillo, A.G., Collinet, D., Deret, S., Kashoggi, A. e Bejarano, E.R. Dual interaction of plant PCNA with geminivirus replication accessory protein (Ren) and viral replication protein (Rep). *Virology*, v.312, p.381-394. 2003.
- Castillo-Urquiza, G.P., Beserra Junior, J.E.A., Alfenas-Zerbini, P., Varsani, A., Lima, A.T.M., Barros, D.R. e Zerbini, F.M. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato in Paty do Alferes, Rio de Janeiro state, Brazil. *Virus Reviews and Research*, v.12, p.233. 2007.

- Chatterji, A., Padidam, M., Beachy, R.N. e Fauquet, C.M. Identification of replication specificity determinants in two strains of tomato leaf curl virus from New Delhi. *Journal of Virology*, v.73, p.5481-5489. 1999.
- Costa, A.S. Increase in the populational density of *Bemisia tabaci*, a threat to widespread virus infection of legume crops in Brazil. In: Bird, J. e Maramorosch, K. (Ed.). *Tropical Diseases of Legumes*. New York: Academic Press, 1975. p.171.
- Costa, A.S., Oliveira, A.R. e Silva, D.M. Transmissão mecânica do mosaico dourado do tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, v.6, p.147. 1975.
- Cotrim, M.A., Krause-Sakate, R., Narita, N., Zerbini, F.M. e Pavan, M.A. Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. *Summa Phytopathologica*, v.33, p.300-303. 2007.
- Creamer, R., Luque-Williamn, M. e Howo, M. Epidemiology and incidence of beet curly top geminivirus in naturally infected weed hosts. *Plant Disease*, v.80, p.533-535. 1996.
- Davies, J.W., Stanley, J., Donson, J., Mullineaux, P.M. e Boulton, M.I. Structure and replication of geminivirus genomes. *Journal of Cell Science*, v.7, p.95-107. 1987.
- Delatte, H., Holota, H., Moury, B., Reynaud, B., Lett, J.M. e Peterschmitt, M. Evidence for a founder effect after introduction of Tomato yellow leaf curl virus-Mild in an insular environment. *Journal of Molecular Evolution*, v.65, p.112-118. 2007.
- Downie, D.A. Locating the sources of an invasive pest, grape phylloxera, using a mitochondrial DNA gene genealogy. *Molecular Ecology*, v.11, p.2013-2026. 2002.
- Dry, I.B., Krake, L.R., Rigden, J.E. e Rezaian, M.A. A novel subviral agent associated with a geminivirus: the first report of a DNA satellite. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v.94, p.7088-7093. 1997.
- Duffy, S. e Holmes, E.C. Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus*. *Journal of Virology*, v.82, p.957-965. 2008.
- Eagle, P.A., Orozco, B.M. e Hanley-Bowdoin. A DNA sequence required for geminivirus replication also mediates transcriptional regulation. *Plant Cell*, v.6, p.1157-1170. 1994.
- Fargette, D., Jeger, M., Fauquet, C. e Fishpool, L.D.C. Analysis of temporal disease progress of African cassava mosaic virus. *Phytopathology*, v.84, p.91-98. 1993.
- Faria, J.C., Gilbertson, R.L., Hanson, S.F., Morales, F.J., Ahlquist, P.G., Loniello, A.O. e Maxwell, D.P. Bean golden mosaic geminivirus type II isolates from the Dominican Republic and Guatemala: Nucleotide sequences, infectious pseudorecombinants, and phylogenetic relationships. *Phytopathology*, v.84, p.321-329. 1994.
- Faria, J.C., 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, p.423. 1997.
- Fauquet, C. e Fargette, D. African cassava mosaic virus: etiology, epidemiology and control. *Plant Disease*, v.74, p.404-411. 1990.
- Fauquet, C.M., Briddon, R.W., Brown, J.K., Moriones, E., Stanley, J., Zerbini, F.M. e Zhou, X. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology*, v.153, p.DOI 10.1007/s00705-00008-00037-00706. 2008.

- Fernandes, A.V., Galvão, R.M., Machado, J.J., Zerbini, F.M. e Fontes, E.P.B. Cloning and molecular characterization of A components of two new *Sida rhombifolia*-infecting geminiviruses. *Virus Reviews and Research*, v.4, p.148. 1999.
- Fernandes, F.R., Albuquerque, L.C., Giordano, L.B., Boiteux, L.S., Ávila, A.C. e Inoue-Nagata, A.K. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes*, v.36, p.251-258. 2008.
- Fernandes, J.J. Caracterização e diversidade genética de geminivírus associados ao tomateiro na região do Triângulo Mineiro. (Tese D.S.). Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001. 192 p.
- Fernandes, J.J., Carvalho, M.G., Andrade, E.C., Brommonschenkel, S.H., Fontes, E.P.B. e Zerbini, F.M. Biological and molecular properties of Tomato rugose mosaic virus (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Plant Pathology*, v.55, p.513-522. 2006.
- Firmino, A.C., Krause-Sakate, R., Jidão, A.S. e Pavan, M.A. Três anos de análise de incidência do *Lettuce mosaic virus* (LMV) e *Lettuce mottle virus* (LeMoV) nos campos de produção de alface do Estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira*, v.30, p.192. 2005.
- Fondong, V.N., Pita, J.S., Rey, M.E.C., Kochko, A., Beachy, R.N. e Fauquet, C.M. Evidence of synergism between African cassava mosaic virus and a new double-recombinant geminivirus infecting cassava in Cameroon. *Journal of General Virology*, v.81, p.287-297. 2000.
- Font, M.I., Rubio, L., Martinez-Culebras, P.V. e Jorda, C. Genetic structure and evolution of natural populations of viruses causing the tomato yellow leaf curl disease in Spain. *Virus Research*, v.128, p.43-51. 2007.
- Fontes, E.P.B., Eagle, P.A., Sipe, P.S., Luckow, V.A. e Hanley-Bowdoin, L. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. *Journal of Biological Chemistry*, v.269, p.8459-8465. 1994a.
- Fontes, E.P.B., Gladfelter, H.J., Schaffer, R.L., Petty, I.T.D. e Hanley-Bowdoin, L. Geminivirus replication origins have a modular organization. *Plant Cell*, v.6, p.405-416. 1994b.
- Fontes, E.P.B., Luckow, V.A. e Hanley-Bowdoin, L. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. *Plant Cell*, v.4, p.597-608. 1992.
- Fontes, E.P.B., Santos, A.A., Luz, D.F., Waclawovsky, A.J. e Chory, J. The geminivirus nuclear shuttle protein is a virulence factor that suppresses transmembrane receptor kinase activity. *Genes & Development*, v.18, p.2545-2556. 2004.
- França, F.H., Villas-Boas, G.L. e Castelo-Branco, M. Ocorrência de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera:Aleyrodidae) no Distrito Federal. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v.25, p.369-372. 1996.
- Frischmuth, T., Engel, M., Lauster, S. e Jeske, H. Nucleotide sequence evidence for the occurrence of three distinct whitefly-transmitted, *Sida*-infecting bipartite geminiviruses in Central America. *Journal of General Virology*, v.78, p.2675-2682. 1997.
- Galvão, R.M., Fernandes, A.V., Almeida, J.D., Alfenas, P.F., Andrade, E.C. e Fontes, E.P.B. Molecular characterization of two new tomato-infecting geminiviruses and

- the *Sida*-infecting geminiviruses complex from Brazil. International Workshop on Bemisia and Geminiviral diseases. San Juan - Puerto Rico, 1998. L-93 p.
- Galvão, R.M., Mariano, A.C., Luz, D.F., Alfenas, P.F., Andrade, E.C., Zerbini, F.M., Almeida, M.R. e 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, p.715-726. 2003.
- Garcia-Andres, S., Accotto, G.P., Navas-Castillo, J. e Moriones, E. Founder effect, plant host, and recombination shape the emergent population of begomoviruses that cause the tomato yellow leaf curl disease in the Mediterranean basin. *Virology*, v.359, p.302-312. 2007.
- Garcia-Arenal, F., Fraile, A. e Malpica, J.M. Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology*, v.39, p.157-186. 2001.
- Garcia-Arenal, F., Fraile, A. e Malpica, J.M. Variation and evolution of plant virus populations. *International Microbiology*, v.6, p.225-232. 2003.
- Garrido-Ramirez, E.R., Sudarshana, M. e Gilbertson, R.L. *Bean golden yellow mosaic virus* from Chiapas, Mexico: Characterization, pseudorecombination with other bean-infecting geminiviruses and germ plasm screening. *Phytopathology*, v.90, p.1224-1232. 2000.
- Ge, L., Zhang, J., Zhou, X. e Li, H. Genetic structure and population variability of tomato yellow leaf curl China virus. *Journal of Virology*, v.81, p.5902-5907. 2007.
- Gilbertson, R.L., Faria, J.C., Ahlquist, P. e Maxwell, D.P. Genetic diversity in geminiviruses causing bean golden mosaic disease: the nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of a Brazilian isolate of bean golden mosaic geminivirus. *Phytopathology*, v.83, p.709-715. 1993a.
- Gilbertson, R.L., Hidayat, S.H., Paplomatas, E.J., Rojas, M.R., Hou, Y.-H. e Maxwell, D.P. Pseudorecombination between infectious cloned DNA components of tomato mottle and bean dwarf mosaic geminiviruses. *Journal of General Virology*, v.74, p.23-31. 1993b.
- Gilbertson, R.L., Sudarshana, M., Jiang, H., Rojas, M.R. e Lucas, W.J. Limitations on geminivirus genome size imposed by plasmodesmata and virus-encoded movement protein: Insights into DNA trafficking. *Plant Cell*, v.15, p.2578-2591. 2003.
- Gladfelter, H.J., Eagle, P.A., Fontes, E.P.B., Batts, L. e Hanley-Bowdoin, L. Two domains of the AL 1 protein mediate geminivirus origin recognition. *Virology*, v.239, p.186-197. 1997.
- Grogan, R.G. Control of lettuce mosaic with virus-free seed. *Plant Disease*, v.64, p.446-449. 1980.
- Gutierrez, C. DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminiviruses. *EMBO Journal*, v.19, p.792-799. 2000.
- Haible, D., Kober, S. e Jeske, H. Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. *Journal of Virological Methods*, v.135, p.9-16. 2006.
- Haji, F.N.P., Lima, M.F., Mattos, M.A., Nunes, A.M., Alencar, J.A. e Barbosa, F.R. Levantamento de plantas hospedeiras de mosca-branca (*Bemisia* spp.) no Submédio do Vale São Francisco nos anos de 1996 a 1998. VIII Simpósio Latino-Americano e

- do Caribe sobre Moscas Brancas e Geminivírus. Recife, Brazil. 17-20 Oct., 1999, 1999. R21 p.
- Hanley-Bowdoin, L., Settlege, S.B., Orozco, B.M., Nagar, S. e Robertson, D. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.18, p.71-106. 1999.
- Hao, L., Wang, H., Sunter, G. e Bisaro, D.M. Geminivirus AL2 and L2 proteins interact with and inactivate SNF1 kinase. *Plant Cell*, v.15, p.1034-1048. 2003.
- Harrison, B.D., Liu, Y.L., Khalid, S., Hameed, S., Otim Nape, G.W. e Robinson, D.J. Detection and relationships of cotton leaf curl virus and allied whitefly-transmitted geminiviruses occurring in Pakistan. *Annals of Applied Biology*, v.130, p.61-75. 1997.
- Harrison, B.D. e Robinson, D.J. Natural genomic and antigenic variation in white-fly transmitted geminiviruses (begomoviruses). *Annual Review of Phytopathology*, v.39, p.369-398. 1999.
- Hartl, D.L. e Clark, A.G. *Principles of population genetics*. Sunderland: Sinauer Associates. 2007
- Heyraud-Nitschke, F., Schumacher, S., Laufs, J., Schaefer, S., Schell, J. e Gronenborn, B. Determination of the origin cleavage and joining domain of geminivirus Rep proteins. *Nucleic Acids Research*, v.23, p.910-916. 1995.
- Hill, J.E., Strandberg, J.O., Hiebert, E. e Lazarowitz, S.G. Asymmetric infectivity of pseudorecombinants of cabbage leaf curl virus and squash leaf curl virus: Implications for bipartite geminivirus evolution and movement. *Virology*, v.250, p.283-292. 1998.
- Hofer, P., Bedford, I.D., Markham, P.G., Jeske, H. e Frischmuth, T. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. *Virology*, v.236, p.288-295. 1997a.
- Hofer, P., Engel, M., Jeske, H. e Frischmuth, T. Nucleotide sequence of a new bipartite geminivirus isolated from the common weed *Sida rhombifolia* in *Costa Rica*. *Virology*, v.78, p.1785-1790. 1997b.
- Hou, Y.M. e Gilbertson, R.L. Increased pathogenicity in a pseudorecombinant bipartite geminivirus correlates with intermolecular recombination. *Journal of Virology*, v.70, p.5430-5436. 1996.
- Hudson, R.R. Gene genealogies and the coalescent process. In: Futuyma, D.J. e Antonovics, J. (Ed.). *Oxford surveys in evolutionary biology*. New York: Oxford University Press, v.7, 1991. p.1-44.
- Ilyina, T.V. e Koonin, E.V. Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes and archaeobacteria. *Nucleic Acids Research*, v.20, p.3279-3285. 1992.
- Inoue-Nagata, A.K., Martin, D.P., Boiteux, L.S., Giordano, L.D., Bezerra, I.C. e De Avila, A.C. New species emergence via recombination among isolates of the Brazilian tomato infecting Begomovirus complex. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.41, p.1329-1332. 2006.
- Isnard, M., Granier, M., Frutos, R., Reynaud, B. e Peterschmitt, M. Quasispecies nature of three maize streak virus isolates obtained through different modes of selection

- from a population used to assess response to infection of maize cultivars. *Journal of General Virology*, v.79, p.3091-3099. 1998.
- Jenkins, G.M., Rambaut, A., Pybus, O.G. e Holmes, E.C. Rates of molecular evolution in RNA viruses: A quantitative phylogenetic analysis. *Journal of Molecular Evolution*, v. 54, p. 156-65. 2002.
- Jones, R.A.C. Using epidemiological information to develop effective integrated virus disease management strategies. *Virus Research*, v.100, p.5-30. 2004.
- Jovel, J., Reski, G., Rothenstein, D., Ringel, M., Frischmuth, T. e Jeske, H. *Sida micrantha* mosaic is associated with a complex infection of begomoviruses different from *Abutilon mosaic virus*. *Archives of Virology*, v.149, p.829-841. 2004.
- Jupin, I., Herocourt, F., Benz, B. e Gronenborn, B. DNA replication specificity of TYLCV geminivirus is mediated by the amino-terminal 116 amino acids of the Rep protein. *FEBS Letters*, v.262, p.116-120. 1995.
- Kong, L.J. e Hanley-Bowdoin, L. A geminivirus replication protein interacts with a protein kinase and a motor protein that display different expression patterns during plant development and infection. *Plant Cell*, v.14, p.1817-1832. 2002.
- Kong, L.J., Orozco, B.M., Roe, J.L., Nagar, S., Ou, S., Feiler, H.S., Durfee, T., Miller, A.B., Gruissem, W., Robertson, D. e Hanley-Bowdoin, L. A geminivirus replication protein interacts with the retinoblastoma protein through a novel domain to determine symptoms and tissue specificity of infection in plants. *EMBO Journal*, v.19, p.3485-3495. 2000.
- Latham, J.R., Saunders, K., Pinner, M.S. e Stanley, J. Induction of plant cell division by beet curly top virus gene C4. *Plant Journal*, v.11, p.1273-1283. 1997.
- Laufs, J., Schumacher, S., Geisler, N., Jupin, I. e Gronenborn, B. Identification of the nicking tyrosine of geminivirus Rep protein. *FEBS Letters*, v.377, p.258-262. 1995a.
- Laufs, J., Traut, W., Heyraud, F., Matzeit, G., Rogers, S.G., Schell, J. e Gronenborn, B. *In vitro* cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v.92, p.3879-3883. 1995b.
- Lazarowitz, S.G. Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.11, p.327-349. 1992.
- Lazarowitz, S.G. Probing plant cell structure and function with viral movement proteins. *Current Opinion in Plant Biology*, v.2, p.332-338. 1999.
- Le Gall, O. *Lettuce mosaic virus*. In: Jones, A.T., Robinson, D.J., Boonham, N. e Mumford, R. (Ed.). *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*. Wellesbourne, UK: Association of Applied Biologists, v.339, 2003.
- Lefevre, P., Lett, J.M., Reynaud, B. e Martin, D.P. Avoidance of protein fold disruption in natural virus recombinants. *PLoS Pathog*, v.3, p.e181. 2007.
- Legg, J.P. e Raya, M.D. Survey of cassava virus diseases in Tanzania. *International Journal of Pest Management*, p.17-23. 1993.
- Legg, J.P. e Thresh, J.M. Cassava mosaic virus disease in East Africa: A dynamic disease in a changing environment. *Virus Research*, v.71, p.135-149. 2000.

- Lima, A.T.M., Pereira, C.O., Alfenas, P.F., Paula, M.B., Mello, R.N. e Zerbini, F.M. Primeiro relato de infecção pelo geminivírus *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) em tomateiro no estado de Santa Catarina. *Fitopatologia Brasileira*, v.31(Suplemento), p.S224. 2006.
- Lin, B., Akbar Behjatnia, S.A., Dry, I.B., Randles, J.W. e Rezaian, M.A. High-affinity Rep-binding is not required for the replication of a geminivirus DNA and its satellite. *Virology*, v.305, p.353-363. 2003.
- Lin, H.X., Rubio, L., Smythe, A.B. e Falk, B.W. Molecular population genetics of Cucumber mosaic virus in California: Evidence for founder effects and reassortment. *Journal of Virology*, v.78, p.6666-6675. 2004.
- Lourenção, A.L. e Nagai, H. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. *Bragantia*, v.53, p.53-59. 1994.
- Luque, A., Sanz-Burgos, A.P., Ramirez-Parra, E., Castellano, M.M. e Gutierrez, C. Interaction of geminivirus Rep protein with replication factor C and its potential role during geminivirus DNA replication. *Virology*, v.302, p.83-94. 2002.
- Mallowa, S.O., Isutsa, D.K., Kamau, A.W., Obonyo, R. e Legg, J.P. Current characteristics of cassava mosaic disease in postepidemic areas increase the range of possible management options. *Annals of Applied Biology*, v.149, p.137-144. 2006.
- Mansoor, S., Briddon, R.W., Zafar, Y. e Stanley, J. Geminivirus disease complexes: An emerging threat. *Trends in Plant Science*, v.8, p.128-134. 2003.
- Mansoor, S., Khan, S.H., Bashir, A., Saeed, M., Zafar, Y., Malik, K.A., Briddon, R., Stanley, J. e Markham, P.G. Identification of a novel circular single-stranded DNA associated with cotton leaf curl disease in Pakistan. *Virology*, v.259, p.190-199. 1999.
- Mariano, A.C., Andrade, M.O., Santos, A.A., Carolino, S.M.B., Oliveira, M.L., Baracat-Pereira, M.C., Brommonshenk, S.H. e Fontes, E.P.B. Identification of a novel receptor-like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein. *Virology*, v.318, p.24-31. 2004.
- Matyis, J.C., Silva, D.M., Oliveira, A.R. e Costa, A.S. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. *Summa Phytopathologica*, v.1, p.267-275. 1975.
- McGarry, R.C., Barron, Y.D., Carvalho, M.F., Hill, J.E., Gold, D., Cheung, E., Kraus, W.L. e Lazarowitz, S.G. A novel Arabidopsis acetyltransferase interacts with the geminivirus movement protein NSP. *Plant Cell*, v.15, p.1605-1618. 2003.
- Melo, P.C.T. Mosca branca ameaça produção de hortaliças. Campinas, SP, Brazil: Agrow do Brasil Sementes Ltda., Technical Bulletin 1992.
- Milgroom, M.G. e Peever, T.L. Population biology of plant pathogens - The synthesis of plant disease epidemiology and population genetics. *Plant Disease*, v.87, p.608-617. 2003.
- Monci, F., Sanchez-Campos, S., Navas-Castillo, J. e Moriones, E. A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Virology*, v.303, p.317-326. 2002.

- Morales, F.J. e Anderson, P.K. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology*, v.146, p.415-441. 2001.
- Morales, F.J. e Jones, P.G. The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. *Virus Research*, v.100, p.57-65. 2004.
- Moreno, A., Hebrard, E., Uzest, M., Blanc, S. e Fereres, A. A single amino acid position in the helper component of cauliflower mosaic virus can change the spectrum of transmitting vector species. *Journal of Virology*, v.79, p.13587-13593. 2005.
- Moreno, I.M., Malpica, J.M., Diaz-Pendon, J.A., Moriones, E., Fraile, A. e Garcia-Arenal, F. Variability and genetic structure of the population of watermelon mosaic virus infecting melon in Spain. *Virology*, v.318, p.451-460. 2004.
- Morilla, G., Krenz, B., Jeske, H., Bejarano, E.R. e Wege, C. Tête à tête of tomato yellow leaf curl virus and tomato yellow leaf curl sardinia virus in single nuclei. *Journal of Virology*, v.78, p.10715-10723. 2004.
- Moriones, E. e Navas-Castillo, J. *Tomato yellow leaf curl virus*, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Research*, v.71, p.123-134. 2000.
- Morra, M.R. e Petty, I.T.D. Tissue specificity of geminivirus infection is genetically determined. *Plant Cell*, v.12, p.2259-2270. 2000.
- Nagar, S., Pedersen, T.J., Carrick, K.M., Hanley-Bowdoin, L. e Robertson, D. A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. *Plant Cell*, v.7, p.705-719. 1995.
- Nakhla, M.K., Maxwell, D.P., Martinez, R.T., Carvalho, M.G. e Gilbertson, R.L. Widespread occurrence of eastern Mediterranean "strain" of tomato yellow leaf curl geminivirus in tomatoes in the Dominican Republic. *Plant Disease*, v.78, p.926. 1994.
- Ndunguru, J., Legg, J., Aveling, T., Thompson, G. e Fauquet, C. Molecular biodiversity of cassava begomoviruses in Tanzania: evolution of cassava geminiviruses in Africa and evidence for East Africa being a center of diversity of cassava geminiviruses. *Virology Journal*, v.2, p.21. 2005.
- Nicaise, V., German-Retana, S., Sanjuan, R., Dubrana, M.P., Mazier, M., Maisonneuve, B., Candresse, T., Caranta, C. e Legall, O. The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus Lettuce mosaic virus. *Plant Physiology*, v.132, p.1272-1282. 2003.
- Noeiry, A.O., Lucas, W.J. e Gilbertson, R.L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell*, v.76, p.925-932. 1994.
- Nutter, F.W. Quantifying the temporal dynamics of plants virus epidemics: a review. *Crop Protection*, v.16, p.603-618. 1997.
- Ooi, K., Ohshita, S., Ishii, I. e Yahara, T. Molecular phylogeny of geminivirus infecting wild plants in Japan. *Journal of Plant Research*, p.247-257. 1993.
- Ooi, K. e Yahara, T. Genetic variation of geminiviruses: Comparison between sexual and asexual host plant populations. *Molecular Ecology*, v.8, p.89-97. 1999.
- Orozco, B.M., Gladfelter, H.J., Settlege, S.B., Eagle, P.A., Gentry, R.N. e Hanley-Bowdoin, L. Multiple cis elements contribute to geminivirus origin function. *Virology*, v.242, p.346-356. 1998.

- Orozco, B.M. e Hanley-Bowdoin, L. Conserved sequence and structural motifs contribute to the DNA binding and cleavage activities of a geminivirus replication protein. *Journal of Biological Chemistry*, v.273, p.24448-24456. 1998.
- Orozco, B.M., Miller, A.B., Settlage, S.B. e Hanley-Bowdoin, L. Functional domains of a geminivirus replication protein. *Journal of Biological Chemistry*, v.272, p.9840-9846. 1997.
- Owor, B.E., Martin, D.P., Shepherd, D.N., Edema, R., Monjane, A.L., Rybicki, E.P., Thomson, J.A. e Varsani, A. Genetic analysis of *Maize streak virus* isolates from Uganda reveals widespread distribution of a recombinant variant. *Journal of General Virology*, v.88, p.3154-3165. 2007.
- Padidam, M., Beachy, R.N. e Fauquet, C.M. Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. *Journal of General Virology*, v.76, p.249-263. 1995.
- Padidam, M., Beachy, R.N. e Fauquet, C.M. The role of AV2 ("precoat") and coat protein in viral replication and movement in tomato leaf curl geminivirus. *Virology*, v.224, p.390-404. 1996.
- Padidam, M., Sawyer, S. e Fauquet, C.M. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology*, v.265, p.218-224. 1999.
- Palmer, K.E. e Rybicki, E.P. The molecular biology of mastreviruses. *Advances in Virus Research*, v.50, p.183-234. 1998.
- Palmer, K.E., Schnippenkoetter, W.H. e Rybicki, E.P. Geminivirus isolation and DNA extraction. *Methods in Molecular Biology*, v.81, p.41-52. 1998.
- Paplomatas, E.J., Patel, V.P., Hou, Y.M., Noueiry, A.O. e Gilbertson, R.L. Molecular characterization of a new sap-transmissible bipartite genome geminivirus infecting tomatoes in Mexico. *Phytopathology*, v.84, p.1215-1224. 1994.
- Pedersen, T.J. e Hanley-Bowdoin. Molecular characterization of the AL3 protein encoded by a bipartite geminivirus. *Virology*, v.202, p.1070-1075. 1994.
- Peele, C., Jordan, C.V., Muangsan, N., Turnage, M., Egelkrout, E., Eagle, P., Hanley-Bowdoin, L. e Robertson, D. Silencing of a meristematic gene using geminivirus-derived vectors. *Plant Journal*, v.27, p.357-366. 2001.
- Petty, I.T., Carter, S.C., Morra, M.R., Jeffrey, J.L. e Olivey, H.E. Bipartite geminivirus host adaptation determined cooperatively by coding and noncoding sequences of the genome. *Virology*, v.277, p.429-438. 2000.
- Pinel, A., Abubakar, Z., Traore, O., Konate, G. e Fargette, D. Molecular epidemiology of the RNA satellite of Rice yellow mottle virus in Africa. *Archives of Virology*, v.148, p.1721-1733. 2003.
- Pink, D.A.C., Kostova, D. e Walkey, D.G.A. Differentiation of pathotypes of lettuce mosaic virus. *Plant Pathology*, v.41, p.5-12. 1992.
- Pita, J.S., Fondong, V.N., Sangare, A., Otim-Nape, G.W., Ogwal, S. e Fauquet, C.M. Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. *Journal of General Virology*, v.82, p.655-665. 2001.
- Polston, J.E. e Anderson, P.K. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Disease*, v.81, p.1358-1369. 1997.

- Preiss, W. e Jeske, H. Multitasking in replication is common among geminiviruses. *Journal of Virology*, v.77, p.2972-2980. 2003.
- Ramos, P.L., Guevara-Gonzalez, R.G., Peral, R., Ascencio-Ibanez, J.T., Polston, J.E., Arguello-Astorga, G.R., Vega-Arreguin, J.C. e Rivera-Bustamante, R.F. Tomato mottle Taino virus pseudorecombines with PYMV but not with ToMoV: Implications for the delimitation of cis- and trans-acting replication specificity determinants. *Archives of Virology*, v.148, p.1697-1712. 2003.
- Resende, R.O. e Cupertino, F.P. Doenças causadas por vírus em tomateiro. *Informe Agropecuário*, v.18, p.19-27. 1996.
- Rezende, E.A., Filgueira, F.A.R., Zerbini, F.M., Maciel-Zambolim, E., Fernandes, J.J. e Gilbertson, R.L. Tomato infected with geminivirus in greenhouse conditions at Uberlândia-MG, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v.21, p.424. 1996.
- Rezende, W.L., Militão Neto, V., Goulart, L.R., Giovanini, M.P., Juliatti, F.C. e Fernandes, J.J. Infecção mista em plantas de tomate infectadas por geminivírus, detectada por meio de LIS-SSCP-PCR. *Fitopatologia Brasileira*, v.22, p.338. 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. e Zerbini, F.M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology*, v.148, p.281-295. 2003.
- Ribeiro, S.G., Bezerra, I.C., Lima, M.F., Ávila, A.C. e Giordano, L.B. Occurrence of geminivirus in tomato plants in Bahia. VIII Encontro Nacional de Virologia (Resumos). São Lourenço, MG: SBV, 1996. 290 p.
- Ribeiro, S.G., Martin, D.P., Lacorte, C., Simões, I.C., Orlandini, D.R.S. e Inoue-Nagata, A.K. Molecular and biological characterization of Tomato chlorotic mottle virus suggests that recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses. *Phytopathology*, v.97, p.702-711. 2007.
- Ribeiro, S.G., Mello, L.V., Boiteux, L.S., Kitajima, E.W. e Faria, J.C. Tomato infection by a geminivirus in the Federal District, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v.19, p.330. 1994.
- Ridgen, J.E., Dry, I.B., Krake, L.R. e Rezaian, M.A. Plant virus DNA replication processes in *Agrobacterium*: insight into the origins of the geminiviruses? *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v.93, p.10280-10284. 1996.
- Rojas, M.R., Hagen, C., Lucas, W.J. e 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.
- Rosenberg, N.D. e Nordborg, M. Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms. *Nature Reviews Genetics*, v.3, p.380-390. 2002.
- Roye, M.E., Mclaughlin, W.A., Nakhla, M.K. e Maxwell, D.P. Genetic diversity among geminiviruses associated with the weed species *Sida* spp., *Macroptilium lathyroides*, and *Wissadula amplissima* from Jamaica. *Plant Disease*, v.81, p.1251-1258. 1997.
- Rybicki, E.P. A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of Geminiviridae. *Archives of Virology*, v.139, p.49-77. 1994.

- Sacristan, S., Fraile, A. e Garcia-Arenal, F. Population dynamics of Cucumber mosaic virus in melon crops and in weeds in Central Spain. *Phytopathology*, v.94, p.992-998. 2004.
- Salati, R., Nahkla, M.K., Rojas, M.R., Guzman, P., Jaquez, J., Maxwell, D.P. e Gilbertson, R.L. *Tomato yellow leaf curl virus* in the Dominican Republic: Characterization of an infectious clone, virus monitoring in whiteflies, and identification of reservoir hosts. *Phytopathology*, v.92, p.487-496. 2002.
- Sanchez, F., Wang, X., Jenner, C.E., Walsh, J.A. e Ponz, F. Strains of Turnip mosaic potyvirus as defined by the molecular analysis of the coat protein gene of the virus. *Virus Research*, v.94, p.33-43. 2003.
- Sánchez-Campos, S., Navas-Castillo, J., Camero, R., Soria, C., Díaz, J.A. e Moriones, E. Displacement of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)-Sr by TYLCV-Is in tomato epidemics in Spain. *Phytopathology*, v.89, p.1038-1043. 1999.
- Sanderfoot, A.A., Ingham, D.J. e Lazarowitz, S.G. A viral movement protein as a nuclear shuttle. The geminivirus BR1 movement protein contains domains essential for interaction with BL1 and nuclear localization. *Plant Physiology*, v.110, p.23-33. 1996.
- Sanderfoot, A.A. e Lazarowitz, S.G. Cooperation in viral movement: The geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery. *Plant Cell*, v.7, p.1185-1194. 1995.
- Sanderfoot, A.A. e Lazarowitz, S.G. Getting it together in plant virus movement: Cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. *Trends in Cell Biology*, v.6, p.353-358. 1996.
- Santos, C.D.G., Ávila, A.C., Inoue-Nagata, A.K. e Resende, R.O. Espécies vegetais hospedeiras de begomovírus isolados de tomateiro em Goiás e no Distrito Federal. *Fitopatologia Brasileira*, v.29, p.450-455. 2004.
- Santos, C.D.G., Gonçalves, M.F.B. e Oliveira, O.R. Detecção por ELISA de begomovírus em plantas daninhas presentes em áreas produtoras de tomateiro no estado do Ceará. *Fitopatologia Brasileira*, v.28(Supl.), p.252. 2003.
- Sanz, A.I., Fraile, A., Gallego, J.M., Malpica, J.M. e García-Arenal, F. Genetic variability of natural populations of cotton leaf curl geminivirus, a single-stranded DNA virus. *Journal of Molecular Evolution*, v.49, p.672-681. 1999.
- Sanz, A.I., Fraile, A., García-Arenal, F., Zhou, X., Robinson, D.J., Khalid, S., Butt, T. e Harrison, B.D. Multiple infection, recombination and genome relationships among begomovirus isolates found in cotton and other plants in Pakistan. *Journal of General Virology*, v.81, p.1839-1849. 2000.
- Saunders, K. e Stanley, J. A nanovirus-like DNA component associated with yellow vein disease of *Ageratum conyzoides*: Evidence for interfamilial recombination between plant DNA viruses. *Virology*, v.264, p.142-152. 1999.
- Seal, S.E., Jeger, M.J. e Van Den Bosch, F. Begomovirus evolution and disease management. *Advances in Virus Research*, v.67, p.297-316. 2006a.
- Seal, S.E., Van Den Bosch, F. e Jeger, M.J. Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: Implications for sustainable control. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.25, p.23-46. 2006b.

- Selth, L.A., Dogra, S.C., Rasheed, M.S., Healy, H., Randles, J.W. e Rezaian, M.A. A NAC domain protein interacts with *Tomato leaf curl virus* replication accessory protein and enhances viral replication. *Plant Cell*, v.17, p.311-325. 2005.
- Selth, L.A., Randles, J.W. e Rezaian, M.A. *Agrobacterium tumefaciens* supports DNA replication of diverse geminivirus types. *FEBS Letters*, v.516, p.179-182. 2002.
- Settlage, S.B., Miller, A.B., Gruissem, W. e Hanley-Bowdoin, L. Dual interaction of a geminivirus replication accessory factor with a viral replication protein and a plant cell cycle regulator. *Virology*, v.279, p.570-576. 2001.
- Stanley, J. Analysis of African cassava mosaic virus recombinants suggest strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. *Virology*, v.206, p.707-712. 1995.
- Stanley, J. Subviral DNAs associated with geminivirus disease complexes. *Veterinary Microbiology*, v.98, p.121-129. 2004.
- Stanley, J., Bisaro, D.M., Briddon, R.W., Brown, J.K., Fauquet, C.M., Harrison, B.D., Rybicki, E.P. e Stenger, D.C. Family *Geminiviridae*. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. e Ball, L.A. (Ed.). *Virus Taxonomy*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p.301-326.
- Stanley, J. e Latham, J.R. A symptom variant of beet curly top geminivirus produced by mutation of open reading frame C4. *Virology*, v.190, p.506-509. 1992.
- Stenger, D.C., Revington, G.N., Stevenson, M.C. e Bisaro, D.M. Replicational release of geminivirus genomes from tandemly repeated copies: Evidence for rolling-circle replication of a plant viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v.88, p.8029-8033. 1991.
- Sung, Y.K. e Coutts, R.H. Pseudorecombination and complementation between potato yellow mosaic geminivirus and tomato golden mosaic geminivirus. *Journal of General Virology*, v.76, p.2809-2815. 1995.
- Sunter, G. e Bisaro, D.M. Transactivation of geminivirus AR1 and BR2 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. *Plant Cell*, v.4, p.1321-1331. 1992.
- Sunter, G., Hartitz, M.D., Hormuzdi, S.G., Brough, C.L. e Bisaro, D.M. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required for coat protein accumulation while ORF AL3 is necessary for efficient DNA replication. *Virology*, v.179, p.69-77. 1990.
- Tan, P.H., Wong, S.M., Wu, M., Bedford, I.D., Saunders, K. e Stanley, J. Genome organization of *Ageratum yellow vein virus*, a monopartite whitefly-transmitted geminivirus isolated from a common weed. *Journal of General Virology*, v.76, p.2915-2922. 1995.
- Tomimura, K., Spak, J., Katis, N., Jenner, C.E., Walsh, J.A., Gibbs, A.J. e Ohshima, K. Comparisons of the genetic structure of populations of Turnip mosaic virus in West and East Eurasia. *Virology*, v.330, p.408-423. 2004.
- Tomitaka, Y. e Ohshima, K. A phylogeographical study of the Turnip mosaic virus population in East Asia reveals an 'emergent' lineage in Japan. *Molecular Ecology*, v.15, p.4437-4457. 2006.

- Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, J.A., Brown, J.K., Becerra-Flora, A. e Rivera-Bustamante, R. Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the Southern United States. *Phytopathology*, v.86, p.1186-1192. 1996.
- Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, J.A., Herrera-Estrela, L. e Rivera-Bustamante, R.F. Complete nucleotide sequence of pepper huasteco virus: Analysis and comparison with bipartite geminiviruses. *Journal of General Virology*, v.74, p.2225-2231. 1993.
- Tyler, K.L. e Fields, B.N. Pathogenesis of viral infections. In: Fields, B.N., Knipe, D.M. e Howley, P.M. (Ed.). *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. p.173-218.
- Umaharan, P., Padidam, M., Phelps, R.H., Beachy, R.N. e Fauquet, C.M. Distribution and diversity of geminiviruses in Trinidad and Tobago. *Virology*, v.88, p.1262-1268. 1998.
- Unsel, S., Ringel, M., Konrad, A., Lauster, S. e Frischmuth, T. Virus-specific adaptations for the production of a pseudorecombinant virus formed by two distinct bipartite geminiviruses from Central America. *Virology*, v.274, p.179-188. 2000.
- Van Den Bosch, F., Akudibilah, G., Seal, S. e Jeger, M. Host resistance and the evolutionary response of plant viruses. *Journal of Applied Ecology*, v.43, p.506-516. 2006.
- Van Wezel, R., Liu, H., Wu, Z., Stanley, J. e Hong, Y. Contribution of the zinc finger to zinc and DNA binding by a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology*, v.77, p.696-700. 2003.
- Vanitharani, R., Chellappan, P. e Fauquet, C. Geminiviruses and RNA silencing. *Trends in Plant Science*, v.10, p.144-151. 2005.
- Vanitharani, R., Chellappan, P., Pita, J.S. e 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, p.9487-9498. 2004.
- Varma, A. e Malathi, V.G. Emerging geminivirus problems: A serious threat to crop production. *Annals of Applied Biology*, v.142, p.145-164. 2003.
- Voinnet, O., Pinto, Y.M. e Baulcombe, D.C. Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v.96, p.14147-14152. 1999.
- Von Arnim, A. e Stanley, J. Inhibition of *African cassava mosaic virus* systemic infection by a movement protein from the related geminivirus *Tomato golden mosaic virus*. *Virology*, v.187, p.555-564. 1992.
- Walkey, D.G.A., Ward, C.M. e Phelps, K. Studies on lettuce mosaic virus resistance in commercial lettuce cultivars. *Plant Pathology*, v.34, p.545-551. 1985.
- Wang, H., Buckley, K.J., Yang, X., Buchmann, R.C. e Bisaro, D.M. Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. *J. Virol.*, v.79, p.7410-7418. 2005.
- Wang, H., Hao, L.H., Shung, C.Y., Sunter, G. e Bisaro, D.M. Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Plant Cell*, v.15, p.3020-3032. 2003.

- Wang, H., Huang, L.F. e Cooper, J.I. Analyses on mutation patterns, detection of population bottlenecks, and suggestion of deleterious-compensatory evolution among members of the genus Potyvirus. *Archives of Virology*, v.151, p.1625-1633. 2006.
- Were, H.K., Winter, S. e Maiss, E. Viruses infecting cassava in Kenya. *Plant Disease*, v.88, p.17-22. 2004.
- Xie, Q., Sanz-Burgos, A.P., Guo, H., Garcia, J.A. e Gutierrez, C. GRAB proteins, novel members of the NAC domain family, isolated by their interaction with a geminivirus protein. *Plant Molecular Biology*, v.39, p.647-656. 1999.
- Zadoks, J.C. e Schein, R.D. *Epidemiology and plant disease management*. New York: Oxford University. 1979
- Zerbini, F.M., Zambolim, E.M., Carrijo, I.V. e Gilbertson, R.L. A new bipartite geminivirus infecting tomatoes in Minas Gerais, Brazil. *Phytopathology*, v.86, p.S1. 1996a.
- Zerbini, F.M., Zambolim, E.M., Fernandes, J.J., Gilbertson, R.L. e Carrijo, I.V. Um novo geminivírus isolado de tomateiro (*L. esculentum*) em Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira*, v.21, p.430. 1996b.
- Zhong, Y.W., Guo, A.Y., Li, C.B., Zhuang, B.Q., Lai, M., Wei, C.H., Luo, J.C. e Li, Y. Identification of a naturally occurring recombinant isolate of Sugarcane mosaic virus causing maize dwarf mosaic disease. *Virus Genes*, v.30, p.75-83. 2005.
- Zhou, X., Liu, Y., Calvert, L., Munoz, C., Otim-Nape, G.W., Robinson, D.J. e Harrison, B.D. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *Journal of General Virology*, v.78, p.2101-2111. 1997.
- Zhou, X., Xie, Y., Tao, X., Zhang, Z., Li, Z. e Fauquet, C.M. Characterization of DNABeta associated with begomoviruses in China and evidence for co-evolution with their cognate viral DNA-A. *Journal of General Virology*, v.84, p.237-247. 2003.

CAPÍTULO 1

SIX NOVEL BEGOMOVIRUSES INFECTING TOMATO AND ASSOCIATED WEEDS IN SOUTHEASTERN BRAZIL

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*, *submetido*.

Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil

Gloria P. Castillo-Urquiza¹, José Evando A. Beserra Jr.¹, Fernanda P. Bruckner¹, Alison T.M. Lima¹, Arvind Varsani^{2,3}, Poliane Alfenas-Zerbini¹ & F. Murilo Zerbini^{1*}

¹Dep. de Fitopatologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 36570-000, Brazil

²Electron Microscope Unit, University of Cape Town, Private Bag, Rondebosch, Cape Town 7701, South Africa

³Department of Molecular and Cell Biology, University of Cape Town, Private Bag, Rondebosch, Cape Town 7701, South Africa

*To whom correspondence should be addressed. Email: zerbini@ufv.br

The sequences reported in this paper have been deposited in the GenBank under the accession numbers _____

Abstract

The incidence of tomato-infecting begomoviruses has sharply increased in Brazil following the introduction of the B biotype of the whitefly vector in the early 1990's. Five definitive species and six tentative species have been described since then. Here, we report the detection of an additional six novel species, three in tomato and three infecting weeds which are commonly associated with tomato fields: *Blainvillea rhomboidea*, *Sida rhombifolia* and *Sida micrantha*. Tomato and weed samples were collected in two major tomato-growing regions of Southeastern Brazil in 2005 and 2007. Two of the novel viruses were present in tomato plants collected in Paty do Alferes, Rio de Janeiro state. Three novel viruses were present in weed samples collected in Coimbra, Minas Gerais state. One virus was present in tomato samples collected at both locations. Genome features indicate that all six species are typical New World, bipartite begomoviruses. However, two of the novel species did not cluster with the Brazilian viruses in a phylogenetic tree. These species could represent a distinct lineage of New World begomoviruses, found in Brazil for the first time.

Begomoviruses (whitefly-transmitted geminiviruses) cause serious diseases in a number of economically important crops, mostly in tropical and subtropical regions [17]. The most affected crops in Brazil are beans and tomatoes [5, 19]. The incidence of begomovirus infections in tomatoes has sharply increased following the introduction of the B biotype of *Bemisia tabaci* in the early 1990's [13]. Since then, five definitive begomovirus species have been described: *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) and *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) [2, 4, 9, 15]. Six tentative species have also been described based on partial genome sequences [8, 14]. In addition, three species have been detected in weeds which are closely associated with tomato fields: *Sida mottle virus* (SiMoV), *Sida yellow mosaic virus* (SiYMV) and *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV) [7, 12].

Brazilian begomoviruses are typical New World, bipartite begomoviruses which form two monophyletic clusters, one containing the viruses found in weeds but including ToYSV, and the other containing the viruses infecting crop plants [1]. ToYVSV and ToSRV types have become predominant in tomato fields over the years, being detected in the majority of samples collected in a number of surveys [8, 10]. However, the other viruses are always detected, albeit in a smaller number of samples. It is believed that the emergence of tomato-infecting begomoviruses was the result of horizontal transfer of indigenous viruses that infect wild or weed hosts by the new biotype of the whitefly vector. Once present in the new host, these indigenous viruses would have rapidly evolved via recombination and pseudorecombination, giving rise to the species currently detected in the field. The predominance of a couple of species could be due to differential adaptation of the emerging viral species to tomato or differential efficiency of vector transmission.

As part of an ongoing effort to assess begomovirus diversity and the emergence of novel species, we carried out surveys of two major tomato-growing regions of Brazil, the cities of Paty do Alferes, in Rio de Janeiro state (coordinates 22°25'44" S; 43°25'08" W) and Coimbra, in Minas Gerais state (20°51'55" S; 42°49'01" W). In Paty do Alferes, 119 tomato samples were collected in May 2005. In Coimbra, 17 tomato and 43 weed samples were collected in July 2007. Total DNA was extracted [3] and the presence of a begomovirus was confirmed by PCR using universal primers for the genus [16]. Full-length viral genomes were amplified from the PCR-positive samples by rolling-circle amplification [11], cloned in pBLUESCRIPT KS+ (Stratagene) after monomerization

with the restriction enzymes *Apa* I, *Bam*H I, *Cla* I, *Eco*R I, *Hin*D III, *Kpn* I or *Pst* I, and sequenced at Macrogen, Inc. (Seoul, South Korea) by primer walking. DNA-A nucleotide sequences were initially submitted to a BLAST search for preliminary species assignment based on the 89% threshold level established by the *Geminiviridae* Study Group of the ICTV [6]. Additional pairwise comparisons were made with DNAMAN version 4.0, using the Optimal Alignment option with the following parameters: K-tuple=2, Gap penalty=7, Gap open=10, Gap extension=5. The deduced amino acid sequences for the seven viral ORFs (Rep, Trap, Ren, AC4 and CP in DNA-A; MP and NSP in DNA-B) were also compared using the following parameters: BLOSUM matrix, K-tuple=1, Gap penalty=4, Gap open=10, Gap extension=0.1. Multiple sequence alignments were prepared with the Clustal W module in Mega 4.0 [18]. Maximum parsimony trees were generated using MEGA 4.0 with 1000 bootstrap replications.

Using rolling circle amplification, more than 900 clones were obtained from the 179 samples collected, and 106 were selected for sequencing. Pairwise sequence analysis indicated that isolates BR:Pda4:05, BR:Pda58:05 and BR:Coi22:07 (from tomato), BR:Coi3:07 (from *S. rhombifolia*), BR:Coi4:07 (from *Sida micrantha*) and BR:Coi25:07 (from *Blainvillea rhomboidea*), had <84% DNA-A identity with all previously described begomoviruses, and <85% identity amongst themselves (Table 1). Thus, each one comprises a new begomovirus species. Cognate DNA-Bs (cloned from the same samples from which the correspondent DNA-A was cloned, and displaying >94% identity for the common region sequence with identical iterons) were identified for BR:Pda58:05, BR:Coi22:07 and BR:Coi25:07.

All six viruses have the typical genome organization of New World, bipartite begomoviruses, with five ORFs in the DNA-A and two ORFs in the DNA-B. Pairwise sequence comparisons for each ORF in the DNA-A (available on line as Supplemental Tables S1-S7) indicate that the coat protein ORF is the most conserved among the six species, with 86-97% identity, and AC4 is the least conserved, with <68% identity. For the DNA-B ORFs, NSP has 66-70% identity and MP has 78-83% identity. All components (DNA-A and DNA-B) have the conserved nonanucleotide (5'TAATATTAC3') as part of a stem-loop structure in the origin of replication. Cognate DNA-A and DNA-B components have identical iterons, but the iterons are different among the six species: GGTG/GGTG for BR:Pda58:05, BR:Coi3:07 and

BR:Coi22:07; GGGG/GGGG for BR:Pda4:05 and BR:Coi4:07; and GGAG/GGGA for BR:Coi25:07 (data not shown).

Phylogenetic analysis indicates that the species represented by isolates BR:Pda4:05, BR:Pda58:05 and BR:Coi4:07 form a monophyletic cluster with 92% confidence including Brazilian begomoviruses from weeds (plus ToYSV, originally isolated from tomato; Figure 1). Both BR:Pda4:05 and BR:Pda58:05 were obtained from tomato plants in Paty do Alferes, while BR:Coi4:07 was obtained from *Sida* in Coimbra. Despite the relatively low sequence identity among the viruses in this monophyletic cluster (<84%), their phylogenetic relationship supports the hypothesis of a common origin for viruses from tomato and *Sida* in Brazil.

The species represented by BR:Coi25:07, obtained from the weed *Blainvillea rhomboidea* in Coimbra, is most related to BGMV, but this is a distant relationship with only 74% identity for the DNA-A (Figure 1; Table 1). In fact, this is the most divergent virus among all six new species, with <75% identity with all other begomoviruses.

The species represented by isolates BR:Coi3:07 and BR:Coi22:07 form a monophyletic cluster with 100% bootstrap confidence including viruses from Mexico and Central America (Figure 1). These are the only Brazilian begomoviruses which cluster with viruses from other countries. More interestingly, BR:Coi3:07 was obtained from *Sida*, while BR:Coi22:07 was obtained from tomato. Moreover, additional DNA-A clones with 97% identity with BR:Coi22:07 were obtained from samples collected in Paty do Alferes (data not shown). Therefore, this is the only species detected in both locations. The viral species represented by isolates BR:Coi3:07 and BR:Coi22:07 could be members of a distinct lineage of New World begomoviruses, detected in Brazil for the first time. Additional analyses, including recombination detection and gene genealogy using the coalescent process, will be carried out in order to determine the genetic structure of these begomovirus populations.

On the basis of their sequence and phylogenetic relationships, and taking into consideration the hosts from which they were isolated and the symptoms induced by each virus (Supplemental Figure S1), we propose the names Tomato mild mosaic virus (ToMIMV) for the species represented by BR:Pda58:05, Tomato common mosaic virus (ToCmMV) for the species represented by BR:Coi22:07, Tomato leaf distortion virus (ToLDV) for the species represented by BR:Pda4:05, *Sida* yellow leaf curl virus (SiYLCV) for the species represented by BR:Coi3:07, *Blainvillea* yellow spot virus

(BIYSV) for the species represented by BR:Coi25:07, and Sida common mosaic virus (SiCmMV) for the species represented by BR:Coi4:07.

Acknowledgements

This work was partially funded by CNPq grant 474140/2004-0 to FMZ. PAZ is a CNPq postdoctoral fellow. GPCU and JEAB were recipients of CNPq and CAPES scholarships. AV is supported by the Carnegie Corporation of New York.

References

1. Andrade EC, Manhani GG, Alfenas PF, Calegario RF, Fontes EPB, Zerbini FM (2006) *Tomato yellow spot virus*, a tomato-infecting begomovirus from Brazil with a closer relationship to viruses from *Sida* sp., forms pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from *Sida*. *J Gen Virol* 87: 3687-3696
2. Calegario RF, Ferreira SS, Andrade EC, Zerbini FM (2007) Characterization of *Tomato yellow spot virus*, (ToYSV), a novel tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Braz J Agric Res* 42: 1335-1343
3. Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19-21
4. Faria JC, Souza-Dias JAC, Slack S, Maxwell DP (1997) A new geminivirus associated with tomato in the State of São Paulo, Brazil. *Plant Dis* 81: 423
5. Faria JC, Maxwell DP (1999) Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. *Phytopathol* 89: 262-268
6. Fauquet CM, Bridson RW, Brown JK, Moriones E, Stanley J, Zerbini FM, Zhou X (2008) Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Arch Virol* 153: 783:821
7. Fernandes AV, Galvão RM, Machado JJ, Zerbini FM, Fontes EPB (1999) Cloning and molecular characterization of A components of two new *Sida rhombifolia*-infecting geminiviruses. *Virus Res* 4: 148
8. Fernandes FR, Albuquerque LC, Giordano LB, Boiteux LS, Ávila AC, Inoue-Nagata AK (2008) Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes* 36: 251-258
9. Fernandes JJ, Carvalho MG, Andrade EC, Brommonschenkel SH, Fontes EPB, Zerbini FM (2006) Biological and molecular properties of Tomato rugose

- mosaic virus (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Plant Path* 55: 513-522
10. Ferreira SS, Fontes EPB, Zerbini FM (2005) Occurrence of begomoviruses and satellite DNAs in weeds and tomato plants in Southeastern Brazil. In: 34th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (Abstracts on CD-Rom), Águas de Lindóia, SP
 11. Inoue-Nagata AK, Albuquerque LC, Rocha WB, Nagata T (2004) A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi 29 DNA polymerase. *J Virol Methods* 116: 209-211
 12. Jovel J, Reski G, Rothenstein D, Ringel M, Frischmuth T, Jeske H (2004) *Sida micrantha* mosaic is associated with a complex infection of begomoviruses different from *Abutilon mosaic virus*. *Arch Virol* 149: 829-841
 13. Ribeiro SG, Ávila AC, Bezerra IC, Fernandes JJ, Faria JC, Lima MF, Gilbertson RL, Zambolim EM, Zerbini FM (1998) Widespread occurrence of tomato geminiviruses in Brazil, associated with the new biotype of the whitefly vector. *Plant Dis* 82: 830
 14. Ribeiro SG, Ambrozevicus LP, Ávila AC, Bezerra IC, Calegario RF, Fernandes JJ, Lima MF, Mello RN, Rocha H, Zerbini FM (2003) Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Arch Virol* 148: 281-295
 15. Ribeiro SG, Martin DP, Lacorte C, Simões IC, Orlandini DRS, Inoue-Nagata AK (2007) Molecular and biological characterization of Tomato chlorotic mottle virus suggests that recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses. *Phytopathol* 97: 702-711
 16. Rojas MR, Gilbertson RL, Russell DR, Maxwell DP (1993) Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Dis* 77: 340-347
 17. Rojas MR, Hagen C, Lucas WJ, Gilbertson RL (2005) Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. *Annu Rev Phytopathol* 43: 361-394
 18. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599
 19. Zerbini FM, Andrade EC, Barros DR, Ferreira SS, Lima ATM, Alfenas PF, Mello RN (2005) Traditional and novel strategies for geminivirus management in Brazil. *Australasian Plant Pathology* 34: 475-480

Table 1. Percent identities between the complete DNA-A (above the diagonal) and DNA-B (below the diagonal) nucleotide sequences of the six new begomovirus species detected in Brazil and the most closely related viruses.

	TSLCV	BGMV	SimMV	ToYSV	ToYVSV	SiMoV	SiYMV	TGMV	ToCMoV	ToRMV	ToSRV	ToCrLYV	BR:Pda4:07	BR:Coi4:07	BR:Coi3:07	BR:Coi22:07	BR:Pda58:07	BR:Coi25:07
TSLCV	--	73	70	72	71	71	71	74	74	71	69	n.d.	72	69	78	80	72	66
BGMV	n.d. ^a	--	75	76	74	74	73	71	77	80	78	n.d.	79	76	72	73	76	74
SimMV	n.d.	57	--	81	74	82	80	76	74	78	78	n.d.	83	78	77	73	81	69
ToYSV	n.d.	69	71	--	74	87	84	76	75	77	78	n.d.	82	80	81	75	79	70
ToYVSV	n.d.	69	57	67	--	73	78	79	77	75	77	n.d.	75	72	73	71	73	73
SiMoV	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	--	87	75	75	76	77	n.d.	82	79	82	75	76	67
SiYMV	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	--	74	77	75	76	n.d.	81	79	83	75	77	68
TGMV	n.d.	64	59	52	57	n.d.	n.d.	--	75	78	79	n.d.	76	74	72	73	74	67
ToCMoV	n.d.	62	56	58	57	n.d.	n.d.	49	--	85	78	n.d.	78	74	72	76	75	75
ToRMV	n.d.	61	71	68	69	n.d.	n.d.	62	58	--	86	n.d.	80	77	73	75	76	74
ToSRV	n.d.	61	71	68	69	n.d.	n.d.	63	60	98	--	n.d.	78	77	73	73	78	74
ToCrLYV	n.d.	68	56	68	66	n.d.	n.d.	55	77	58	58	--	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
BR:Pda4:05 ^b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	--	84	78	75	78	71
BR:Coi4:07 ^c	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	--	76	73	75	70
BR:Coi3:07 ^d	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	--	83	75	66
BR:Coi22:07 ^e	n.d.	53	50	50	60	n.d.	n.d.	54	73	51	51	78	n.d.	n.d.	n.d.	--	73	68
BR:Pda58:07 ^f	n.d.	57	71	69	59	n.d.	n.d.	61	58	62	62	66	n.d.	n.d.	n.d.	57	--	69
BR:Coi25:07 ^g	n.d.	52	48	55	60	n.d.	n.d.	52	55	50	50	56	n.d.	n.d.	n.d.	53	48	--

^aNot done (sequences not available).

^{b-g}Proposed new species: ^bTomato leaf distortion virus (ToLDV); ^cSida common mosaic virus (SiCmMV); ^dSida yellow leaf curl virus (SiYLCV); ^eTomato common mosaic virus (ToCmMV); ^fTomato mild mosaic virus (ToMIMV); ^g*Blainvillea* yellow spot virus (BIYSV).

Supplemental Table S1. Percent sequence identities between the deduced amino acid sequences of the Rep (AC1) ORF encoded by the DNA-A of the six new begomovirus species detected in Brazil and the most closely related viruses.

	BGMV	ToYSV	SimMV	SiMoV	SiYMV	TGMV	ToCMoV	ToRMV	ToSRV	ToYVSV	ToSLCV	BR:Coi25:07	BR:Coi4:07	BR:Pda4:05	BR:Coi3:07	BR:Coi22:07	BR:Pda58:05
BGMV	--	76	78	67	67	76	72	78	79	70	66	73	74	81	65	64	78
ToYSV		--	82	77	74	80	73	80	81	74	62	66	74	83	69	63	80
SimMV			--	72	70	78	72	79	80	72	60	65	74	82	64	61	82
SiMoV				--	67	71	63	69	69	65	59	58	64	70	64	59	70
SiYMV					--	70	76	71	71	81	61	67	68	75	65	60	72
TGMV						--	73	82	82	75	63	67	73	79	63	62	78
ToCMoV							--	79	75	79	64	71	71	76	62	64	74
ToRMV								--	93	73	63	72	75	80	62	63	79
ToSRV									--	73	62	73	75	80	61	63	80
ToYVSV										--	64	68	69	74	65	63	73
ToSLCV											--	62	59	64	87	88	65
BR:Coi25:07 ^a												--	67	69	59	59	68
BR:Coi4:07 ^b													--	78	61	60	76
BR:Pda4:05 ^c														--	67	66	81
BR:Coi3:07 ^d															--	87	65
BR:Coi22:07 ^e																--	65
BR:Pda58:05 ^f																	--

^{a-f}Proposed new species: ^a*Blainvillea* yellow spot virus (BIYSV); ^bSida common mosaic virus (SiCmMV); ^cTomato leaf distortion virus (ToLDV); ^dSida yellow leaf curl virus (SiYLCV); ^eTomato common mosaic virus (ToCmMV); ^fTomato mild mosaic virus (ToMIMV).

Supplemental Table S2. Percent sequence identities between the deduced amino acid sequences of the Trap (AC2) ORF encoded by the DNA-A of the six new begomovirus species detected in Brazil and the most closely related viruses.

	BGMV	ToYSV	SimMV	SiMoV	SiYMV	TGMV	ToCMoV	ToRMV	ToSRV	ToYVSV	ToSLCV	BR:CoI25:07	BR:CoI4:07	BR:Pda4:05	BR:CoI3:07	BR:CoI22:07	BR:Pda58:05
BGMV	--	74	73	72	62	70	76	80	72	70	65	72	70	75	71	68	79
ToYSV		--	76	86	73	69	68	71	71	68	64	71	73	82	85	74	75
SimMV			--	82	71	68	72	72	71	68	64	71	67	80	78	74	79
SiMoV				--	82	74	69	69	69	72	62	68	72	79	88	75	75
SiYMV					--	62	59	61	57	61	54	58	63	67	73	64	66
TGMV						--	70	73	71	76	67	68	63	70	73	74	64
ToCMoV							--	91	74	67	64	77	68	74	72	72	75
ToRMV								--	77	70	67	75	68	75	70	75	76
ToSRV									--	62	64	68	63	73	69	67	70
ToYVSV										--	62	69	63	68	68	71	66
ToSLCV											--	58	57	64	60	64	71
BR:CoI25:07 ^a												--	66	76	70	71	69
BR:CoI4:07 ^b													--	79	70	67	71
BR:Pda4:05 ^c														--	78	77	77
BR:CoI3:07 ^d															--	75	72
BR:CoI22:07 ^e																--	71
BR:Pda58:05 ^f																	--

^{a-f}Proposed new species: ^a*Blainvillea* yellow spot virus (BIYSV); ^bSida common mosaic virus (SiCmMV); ^cTomato leaf distortion virus (ToLDV); ^dSida yellow leaf curl virus (SiYLCV); ^eTomato common mosaic virus (ToCmMV); ^fTomato mild mosaic virus (ToMIMV).

Supplemental Table S3. Percent sequence identities between the deduced amino acid sequences of the Ren (AC3) ORF encoded by the DNA-A of the six new begomovirus species detected in Brazil and the most closely related viruses.

	BGMV	ToYSV	SimMV	SiMoV	SiYMV	TGMV	ToCMoV	ToRMV	ToSRV	ToYVSV	ToSLCV	BR:CoI25:07	BR:CoI4:07	BR:Pda4:05	BR:CoI3:07	BR:CoI22:07	BR:Pda58:05
BGMV	--	78	81	79	66	78	81	80	83	81	75	77	75	78	78	83	84
ToYSV		--	76	84	68	81	78	78	82	78	74	81	83	80	87	82	83
SimMV			--	82	68	74	81	80	77	77	71	78	78	84	81	81	85
SiMoV				--	81	81	78	78	79	79	71	76	82	81	90	84	83
SiYMV					--	65	63	65	65	65	59	61	68	66	75	69	70
TGMV						--	78	77	80	83	78	78	81	79	82	82	79
ToCMoV							--	94	82	80	74	77	81	80	79	87	81
ToRMV								--	81	79	72	76	80	80	81	87	81
ToSRV									--	81	78	78	79	79	80	84	83
ToYVSV										--	78	79	79	81	82	81	81
ToSLCV											--	74	75	74	75	74	76
BR:CoI25:07 ^a												--	77	77	80	80	78
BR:CoI4:07 ^b													--	84	81	81	85
BR:Pda4:05 ^c														--	79	81	84
BR:CoI3:07 ^d															--	84	84
BR:CoI22:07 ^e																--	83
BR:Pda58:05 ^f																	--

^{a-f}Proposed new species: ^a*Blainvillea* yellow spot virus (BIYSV); ^bSida common mosaic virus (SiCmMV); ^cTomato leaf distortion virus (ToLDV); ^dSida yellow leaf curl virus (SiYLCV); ^eTomato common mosaic virus (ToCmMV); ^fTomato mild mosaic virus (ToMIMV).

Supplemental Table S4. Percent sequence identities between the deduced amino acid sequences of the AC4 ORF encoded by the DNA-A of the six new begomovirus species detected in Brazil and the most closely related viruses.

	BGMV	ToYSV	SimMV	SiMoV	SiYMV	TGMV	ToCMoV	ToRMV	ToSRV	ToYVSV	ToSLCV	BR:Coi25:07	BR:Coi4:07	BR:Pda4:05	BR:Coi3:07	BR:Coi22:07	BR:Pda58:05
BGMV	--	44	36	30	30	31	32	41	35	32	24	48	45	40	29	24	40
ToYSV		--	68	58	49	71	50	69	63	57	25	38	68	82	24	21	69
SimMV			--	58	45	67	47	72	72	56	18	42	63	69	18	5	75
SiMoV				--	46	60	51	55	55	51	32	27	60	58	13	13	53
SiYMV					--	49	71	43	42	63	18	27	40	50	14	18	49
TGMV						--	52	68	67	60	25	35	54	70	19	20	63
ToCMoV							--	42	43	70	23	35	42	52	25	25	55
ToRMV								--	90	49	17	43	57	68	19	13	72
ToSRV									--	49	14	41	54	64	18	6	70
ToYVSV										--	4	35	42	56	13	11	56
ToSLCV											--	11	22	26	71	71	23
BR:Coi25:07 ^a												--	37	37	5	8	49
BR:Coi4:07 ^b													--	64	16	10	64
BR:Pda4:05 ^c														--	20	19	68
BR:Coi3:07 ^d															--	82	22
BR:Coi22:07 ^e																--	9
BR:Pda58:05 ^f																	--

^{a-f}Proposed new species: ^a*Blainvillea* yellow spot virus (BIYSV); ^bSida common mosaic virus (SiCmMV); ^cTomato leaf distortion virus (ToLDV); ^dSida yellow leaf curl virus (SiYLCV); ^eTomato common mosaic virus (ToCmMV); ^fTomato mild mosaic virus (ToMIMV).

Supplemental Table S5. Percent sequence identities between the deduced amino acid sequences of the CP (AV1) ORF encoded by the DNA-A of the six new begomovirus species detected in Brazil and the most closely related viruses.

	BGMV	ToYSV	SimMV	SiMoV	SiYMV	TGMV	ToCMoV	ToRMV	ToSRV	ToYVSV	ToSLCV	BR:Coi25:07	BR:Coi4:07	BR:Pda4:05	BR:Coi3:07	BR:Coi22:07	BR:Pda58:05
BGMV	--	92	93	92	86	91	92	91	93	89	90	93	92	94	93	91	90
ToYSV		--	95	96	89	89	90	90	90	90	90	89	95	95	96	90	89
SimMV			--	96	90	90	90	90	91	90	91	90	96	97	97	90	89
SiMoV				--	90	90	91	90	90	90	91	90	95	96	96	91	89
SiYMV					--	84	84	84	85	84	84	84	89	89	90	85	83
TGMV						--	88	88	90	93	89	89	89	92	90	88	88
ToCMoV							--	99	90	88	89	93	90	92	91	92	88
ToRMV								--	90	88	88	94	89	92	90	91	88
ToSRV									--	89	88	90	91	93	92	89	91
ToYVSV										--	89	87	89	92	90	89	87
ToSLCV											--	89	91	94	91	90	89
BR:Coi25:07 ^a												--	91	91	90	89	88
BR:Coi4:07 ^b													--	96	95	90	89
BR:Pda4:05 ^c														--	97	92	92
BR:Coi3:07 ^d															--	91	90
BR:Coi22:07 ^e																--	86
BR:Pda58:05 ^f																	--

^{a-f}Proposed new species: ^a*Blainvillea* yellow spot virus (BIYSV); ^bSida common mosaic virus (SiCmMV); ^cTomato leaf distortion virus (ToLDV); ^dSida yellow leaf curl virus (SiYLCV); ^eTomato common mosaic virus (ToCmMV); ^fTomato mild mosaic virus (ToMIMV).

Supplemental Table S6. Percent sequence identities between the deduced amino acid sequences of the NSP (BV1) ORF encoded by the DNA-B of the six new begomovirus species detected in Brazil and the most closely related viruses.

	BGMV	ToYSV	SimMV	TGMV	ToCMoV	ToRMV	ToSRV	ToYVSV	ToCLYV	BR:Coi25:07	BR:Coi22:07	BR:Pda58:05
BGMV	--	75	72	70	72	70	70	70	71	67	68	72
ToYSV		--	78	73	70	73	74	72	72	73	67	76
SimMV			--	68	70	75	75	71	70	69	66	73
TGMV				--	67	71	71	75	70	71	65	69
ToCMoV					--	63	64	69	81	69	76	69
ToRMV						--	97	71	67	66	64	70
ToSRV							--	71	67	67	65	70
ToYVSV								--	70	69	68	73
ToCLYV									--	73	80	69
BR:Coi25:07 ^a										--	70	67
BR:Coi22:07 ^b											--	66
BR:Pda58:05 ^c												--

^{a-c}Proposed new species: ^a*Blainvillea* yellow spot virus (BIYSV); ^bTomato common mosaic virus (ToCmMV); ^cTomato mild mosaic virus (ToMIMV)

Supplemental Table S7. Percent sequence identities between the deduced amino acid sequences of the MP (BC1) ORF encoded by the DNA-B of the six new begomovirus species detected in Brazil and the most closely related viruses.

	BGMV	ToYSV	SimMV	TGMV	ToCMoV	ToRMV	ToSRV	ToYVSV	ToCLYV	BR:Coi25:07	BR:Coi22:07	BR:Pda58:05
BGMV	--	79	81	80	78	80	81	77	78	79	77	78
ToYSV		--	80	82	77	78	79	78	79	77	79	79
SimMV			--	86	78	89	90	80	79	80	79	84
TGMV				--	84	85	85	85	84	83	85	88
ToCMoV					--	78	78	79	91	84	90	78
ToRMV						--	98	82	89	80	78	81
ToSRV							--	82	79	80	79	82
ToYVSV								--	80	78	78	79
ToCLYV									--	86	92	80
BR:Coi25:07 ^a										--	83	78
BR:Coi22:07 ^b											--	79
BR:Pda58:05 ^c												--

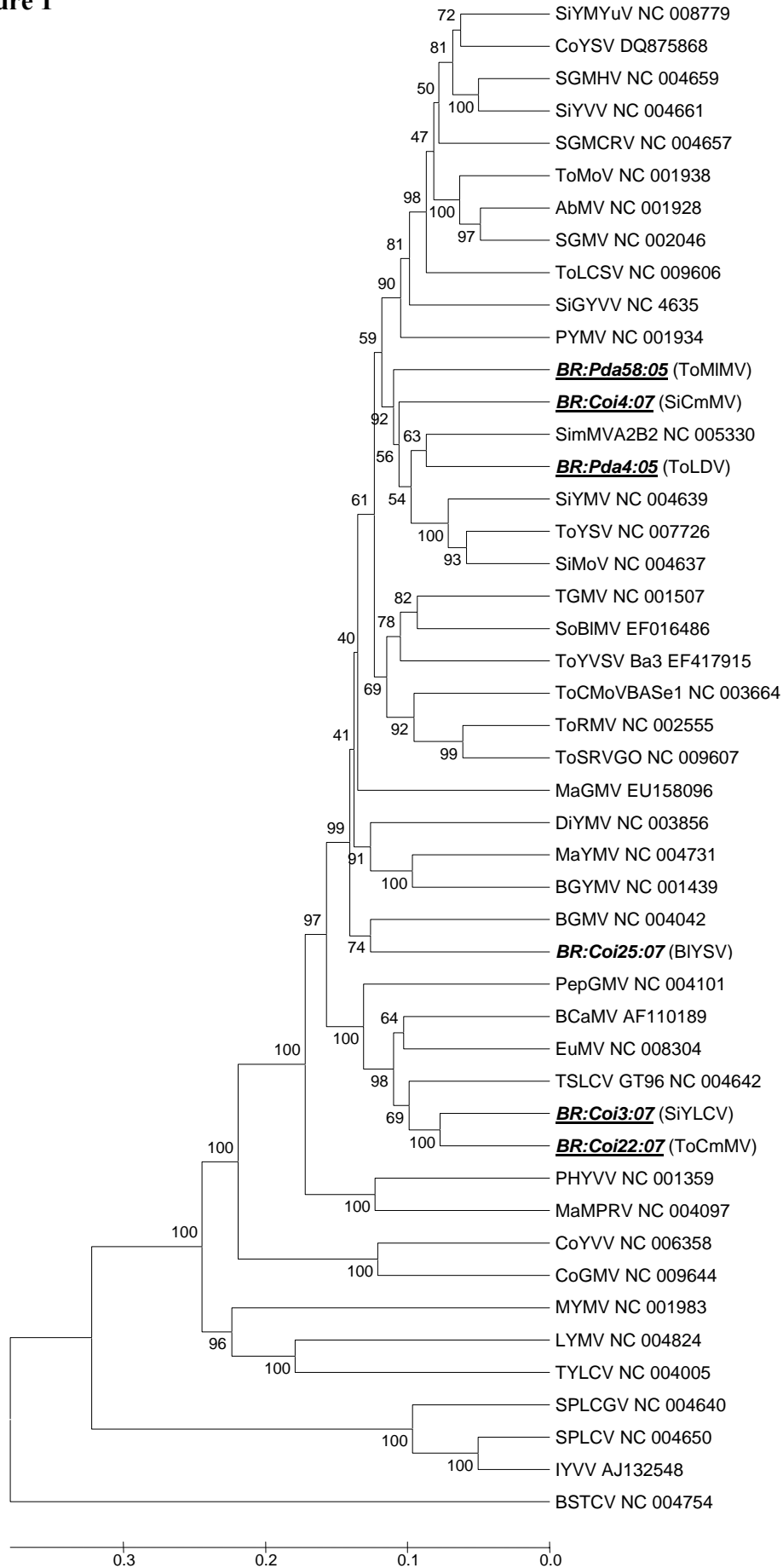
^{a-c}Proposed new species: ^a*Blainvillea* yellow spot virus (BIYSV); ^bTomato common mosaic virus (ToCmMV); ^cTomato mild mosaic virus (ToMIMV)

Figure legends

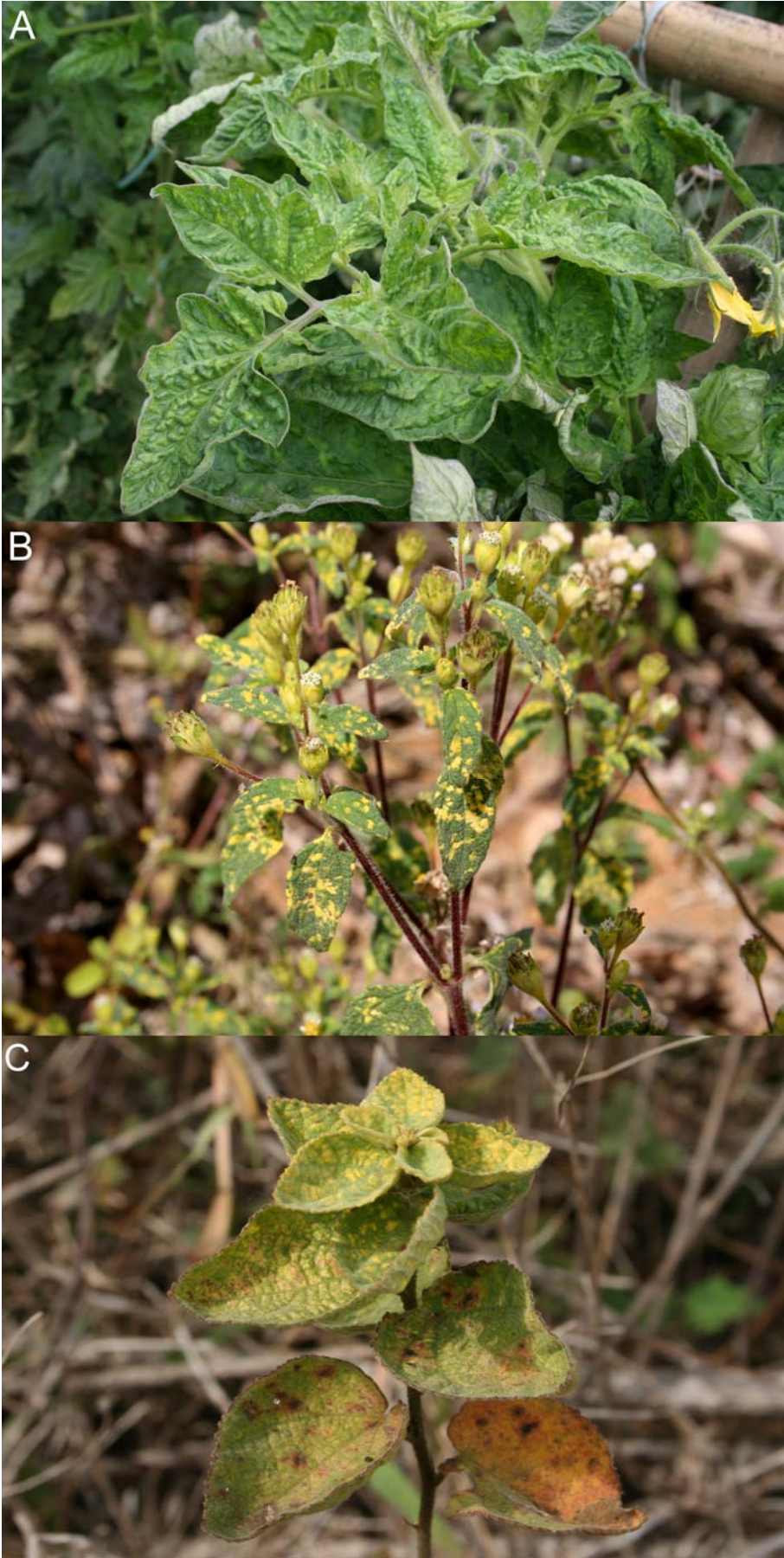
Figure 1. Phylogenetic tree based on the complete DNA-A sequences of the six new begomovirus species, plus additional sequences from Brazilian, New World and Old World begomoviruses. Horizontal distances are proportional to the genetic distances among the isolates. Vertical distances are arbitrary. The numbers on each branch represent bootstrap values (1,000 replications). The new species are highlighted in the tree: ToMIMV, Tomato mild mosaic virus; SiCmMV, Sida common mosaic virus; ToLDV, Tomato lead distortion virus; BIYSV, *Blainvillea* yellow spot virus; SiYLCV, Sida yellow leaf curl virus; ToCmMV, Tomato common mosaic virus.

Supplemental Figure S1. A. Mosaic symptoms in plant from which isolate BR:Coi22:07 (Tomato common mosaic virus, ToCmMV) was obtained. **B.** Yellow spot symptoms in the plant from which isolate BR:Coi25:07 (*Blainvillea* yellow spot virus, BIYSV) was obtained. **C.** Mosaic symptoms in the plant from which BR:Coi4:07 (Sida common mosaic virus, SiCmMV) was obtained. All three plants collected in Coimbra, Minas Gerais (coordinates 20°51'55" S; 42°49'01" W) in July 17th, 2007.

Figure 1



Supplemental Figure S1



CAPÍTULO 2

ESTRUTURA GENÉTICA DE DUAS POPULAÇÕES DE GEMINIVÍRUS INFECTANDO TOMATEIRO NA REGIÃO SUDESTE DO BRASIL

INTRODUÇÃO

A família *Geminiviridae* é constituída por vírus que possuem partículas icosaédricas geminadas e um genoma composto por uma fita simples de DNA circular. A família é dividida em quatro gêneros (*Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus*), de acordo com o tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros, organização do genoma e relacionamento filogenético (Stanley *et al.*, 2005). Os begomovírus, transmitidos pela mosca branca *Bemisia tabaci*, constituem um grupo de vírus de plantas de grande relevância para a agricultura, devido ao aumento na incidência e severidade de doenças por eles causadas nas últimas décadas em diversas culturas de grande importância econômica, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Polston e Anderson, 1997; Morales e Anderson, 2001; Monci *et al.*, 2002; Briddon, 2003; Were *et al.*, 2004). A cultura do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. = *Lycopersicon esculentum* Mill.) é uma das mais afetadas pelos begomovírus em todo o mundo (Czosnek e Laterrot, 1997; Ribeiro *et al.*, 2003; Morales e Jones, 2004; Sawangjit *et al.*, 2005).

Nas Américas, as doenças causadas por begomovírus vêm causando danos significativos para a produção de tomate desde a década de 1980 (Polston e Anderson, 1997; Ribeiro *et al.*, 2003; Morales e Jones, 2004). Perdas substanciais têm sido

relatadas em diversos países, incluindo os EUA (principalmente o estado da Flórida), México, países da América Central e Caribe, e Venezuela (Polston e Anderson, 1997; Morales e Jones, 2004). Com exceção do *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), introduzido na República Dominicana a partir de mudas de tomateiro importadas de Israel (Nakhla *et al.*, 1994), todos os demais vírus isolados e caracterizados a partir de tomateiros nos países do continente americano são nativos desse continente, e nunca foram relatados em outros locais (Morales e Anderson, 2001; Zerbini *et al.*, 2005). De fato, a filogenia da família *Geminiviridae* (e não apenas dos geminivírus que infectam o tomateiro) é altamente correlacionada com a distribuição geográfica das espécies virais (Rybicki, 1994; Stanley *et al.*, 2005).

A partir da década de 1990 ocorreram diversos relatos de danos causados por begomovírus na cultura do tomateiro nas principais regiões produtoras do Brasil, coincidindo com a introdução do biótipo B de *B. tabaci*, relatado pela primeira vez em 1992 no estado de São Paulo (Melo, 1992). O biótipo B apresenta uma gama de hospedeiros mais ampla em comparação ao biótipo A (o único até então presente no Brasil), além de maior fecundidade e capacidade de dispersão (Bedford *et al.*, 1994; Santos *et al.*, 2004). Devido a essas características, o biótipo B se disseminou rapidamente por todas as regiões quentes e secas do Brasil, incluindo as principais regiões produtoras de tomate (Lourenção e Nagai, 1994). Simultaneamente, a incidência de begomovírus em tomateiro foi relatada no Distrito Federal (Ribeiro *et al.*, 1994) e nos estados de Minas Gerais (Resende e Cupertino, 1996; Zerbini *et al.*, 1996), São Paulo (Faria *et al.*, 1997), Rio de Janeiro (Galvão *et al.*, 1998), Bahia (Ribeiro *et al.*, 1996) e Pernambuco (Bezerra *et al.*, 1997).

A caracterização das espécies de begomovírus associadas a alguns desses relatos levou à descrição de cinco novas espécies: *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV)

(Fernandes *et al.*, 2006), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) (Ribeiro *et al.*, 2007), *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) (Calegario *et al.*, 2007), *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) e *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) (Fernandes *et al.*, 2008). Pelo menos seis espécies tentativas, ainda não totalmente caracterizadas, também foram descritas (Ambrozevicius *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2003; Inoue-Nagata *et al.*, 2006). Algumas dessas espécies encontram-se amplamente distribuídas pelo país, enquanto outras estão restritas a certas regiões. Por exemplo, o ToSRV já foi relatado nos estados de Goiás, Minas Gerais, Pernambuco, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo (Rezende *et al.*, 1997; Lima *et al.*, 2006; Castillo-Urquiza *et al.*, 2007; Cotrim *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2008). Por outro lado, o ToYSV foi relatado apenas em Minas Gerais (Calegario *et al.*, 2007).

A explicação mais provável para o rápido surgimento e disseminação de begomovírus na cultura do tomateiro é a colonização de plantas silvestres e daninhas pelo biótipo B de *B. tabaci*, possibilitando que vírus nativos presentes nestas plantas sejam transferidos para o tomateiro. Três observações corroboram essa hipótese. Em primeiro lugar, todas as espécies de begomovírus detectadas até o presente são de ocorrência restrita ao Brasil. Em segundo lugar, a caracterização biológica de algumas espécies (ToRMV, ToCMoV e ToYSV) confirmou que plantas daninhas como *Nicandra physaloides*, *Solanum nigrum* e *Datura stramonium* são hospedeiras (Fernandes *et al.*, 2006; Calegario *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007). Por fim, begomovírus originalmente encontrados em plantas silvestres/daninhas, como o *Sida mottle virus* (SiMoV) e o *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV), já foram encontrados infectando naturalmente o tomateiro (Castillo-Urquiza *et al.*, 2007; Cotrim *et al.*, 2007). A presença de diversas espécies no campo, todas transmitidas pelo mesmo inseto vetor, torna comum a ocorrência de infecções mistas, com dois ou mais vírus presentes

simultaneamente na mesma planta (Ribeiro *et al.*, 2003; Castillo-Urquiza *et al.*, 2007). A presença de dois ou mais begomovírus na mesma planta aumenta a probabilidade de eventos de recombinação e/ou pseudo-recombinação entre componentes do genoma viral, o que pode levar ao surgimento de espécies adaptadas a novos hospedeiros (Pita *et al.*, 2001; Monci *et al.*, 2002; Andrade *et al.*, 2006; Inoue-Nagata *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007).

As estratégias de manejo de viroses vegetais são baseadas em medidas preventivas, e portanto são mais eficientes quando estabelecidas com uma base epidemiológica (Nutter, 1997; Jones, 2004). Por sua vez, o estudo de epidemias de viroses vegetais deve ter uma abordagem populacional (Sacristan *et al.*, 2004). A definição da estrutura genética é o primeiro passo para o estudo de populações virais, pois a estrutura genética reflete a história evolutiva e o potencial da população para evoluir (Pinel *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2004; Font *et al.*, 2007). A estrutura genética refere-se à quantidade de variabilidade genética e a sua distribuição dentro e entre subpopulações (Garcia-Arenal *et al.*, 2001). A variabilidade genética é resultado do processo evolutivo atuando sobre a população, e determina o potencial de adaptação de um organismo ao ambiente. A variabilidade genética de populações virais afeta diretamente o manejo de viroses vegetais. O entendimento da dinâmica da variabilidade de populações de vírus de plantas é necessário para entender como as populações evoluem, bem como as implicações para a durabilidade de medidas de manejo da virose (Seal *et al.*, 2006).

Este trabalho teve como objetivo determinar a estrutura genética de populações de begomovírus em tomateiro e plantas daninhas associadas, em duas das principais regiões produtoras do Sudeste brasileiro, os municípios de Paty do Alferes (RJ) e Coimbra (MG).

MATERIAL E MÉTODOS

1. Coleta de amostras

Um total de 119 amostras foliares de tomateiro foram coletadas em maio de 2005 em campos localizados no município de Paty do Alferes (RJ) (22°25'44''S; 43°25'08'' W). Em julho de 2007, 17 amostras de tomateiro e 43 amostras de plantas daninhas foram coletadas em Coimbra (MG) (20°51'55" S; 42°49'01" W) (Figura 1). Foram coletadas apenas plantas que apresentavam sintomas típicos de infecção por begomovírus (mosaico, deformação foliar e nanismo). As amostras foram armazenadas em sacos plásticos e transportadas para o laboratório, onde foram mantidas a -80°C até a extração de DNA.

2. Confirmação da presença de begomovírus

A presença de begomovírus foi verificada por meio de reações de PCR utilizando-se os oligonucleotídeos universais para o gênero *Begomovirus* PAL1v1978 e PAR1c496 (Rojas *et al.*, 1993), a partir de DNA total extraído das amostras (Dellaporta *et al.*, 1983). A amplificação consistiu em 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento dos oligonucleotídeos a 55°C por 2 min e extensão a 72°C por 2 minutos. Os produtos da amplificação foram analisados em gel de agarose 0,7% (p/v).

3. Clonagem e seqüenciamento do genoma completo de begomovírus

As amostras positivas foram utilizadas para a amplificação dos genomas virais completos utilizando-se a DNA polimerase do fago phi29 (Inoue-Nagata *et al.*, 2004; Haible *et al.*, 2006). Os produtos de amplificação foram clivados com as enzimas *Apa* I, *Bam*H I, *Cla* I, *Eco*R I, *Hin*D III, *Kpn* I ou *Pst* I, e ligados ao vetor pKS+, previamente clivado com a mesma enzima. Os clones foram classificados como DNA-A ou DNA-B por meio de hibridização molecular utilizando sondas específicas, e completamente seqüenciados (Macrogen, Inc., Seul, Coréia do Sul).

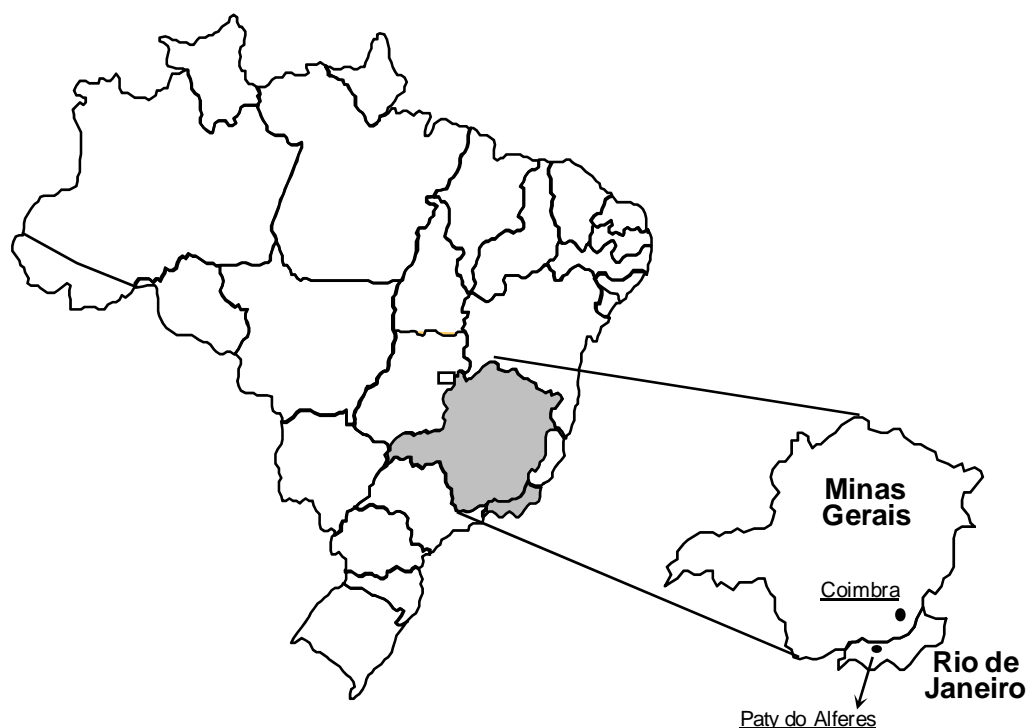


Figura 1. Localização geográfica dos dois locais de coleta de amostras, os municípios de Paty do Alferes, estado do Rio de Janeiro (22° 25' 44" S, 43° 25' 08" O), e Coimbra, estado de Minas Gerais (20°51'55" S; 42°49'01" W).

4. Análise filogenética

As filogenias para cada conjunto de dados foram construídas pelo método de “Neighbor-Joining” (NJ). Foi empregada a distância de Kimura 2-parâmetros e análise de “bootstrap” com 1.000 repetições, utilizando-se o programa MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007).

5. Determinação da estrutura genética das populações virais

5.1. Descritores gerais

As análises de variabilidade genética foram conduzidas de acordo com a abordagem de genética molecular de populações. Inicialmente foram quantificados os principais descritores de variabilidade molecular: número de sítios polimórficos, número total de mutações (η), número médio de diferenças de nucleotídeos (k), diversidade nucleotídica (π), número de haplótipos, diversidade haplotípica (H_d), Teta-W (S), Teta- (η) . Para tal, utilizou-se o programa DnaSP (Rozas *et al.*, 2003).

A partição da variação genética e inferências sobre a estrutura da população foram baseadas no índice de fixação F de Wright (Weir, 1996). Para estudar a subdivisão da população e estimar a variabilidade dentro e entre populações, foi efetuada análise de variância molecular (AMOVA) para estimar Φ_{ST} , com o programa Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005), empregando-se a distância de Kimura 2-parâmetros e estimando-se a significância com base em análise de permutação com 1.000 repetições.

5.2. Parametrização de mecanismos evolutivos

5.2.1. Testes de neutralidade

Três tipos de testes de neutralidade foram empregados para testar a hipótese de ocorrência de seleção em populações: Tajima's D, Fu and Li's D* e F*. Para as análises foi utilizado o programa DnaSP (Rozas *et al.*, 2003), com diferentes conjuntos de dados considerando-se populações únicas ou subpopulações separadas com base em localização geográfica. No teste baseado em número de substituições sinônimas (Ds) e não-sinônimas (Dns) com o modelo de Pamilo-Bianchi-Li (PBL), foi utilizado o programa MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007).

5.2.2. Testes para detectar subdivisão na população

Para determinar a existência ou não de subdivisão na população, foi empregado o teste de permutação de Hudson para estimar a estatística Kst. A significância do valor estimado foi calculada com base em 1.000 repetições.

5.2.3. Testes para detectar migração

A taxa de migração (M) foi estimada por simulação com o método de Cadeia de Markov-Monte Carlo (MCMC) implementado no programa MDIV (Nielsen e Wakeley, 2001). Foi estimada a probabilidade *a posteriori* das estimativas dos parâmetros M (taxa de migração). As análises foram realizadas com o processo coalescente. Para as estimativas bayesianas foram empregados 2 milhões de passos, com 500.000 gerações de "burnin".

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Detecção viral preliminar nas amostras coletadas

Um total de 175 amostras foram coletadas e testadas para a presença de begomovírus via PCR utilizando oligonucleotídeos universais para o gênero *Begomovirus*. Em Paty do Alferes (RJ), em maio de 2005, 119 amostras de tomateiro foram coletadas em seis propriedades, e 110 foram positivas para infecção por begomovírus. Em Coimbra (MG) foram coletadas 40 amostras provenientes de plantas daninhas, 16 amostras de tomateiro, 3 amostras de feijoeiro e 1 amostra de mandioca, num total de 60 amostras em oito pontos de coleta. Onze amostras de plantas daninhas e 13 amostras de tomateiro apresentaram resultado positivo para begomovírus. As amostras de feijoeiro e mandioca apresentaram resultado negativo. Portanto, do total de 175 amostras coletadas e testadas para a presença de begomovírus, 134 apresentaram resultado positivo.

2. Clonagem de genomas virais e análise das seqüências

Das 134 amostras positivas foram selecionadas 56, abrangendo todos os pontos de coleta: 39 amostras coletadas em Paty do Alferes e 17 amostras coletadas em Coimbra. Foram obtidos 106 clones, 69 correspondentes a DNA-A e 37

correspondentes a DNA-B. A partir das amostras coletadas em Paty do Alferes foram obtidos 76 clones, 50 correspondentes a DNA-A e 26 a DNA-B. Em Coimbra foram obtidos 23 clones a partir de 12 amostras de tomateiro, 13 correspondentes a DNA-A e 10 a DNA-B, e 7 clones a partir de 5 amostras de plantas daninhas, 6 correspondentes a DNA-A e um clone correspondente a DNA-B (Tabela 1).

A análise das seqüências dos 69 clones de DNA-A indicou a presença de oito espécies de begomovírus (Tabela 2). Seis dessas espécies foram consideradas espécies novas, pois os clones correspondentes apresentaram menos de 83% de identidade com begomovírus descritos anteriormente, assim como menos de 85% de identidade entre eles mesmos.

Em Paty do Alferes, o *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) foi a espécie predominante, encontrada em 22 das 39 amostras analisadas (56,4%), seguido pela espécie tentativa *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV) (10 das 39 amostras, ou 25,6%). A espécie *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV) foi encontrada em 3 amostras (7,7%). As espécies tentativas *Tomato mild mosaic virus* (ToMIMV) e *Tomato leaf distortion virus* (ToLDV) foram encontradas em apenas uma e duas amostras, respectivamente. Quatro amostras de tomateiro coletadas em Paty do Alferes apresentaram infecção mista: duas amostras com ToYVSV e ToCmMV, uma amostra com SimMV e ToYVSV, e uma amostra com ToYVSV e ToLDV (Tabela 2).

Em Coimbra, a espécie tentativa ToCmMV foi a única encontrada infectando tomateiro. Nas amostras de plantas daninhas (pertencentes às espécies *Sida micrantha*, *Sida rhombifolia* e *Blainvillea romboidea*), foram encontradas as espécies tentativas *Sida common mosaic virus* (SiCmMV), *Sida yellow leaf curl virus* (SiYLCV) e *Blainvillea yellow spot virus* (BIYSV) (Tabela 2).

Tabela 1. Lista parcial dos clones correspondentes ao genoma completo de begomovírus (DNA-A e DNA-B), obtidos de amostras coletadas em Paty do Alferes e Coimbra que apresentaram resultado positivo em PCR utilizando oligonucleotídeos universais para o gênero. Estão listados apenas os clones cujas sequências foram determinadas e utilizadas nas análises.

Local da coleta	Amostra	Hospedeiro	Isolado	Clones	
				DNA-A	DNA-B
Paty do Alferes	A1b	Tomateiro	BR:Pda1:05		GP787B
	A2a	Tomateiro	BR:Pda2:05	GP6A	
			BR:Pda3:05	GP367A	GP368B
	A12a	Tomateiro	BR:Pda4:05	GP436A	
	A15a	Tomateiro	BR:Pda5:05		GP447B
	B1b	Tomateiro	BR:Pda6:05	GP442A	GP443B
	B1c	Tomateiro	BR:Pda7:05	GP159A	
	B1d	Tomateiro	BR:Pda8:05	FP1A	FP3B
	B1f	Tomateiro	BR:Pda9:05	GP253A	
				GP258A	
	B2a	Tomateiro	BR:Pda10:05	GP258A	
			BR:Pda11:05	GP267A	
	B3b	Tomateiro	BR:Pda12:05	GP165A	
	B4a	Tomateiro	BR:Pda13:05	FP4A	FP2B
			BR:Pda14:05	FP5A	FP6B
			BR:Pda15:05	FP7A	
			BR:Pda16:05	FP27A	
	B4b	Tomateiro	BR:Pda17:05	GP143A	
			BR:Pda18:05	GP162A	GP158B
	B4f	Tomateiro	BR:Pda19:05		GP712B
	B2g	Tomateiro	BR:Pda20:05		FP8B
			BR:Pda21:05	FP23A	FP22B
	C7a	Tomateiro	BR:Pda22:05	GP413A	
	C8b	Tomateiro	BR:Pda23:05	GP386A	GP384B
	C9a	Tomateiro	BR:Pda24:05	GP399A	GP398B
			BR:Pda25:05	GP681B	
	C10a	Tomateiro	BR:Pda26:05	GP404A	
			BR:Pda27:05		GP720B
	C11a	Tomateiro	BR:Pda28:05	GP129A	
			BR:Pda29:05	GP144A	
	C13a	Tomateiro	BR:Pda30:05	GP117A	GP123B
			BR:Pda31:05	GP270A	
	C15a	Tomateiro	BR:Pda32:05	GP441A	
	C16a	Tomateiro	BR:Pda33:05	GP152A	
			BR:Pda34:05	GP153A	
	C17a	Tomateiro	BR:Pda35:05	GP103A	
			BR:Pda36:05	GP339A	GP350B
	C18a	Tomateiro	BR:Pda37:05	GP460A	
	C19a	Tomateiro	BR:Pda38:05	GP35A	
			BR:Pda39:05	GP624B	
	C25a	Tomateiro	BR:Pda40:05	GP390A	
	D1a	Tomateiro	BR:Pda41:05	GP137A	
			BR:Pda42:05	FP16B	
	D2a	Tomateiro	BR:Pda43:05	GP247A	
			BR:Pda44:05	GP249A	
	D3a	Tomateiro	BR:Pda45:05	GP358A	
D6a	Tomateiro	BR:Pda46:05	GP96A		

Tabela 1 (cont.)

Local da coleta	Amostra	Hospedeiro	Isolado	Clones	
				DNA-A	DNA-B
Paty do Alferes	D6a	Tomateiro	BR:Pda47:05	GP88A	
	E2a	Tomateiro	BR:Pda48:05	GP309A	
	E2b	Tomateiro	BR:Pda49:05	GP201A	
			BR:Pda50:05	GP352A	GP211B
	E3b	Tomateiro	BR:Pda51:05	GP322A	
			BR:Pda52:05	GP370A	GP369B
	E4a	Tomateiro	BR:Pda53:05		FP17B
	E4b	Tomateiro	BR:Pda54:05	GP80A	
	E6a	Tomateiro	BR:Pda55:05	GP314A	
	E8b	Tomateiro	BR:Pda56:05	GP234A	
	E11b	Tomateiro	BR:Pda57:05		GP676B
	PD	Tomateiro	BR:Pda58:05	FP24A	FP11B
			BR:Pda59:05	FP25A	FP12B
BR:Pda60:05			FP26A	FP21B	
Coimbra	S2	<i>S. rhombifolia</i>	BR:Coil:07	GC469A	
			BR:Coil2:07	GC470A	
	S4	<i>S. rhombifolia</i>	BR:Coil3:07	GC565A	
	M7	<i>S. micrantha</i>	BR:Coil4:07	GC550A	
	M8	<i>S. micrantha</i>	BR:Coil5:07	GC589A	
	T25	Tomateiro	BR:Coil6:07		GC606B
	T27	Tomateiro	BR:Coil7:07	GC951A	
	T28	Tomateiro	BR:Coil8:07	GC913A	
			BR:Coil9:07	GC916A	
			BR:Coil10:07	GC917A	
			BR:Coil11:07	GC871A	GC547B
	T30	Tomateiro	BR:Coil12:07	GC874A	
			BR:Coil13:07		GC551B
	T40	Tomateiro	BR:Coil14:07		GC970B
	T42	Tomateiro	BR:Coil15:07	GC990A	GC989B
			BR:Coil16:07		GC968B
			BR:Coil17:07		GC515B
	T43	Tomateiro	BR:Coil18:07	GC889A	GC891B
			BR:Coil19:07	GC893B	
	T44	Tomateiro	BR:Coil20:07	GC487A	
			BR:Coil21:07	GC489A	
	T48	Tomateiro	BR:Coil22:07	GC942A	GC938B
	T52	Tomateiro	BR:Coil23:07	GC858A	
	T53	Tomateiro	BR:Coil24:07	GC909A	
	S57	<i>Blainvillea rhomboidea</i>	BR:Coil25:07	GC577A	GC575B

Tabela 2. Classificação taxonômica dos isolados obtidos de amostras de tomateiro e plantas daninhas coletadas em Paty do Alferes e em Coimbra.

Isolado (amostra)	Local de coleta	Hospedeiro	Espécie viral
BR:Pda13:05, BR:Pda14:05, BR:Pda15:05, BR:Pda16:05 (B4a) BR:Pda21:05 (B2g) BR:Pda2:05, BR:Pda3:05 (A2a) BR:Pda38:05 (C19a) BR:Pda54:05 (E4b) BR:Pda46:05 (D6a) ^a BR:Pda35:05, BR:Pda36:05 (C17a) BR:Pda30:05 (C13a) BR:Pda28:05, BR:Pda29:05 (C11a) BR:Pda41:05 (D1a) BR:Pda17:05, BR:Pda18:05 (B4b) BR:Pda33:05, BR:Pda34:05 (C16a) BR:Pda7:05 (B1c) BR:Pda12:05 (B3b) BR:Pda49:05 (E2b) BR:Pda45:05 (D3a) BR:Pda52:05 (E3b) BR:Pda50:05 (E2b) BR:Pda23:05 (C8b) BR:Pda24:05 (C9a) BR:Pda26:05 (C10a) BR:Pda6:05 (B1b) BR:Pda22:05 (C7a)	Paty do Alferes	tomateiro	<i>Tomato yellow vein streak virus</i> (ToYVSV)
BR:Pda8:05 (B1d) BR:Pda:05 GP247A (D2a) BR:Pda:05 GP460A (C18a)	Paty do Alferes	tomateiro	<i>Sida micrantha mosaic virus</i> (SimMV)
BR:Pda56:05 (E8b) BR:Pda44:05 (D2a) BR:Pda9:05 (B1f) BR:Pda10:05, BR:Pda11:05 (B2a) BR:Pda31:05 (C13a) BR:Pda48:05 (E2a) BR:Pda55:05 (E6a) BR:Pda51:05 (E3b) BR:Pda40:05 (C25a) BR:Pda32:05 (C15a)	Paty do Alferes	tomateiro	Tomato common mosaic virus (ToCmMV) ^b
BR:Coi20:07, BR:Coi21:07 (T44) BR:Coi23:07 (T52) BR:Coi11:07, BR:Coi12:07 (T30) BR:Coi18:07 (T43) BR:Coi24:07 (T53) BR:Coi8:07, BR:Coi9:07, BR:Coi10:07 (T28) BR:Coi22:07 (T48) BR:Coi7:07 (T27) BR:Coi15:07 (T40)	Coimbra	tomateiro	Tomato common mosaic virus (ToCmMV) ^b
BR:Pda58:05, BR:Pda59:05, BR:Pda60:05 (PD)	Paty do Alferes	tomateiro	Tomato mild mosaic virus (ToMIMV) ^b
BR:Pda47:05 (D6a) BR:Pda4:05 (A12a)	Paty do Alferes	tomateiro	Tomato leaf distortion virus (ToLDV) ^b
BR:Coi25:07 (S57)	Coimbra	<i>Blainvillea rhomboidea</i>	<i>Blainvillea</i> yellow spot virus (BIYSV) ^b
BR:Coi4:07 (M7) BR:Coi5:07 (M8)	Coimbra	<i>Sida micrantha</i>	<i>Sida</i> common mosaic virus (SiCmMV) ^b
BR:Coi1:07, BR:Coi2:07 (S2) BR:Coi3:07 (S4)	Coimbra	<i>S. rhombifolia</i>	<i>Sida</i> yellow leaf curl virus (SiYLCV) ^b

^aAmostras com infecção mista.

^bEspécies novas ainda não reconhecidas oficialmente pelo ICTV.

Os resultados mostram que, em Paty do Alferes, foram identificadas cinco espécies de begomovírus infectando o tomateiro: duas espécies já descritas (ToYVSV e SimMV) e três novas espécies (ToCmMV, ToMIMV e ToLDV). Em Coimbra, todas as quatro espécies identificadas são novas. Dessas, três foram encontradas apenas em plantas daninhas (SiYLCV, SiCmMV e BIYSV). Em Paty do Alferes foi encontrada maior diversidade de espécies em tomateiro (nesse local não foram coletadas amostras de plantas daninhas). É interessante ressaltar que amostras de tomateiro coletadas em Paty do Alferes em novembro de 1999 foram negativas para a presença de begomovírus (Ambrozevicius *et al.*, 2002), e que o ano de 2005 foi o primeiro em que a incidência de begomovírus em tomateiro foi relatada no campo. Em Coimbra, begomovírus vêm sendo detectados em tomateiros desde 2002 (F.M. Zerbini *et al.*, *dados não publicados*), porém sem a identificação da(s) espécie(s) viral(is). É possível que o maior número de espécies encontradas em Paty do Alferes seja resultado de eventos de introdução recentes, enquanto que em Coimbra os begomovírus podem estar associados a tomateiros há mais tempo, sendo o ToCmMV a espécie que prevaleceu ao longo do tempo. Entretanto, é possível que o número de amostras analisadas em Coimbra (12) não tenha sido suficiente para detectar a presença de outras espécies virais.

Um outro resultado interessante foi a detecção, em Paty do Alferes, de duas novas espécies infectando tomateiros (ToMIMV e ToLDV) que apresentam maior identidade de seqüência (81% e 83%, respectivamente) com o *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV). Além disso, o próprio SimMV foi detectado em tomateiros naquele local. Esses resultados reforçam a hipótese de que os begomovírus atualmente presentes em tomateiro evoluíram a partir de vírus presentes em plantas silvestres ou daninhas.

3. Análise filogenética

Para determinar o relacionamento filogenético dos begomovírus encontrados em Paty do Alferes e Coimbra com outros begomovírus, foram construídas árvores filogenéticas

baseadas no DNA-A (Figura 2) e DNA-B (Figura 3). Todos os vírus identificados nas amostras coletadas agruparam-se com begomovírus do Novo Mundo.

Em concordância com os resultados obtidos pelas comparações de seqüências, a análise filogenética baseada no DNA-A indicou que as novas espécies ToMIMV e ToLDV, ambas clonadas a partir de amostras de tomateiro coletadas em Paty do Alferes, se agrupam com begomovírus de plantas daninhas como o *Nicandra deforming necrosis virus* (NDNV), o SimMV e a nova espécie Sida common mosaic virus (SiCmMV), obtida de *S. micrantha* coletada em Coimbra (Figura 2). Além disso, o ToCmMV, obtido de tomateiro, e o Sida yellow leaf curl virus (SiYLCV), obtido de *S. rhombifolia*, formam um ramo monofilético com 99% de confiabilidade (Figura 2). Esses resultados confirmam a existência de relacionamento filogenético entre begomovírus de tomateiro e de plantas daninhas, e reforçam a hipótese de que os begomovírus presentes em plantas daninhas teriam originado os vírus atualmente presentes em tomateiro.

Todos os clones correspondentes à espécie ToYVSV se agruparam com os demais begomovírus brasileiros que infectam tomateiro, formando um ramo monofilético com 100% de confiabilidade com os outros dois isolados de ToYVSV previamente sequenciados. A análise filogenética também indica que a espécie tentativa BLYSV, obtida da planta daninha *B. rhomboidea*, não se agrupou com os demais begomovírus de *Sida*, possuindo um relacionamento distante com o *Bean golden mosaic virus* (BGMV) (Figura 2).

Análises filogenéticas baseadas em begomovírus do Novo Mundo indicam que os begomovírus brasileiros formam um grupo monofilético (Rojas *et al.*, 2005). Por esta razão foi considerado um resultado inesperado que os clones correspondentes às espécies ToCmMV e SiYLCV não se agruparam com os begomovírus brasileiros, e sim com begomovírus do México e da América Central. Essa é a primeira vez que espécies de begomovírus obtidas no Brasil se agrupam filogeneticamente com vírus de outros países.

Figura 2. Árvore filogenética baseada nas sequências do DNA-A dos vírus detectados nas amostras de tomateiro e plantas daninhas coletadas em Paty do Alferes e Coimbra. A árvore inclui espécies de begomovírus do Velho Mundo e do Novo Mundo, além de todas as espécies já relatadas no Brasil. A árvore foi obtida pelo método de “Neighbour-Joining”, utilizando-se o programa Mega 4.0. Os números em cada ramo indicam o valor de “bootstrap” (1.000 repetições). As oito espécies virais detectadas nas amostras, indicando-se o local de coleta e o hospedeiro para cada clone, estão indicadas e destacadas com cores diferentes. **A.** Árvore baseada nas sequências do DNA-A da subpopulação correspondente à espécie Tomato common mosaic virus (ToCmMV), indicando-se o local de coleta com cores diferentes.

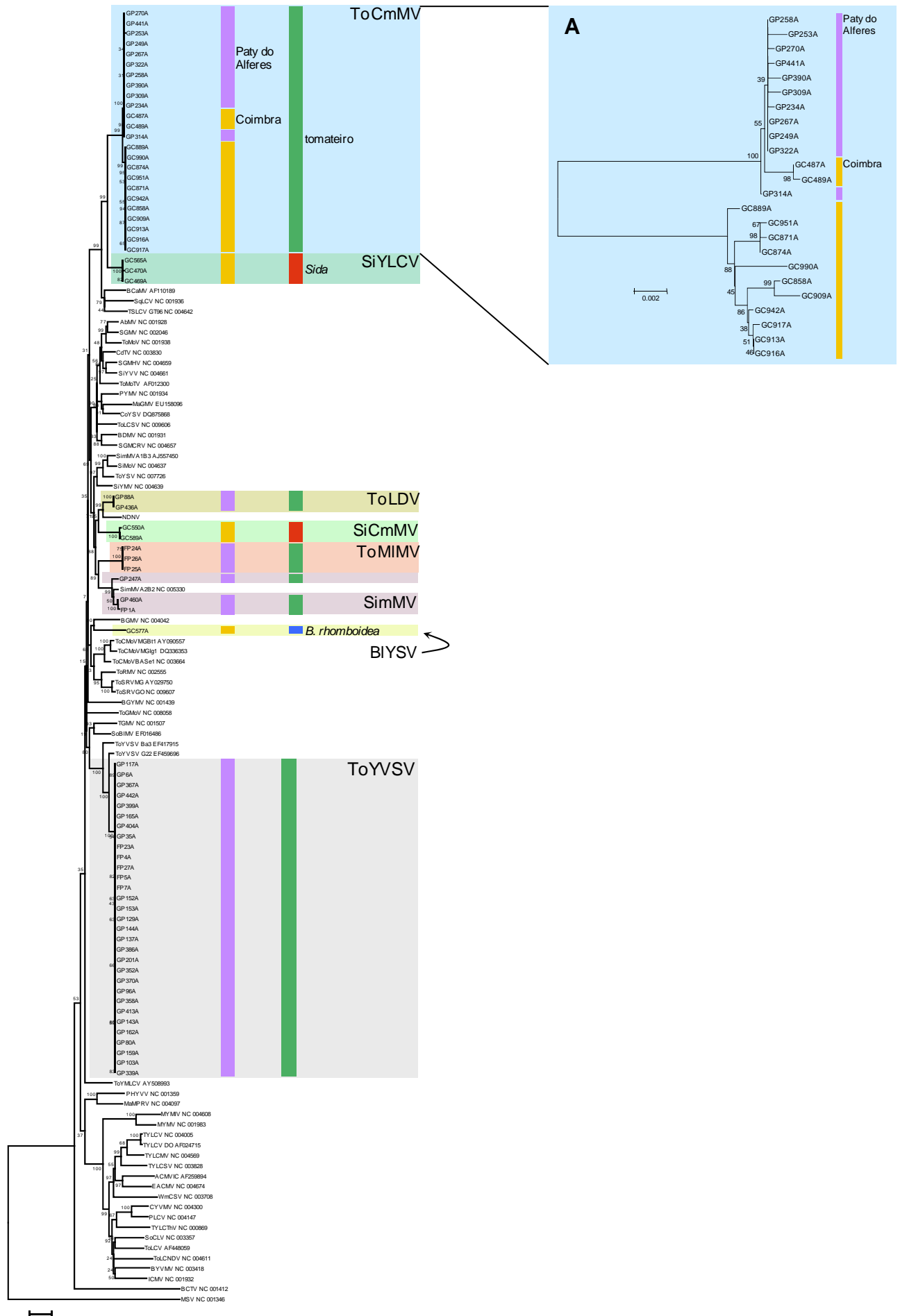
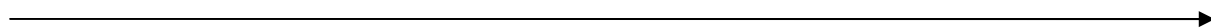
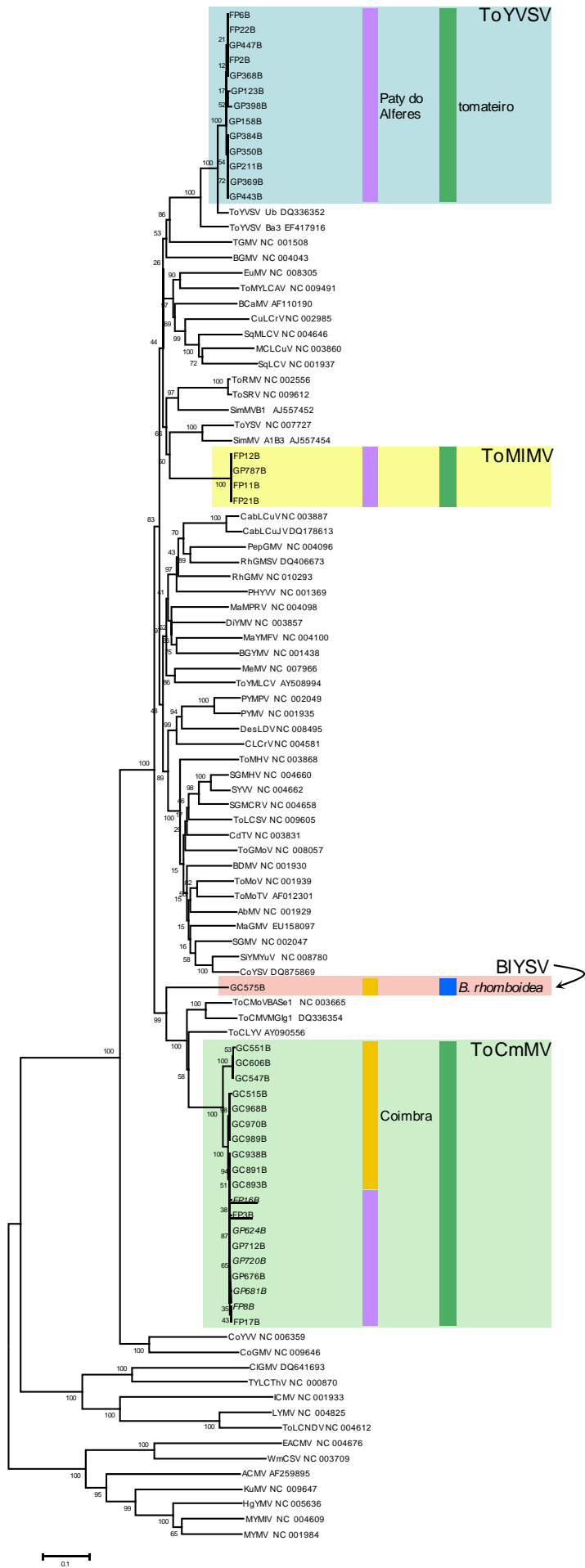


Figura 3. Árvore filogenética baseada nas sequências do DNA-B dos vírus detectados nas amostras de tomateiro e plantas daninhas coletadas em Paty do Alferes e Coimbra. A árvore inclui espécies de begomovírus do Velho Mundo e do Novo Mundo, além de todas as espécies já relatadas no Brasil. A árvore foi obtida pelo método de “Neighbour-Joining”, utilizando-se o programa Mega 4.0. Os números em cada ramo indicam o valor de “bootstrap” (1.000 repetições). As quatro espécies virais para as quais foi clonado DNA-B, indicando-se o local de coleta e o hospedeiro para cada clone, estão identificadas e destacadas com cores diferentes.





Estes vírus podem ser membros de uma linhagem de begomovírus do Novo Mundo distinta da que vinha sendo detectada até o presente no Brasil. Análises de coalescência e estudos de recombinação serão necessários para confirmar esta hipótese. Além de apresentar relacionamento filogenético atípico, o ToCmMV foi a única espécie identificada em ambas localidades. A maioria dos clones (com exceção de GC487A e GC489A) apresentou divisão de acordo com a localização geográfica, ou seja, os clones obtidos de amostras coletadas em Coimbra e em Paty do Alferes divergiram, sugerindo a existência de subdivisão da população (Figura 2A).

A análise filogenética baseada no DNA-B indicou que as espécies ToYVSV, ToMIMV e ToCmMV estão no mesmo clado com os demais begomovírus brasileiros. O DNA-B do ToMIMV agrupou com begomovírus de *Sida*, de forma similar à análise baseada no DNA-A. Ao contrário do que foi observado na árvore baseada no DNA-A, os clones correspondentes ao DNA-B do ToCmMV não estão no mesmo clado dos begomovírus do México e América Central, e não foram diferenciados de acordo com origem geográfica. O DNA-B do BIYSV agrupou com os de begomovírus brasileiros que infectam o tomateiro, completamente separado do BGMV. Em conjunto, os resultados baseados no DNA-B indicam que os dois componentes genômicos dos begomovírus BIYSV e ToCmMV apresentam relacionamento filogenético distinto, sugerindo diferenças nas forças evolutivas que atuam sobre cada componente.

4. Determinação da estrutura genética das populações de ToCmMV e ToYVSV

Os 44 clones correspondentes à espécie ToYVSV (31 clones DNA-A e 13 DNA-B) e os 43 clones correspondentes à espécie ToCmMV (24 DNA-A e 19 DNA-B), foram utilizados para caracterizar essas duas populações. Comparando-se as duas populações, o ToCmMV apresenta uma maior variabilidade genética, representada por número maior de sítios

polimórficos, maior número total de mutações e maior diversidade nucleotídica em relação ao ToYVSV (Tabela 3).

O ToCmMV foi detectado tanto em amostras de tomateiro coletadas em Coimbra quanto em Paty do Alferes. Quando os clones correspondentes ao ToCmMV foram agrupados com base no local de coleta das amostras e os dois grupos foram comparados entre si, foi observado que os clones obtidos de amostras coletadas em Coimbra apresentam maior variabilidade genética, refletida nos maiores valores de diversidade nucleotídica, frequência de mutação, número de haplótipos, diversidade haplotípica, taxas de mutação de sítios segregantes (Theta-W) e número total de mutações (Theta-Eta), em comparação com os clones obtidos de amostras coletadas em Paty do Alferes (Tabela 3).

Os maiores valores de diversidade nucleotídica (π) foram apresentados pelos clones correspondentes ao ToCmMV (0,0142 e 0,0220 para DNA-A e DNA-B, respectivamente), e os menores valores para o ToYVSV (0,0021 e 0,0042 para DNA-A e DNA-B, respectivamente). Os valores de diversidade nucleotídica permitem diferenciar os clones de ToCmMV obtidos de amostras coletadas em Paty do Alferes e Coimbra, sendo maiores para estes últimos. Alta variabilidade a nível regional foi observada para dois geminivírus, o *Beet curly top virus* (BCTV) (Stenger e McMahon, 1997) e o *Cotton leaf curl virus* (CLCuV) (Sanz *et al.*, 1999). Um total de 111 isolados de *Tomato yellow leaf curl virus*-Mild (ToYLCV-Mld) foram coletados na Ilha de La Réunion ao longo de um período de 8 anos. Foi constatada uma baixa diversidade genética entre os isolados, sendo observada a maior diversidade nucleotídica ($\pi = 0,006$) na região intergênica. Entre as regiões codificadoras, a maior diversidade foi observada nas ORFs C4 e Rep ($\pi = 0,003$). Análise com base no ano de coleta dos isolados indicou que, inicialmente, a população apresentou uma diversidade nucleotídica muito baixa ($\pi_{1997} = 0,00066$) seguida de um incremento quase linear na diversidade ao longo dos anos ($\pi_{2004} = 0,0056$). Esta baixa diversidade inicial é consistente com uma única e recente introdução, seguida de uma diversificação moderada da população

viral (Delatte *et al.*, 2007). Um estudo realizado na Califórnia (EUA) com uma população de 81 isolados do *Cucumber mosaic virus* (CMV, um vírus de RNA) constatou valores de diversidade nucleotídica baixos, assim como uma diversidade haplotípica baixa (máximo de três haplótipos predominantes). O maior valor de π (0,03) foi observado para a ORF que codifica a proteína 2b (Lin *et al.*, 2004).

Os valores de frequência de mutação encontram-se entre $7,9 \times 10^{-3}$ e $3,9 \times 10^{-4}$, sendo maiores para os clones de ToCmMV obtidos a partir de amostras coletadas em Coimbra. Estes valores são similares aos relatados para outros geminivírus como o *Maize streak virus* (MSV), onde isolados apresentaram frequências de mutação da ordem de $3,8-10,5 \times 10^{-4}$ sob diferentes condições de seleção, como presença de um efeito gargalo (população inicial pequena do vírus, período curto de aquisição pelo vetor), transferências sucessivas entre hospedeiros sem emprego do vetor, e inoculação em plantas resistentes (Isnard *et al.*, 1998). Resultados similares foram obtidos num experimento controlado de análise da taxa de variabilidade genética do begomovírus *Tomato yellow leaf curl China virus* (TYLCCNV), onde foi encontrada uma frequência média de mutação de $3,5-5,3 \times 10^{-4}$ após 60 dias de infecção em *N. benthamiana* e tomateiro, respectivamente (Ge *et al.*, 2007). Estes valores são considerados similares aos obtidos em estudos com vírus de RNA, como o *Tobacco mosaic virus* (TMV), para o qual foi determinada uma frequência de mutação de $10,2 \times 10^{-4}$ (Rodriguez-Cerezo e Garcia-Arenal, 1989).

Tabela 3. Estrutura genética das subpopulações de Tomato common mosaic virus (ToCmMV) e *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV).

Populações	Tamanho da sequência (nt)	Número de sequências	Número de sítios polimórficos	Número total de mutações (n)	Número médio de diferenças de nucleotídeos (k)	Diversidade nucleotídica (π)	Frequência de mutação*	Número de haplótipos	Diversidade haplotípica (Hd)	Taxa de mutação em sítios segregantes (Theta-W S)	Taxa de mutação (Theta-Eta)
ToCmMV (Total)											
DNA-A	2560	24	103	104	35,257	0,0142	$1,7 \times 10^{-3}$	20	0,975	0,0108	0,0109
DNA-B	2498	19	206	215	54,754	0,0220	$4,5 \times 10^{-3}$	14	0,959	0,0236	0,0247
ToCmMV (Paty do Alferes)											
DNA-A	2560	11	11	11	2,000	0,0008	$3,9 \times 10^{-4}$	8	0,891	0,0015	0,0015
DNA - B	2498	9	14	14	3,111	0,0013	$6,2 \times 10^{-4}$	7	0,917	0,0021	0,0021
ToCmMV (Coimbra)											
DNA-A	2560	13	92	93	24,782	0,0097	$2,8 \times 10^{-3}$	12	0,987	0,0116	0,0117
DNA-B	2498	10	192	197	83,222	0,0334	$7,9 \times 10^{-3}$	7	0,911	0,0272	0,0279
ToYVSV											
DNA-A	2561	31	50	50	5,247	0,0021	$6,3 \times 10^{-4}$	25	0,985	0,0049	0,0049
DNA-B	2506	13	50	50	10,461	0,0042	$1,5 \times 10^{-3}$	12	0,987	0,0064	0,0064

*Número total de mutações/no. total de nucleotídeos sequenciados

Para estudar a subdivisão da população e estimar a variabilidade dentro e entre populações, foi efetuada análise de variância molecular (AMOVA). Os índices de fixação foram altamente significativos ($F_{ST} = 0,75$ e $0,28$, $P < 0,0001$, para DNA-A e DNA-B, respectivamente), sugerindo que existe diferenciação genética entre as duas subpopulações de ToCmMV de Coimbra e de Paty do Alferes. Curiosamente, foi observada menor variabilidade genética dentro de cada subpopulação do que entre as duas subpopulações no caso do DNA-A (25,41% e 74,59%, respectivamente), e o contrário, ou seja, maior variabilidade dentro de cada subpopulação do que entre as subpopulações para o DNA-B (72,3% e 27,7%, respectivamente). Isso provavelmente é consequência da maior variabilidade normalmente observada entre o DNA-B de espécies de begomovírus.

Baseado nas análises do DNA-A e DNA-B do ToCmMV, houve evidência de diferenciação genética entre as subpopulações de Coimbra e de Paty do Alferes, tanto para as estatísticas de diversidade nucleotídica (Ks) (DNA-A: $K_s = 14.3$ e $K_{st} = 0,60$, $P < 0,0001$; DNA-B: $K_s = 45.27$ e $K_{st} = 0.17$, $P < 0,0001$) quanto haplotípica (Hs) (DNA-A: $H_s = 0,94$ e $H_{st} = 0,03$, $P = 0,017$; DNA-B: $H_s = 0,91$ e $H_{st} = 0,05$, $P < 0,0001$). Estes resultados reforçam a hipótese de diferenciação genética entre as subpopulações de ToCmMV de Coimbra e Paty do Alferes, de forma que cada uma pode ser considerada uma subpopulação distinta dessa espécie de begomovírus.

4.1. Análise dos mecanismos evolutivos

4.1.1. Testes de neutralidade

Os testes de neutralidade foram aplicados para avaliar se há evidências de seleção nas regiões genômicas analisadas. As seis ORFs codificadas pelo genoma viral (Rep, Trap, REN e CP codificadas pelo DNA-A; NSP e MP codificadas pelo DNA-B) variam quanto à seleção (Tabela 4). Probabilidade significativa de rejeição da hipótese de neutralidade foi encontrada para as diferentes ORFs tanto para a população de ToYVSV quanto para as duas

subpopulações de ToCmMV (Tabela 4). Consequentemente, essas regiões genômicas encontram-se potencialmente sob seleção.

Foram obtidos valores negativos para o teste Tajima's D para as ORFs Rep, CP e MP do ToYVSV (Tabela 4), o que indica seleção purificadora, ou que este grupo sofreu uma expansão populacional recente. As amostras nas quais o ToYVSV foi detectado foram coletadas em Paty do Alferes em 2005, o primeiro ano em que a incidência de begomovírus foi observada naquela região. Portanto, os dados são consistentes com uma expansão recente da população.

Analisando-se as duas subpopulações de ToCmMV, observam-se valores negativos para o teste Tajima's D para a ORF MP apenas na subpopulação de Paty do Alferes (Tabela 4). De forma análoga ao que foi observado para o ToYVSV, esses resultados são consistentes com uma expansão recente da população, levando-se em consideração que esta foi amostrada no primeiro ano em que ocorria na região. Na análise da população total do ToCmMV, observou-se valor significativo (positivo) apenas para a ORF CP (Tabela 4), indicando que esta ORF pode estar sob seleção. Isolados do begomovírus TYLDV-Mld[RE] apresentaram valores negativos significativos para o teste Tajima's D para todas as ORFs, resultado consistente com expansão da população, o qual foi confirmado mediante estimativa da população efetiva, a qual permaneceu constante de 1997 até 2001 e apresentou um incremento crescente até 2004 (Delatte *et al.*, 2007).

A predominância de valores negativos para o índice dN-dS indica que as substituições que estão ocorrendo são em sua maioria substituições sinônimas, ou seja, mudanças na sequência de nucleotídeos da ORF que não afetam a seqüências de aminoácidos da proteína codificada. Portanto, apesar da rejeição da hipótese de neutralidade para diversas ORFs das duas populações, a ocorrência de mutações não é suficiente para explicar de forma completa a variabilidade genética encontrada. Outros fatores, como recombinação e migração, também devem estar atuando.

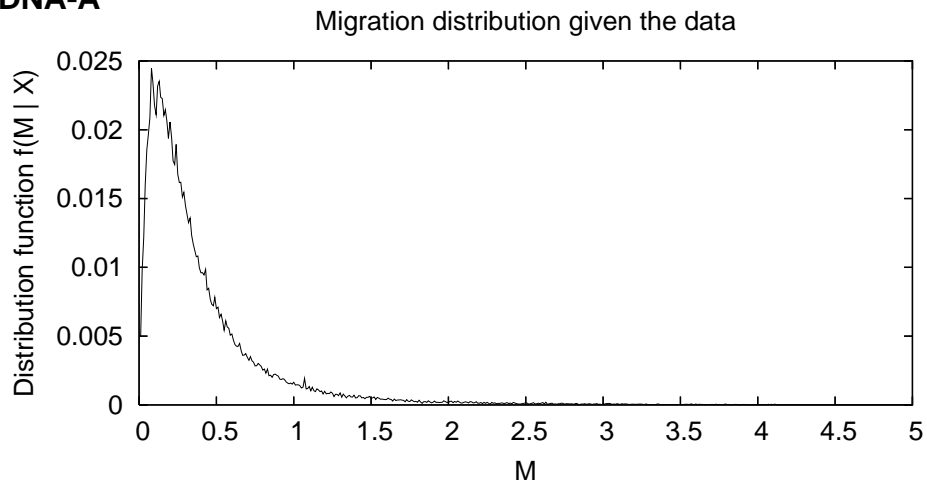
Tabela 4. Resultados dos diferentes testes de neutralidade realizados para cada ORF das populações de Tomato common mosaic virus (ToCmMV) e *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV).

População	ORF	Tajima's D	Fu and Li's D*	Fu and Li's F*	Prob. (dN-dS)
ToYVSV	Rep	-2.063 (P < 0.05)	-2.871 (P < 0.05)	-3.072 (P < 0.05)	0.108 (-1.621)
	Trap	-1.379 (NS)	-2.210 (NS)	-2.285 (NS)	0.340 (0.958)
	Ren	-1.738 (NS)	-2.608 (P < 0.05)	-2.739 (P < 0.05)	0.458 (0.744)
	CP	-1.956 (P < 0.05)	-1.311 (NS)	-1.768 (NS)	0.004 (-2.958)
	NSP	-1.537 (NS)	-2.043 (NS)	-2.181 (NS)	0.411 (-0.824)
	MP	-1.884 (P < 0.05)	-2.170 (NS)	-2.390 (NS)	0.006 (-2.698)
ToCmMV (Total)	Rep	0.650 (NS)	-0.503 (NS)	-0.170 (NS)	0.005 (-2.865)
	Trap	0.918 (NS)	-0.034 (NS)	0.29499 (NS)	0.063 (-1.873)
	Ren	1.524 (NS)	0.669 (NS)	1.079 (NS)	0.328 (-0.982)
	CP	2.202 (P < 0.05)	0.390 (NS)	1.112 (NS)	0.000 (-4.093)
	NSP	-0.429 (NS)	0.661 (NS)	0.393 (NS)	0.000 (-4.471)
	MP	-0.269 (NS)	0.412 (NS)	0.245 (NS)	0.000 (-4.227)
ToCmMV (Paty do Alferes)	Rep	-1.600 (NS)	-1.874 (NS)	-2.031 (NS)	0.863 (-0.173)
	Trap	-1.712 (NS)	-2.020 (NS)	-2.189 (NS)	0.131 (-1.521)
	Ren	-1.430 (NS)	-1.658 (NS)	-1.797 (NS)	0.469 (-0.726)
	CP	-1.600 (NS)	-1.874 (NS)	-2.031 (NS)	0.269 (-1.111)
	NSP	-1.678 (NS)	-1.881 (NS)	-2.039 (NS)	0.209 (-1.262)
	MP	-2.106 (P < 0.001)	-2.496 (P < 0.02)	-2.708 (P < 0.02)	0.000 (-4.210)
ToCmMV (Coimbra)	Rep	-0.853 (NS)	0.213 (NS)	-0.083 (NS)	0.014 (-2.525)
	Trap	-0.086 (NS)	1.018 (NS)	0.830 (NS)	0.124 (-1.549)
	Ren	-0.053 (NS)	1.427 (P < 0.05)	1.183 (NS)	0.281 (-1.846)
	CP	-0.809 (NS)	0.887 (NS)	0.496 (NS)	0.000 (-4.211)
	NSP	1.197 (NS)	1.171 (NS)	1.330 (NS)	0.000 (-4.308)
	MP	0.326 (NS)	1.144 (NS)	1.062 (NS)	0.000 (-3.999)

4.1.2. Testes para detectar migração

A taxa de migração (M) entre as duas subpopulações de ToCmMV foi estimada por meio de simulação com o método de Cadeia de Markov - Monte Carlo (MCMC). As taxas de migração observadas entre as subpopulações de Coimbra e Paty do Alferes foram baixas, de aproximadamente 0,1 e 0,35 indivíduos por geração quando estimadas para o DNA-A e DNA-B, respectivamente (Figura 4). Em conjunto com os resultados que indicam maior diversidade nucleotídica e haplotípica na subpopulação de Coimbra, esses resultados sugerem a possibilidade de estar ocorrendo migração do ToCmMV no sentido de Coimbra para Paty do Alferes. Isso é consistente com a presença do vírus há um mais tempo na região de Coimbra do que na região de Paty do Alferes. Entretanto, análises mais detalhadas serão necessárias para confirmar esta hipótese.

DNA-A



DNA-B

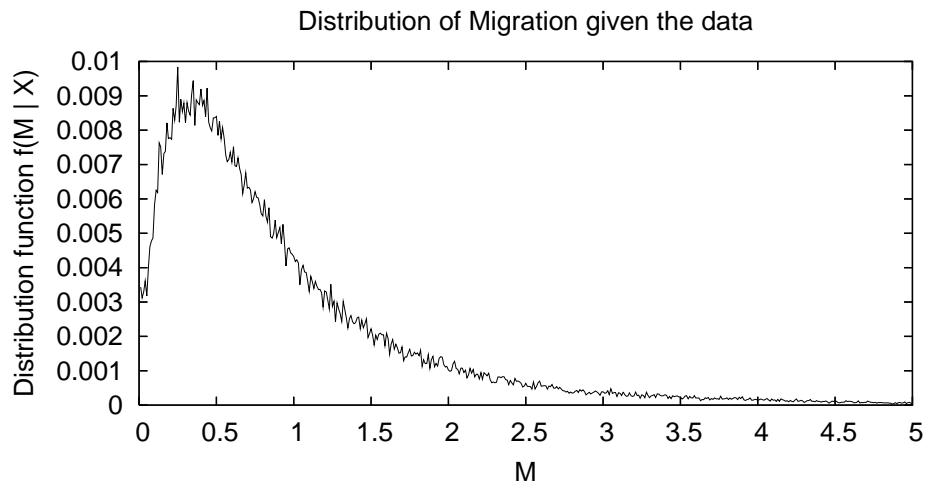


Figura 4. Função de distribuição da taxa de migração (M) em função dos dados. Frequência de valores de M entre as subpopulações de Paty do Alferes e Coimbra, estimada para o DNA-A e para o DNA-B do ToCmMV.

CONCLUSÕES

As diversas análises realizadas permitem concluir que existe uma grande diversidade de espécies de begomovírus infectando tomateiro e plantas daninhas nas duas regiões amostradas. Além disso, a variabilidade genética das populações de ToYVSV e ToCmMV também é significativa.

A detecção de seis novas espécies virais a partir de 56 amostras ressalta a diversidade genética de begomovírus no Brasil. Embora algumas espécies tenham se tornado prevalentes no campo, a emergência de novas espécies continua a ocorrer. O ToYVSV foi a espécie predominante em Paty do Alferes, mas não em Coimbra, onde apenas o ToCmMV foi detectado em tomateiros. Além disso, a detecção de três novas espécies em plantas daninhas reforça a hipótese de que essas plantas são um reservatório natural de begomovírus. A existência de relacionamento filogenético entre vírus detectados em tomateiro e vírus presentes em plantas daninhas corrobora a hipótese de que os vírus atualmente presentes no tomateiro foram originados a partir de vírus presentes nas plantas silvestres ou daninhas.

A análise da estrutura genética das populações de ToYVSV e ToCmMV indica maior variabilidade genética do ToCmMV. Além disso, a comparação das subpopulações de Coimbra e Paty do Alferes do ToCmMV indica maior variabilidade em Coimbra. Considerando-se que a presença de begomovírus na região de Coimbra vem sendo constatada desde 2001, ao passo que em Paty do Alferes ocorreu apenas em 2005, os resultados obtidos

são consistentes com a introdução recente das populações virais em Paty do Alferes, seguido de rápida expansão populacional. Em Coimbra, o vírus e seu hospedeiro vêm co-evoluindo há mais tempo.

Análises posteriores investigarão a existência de eventos de recombinação entre os diferentes vírus encontrados, bem como o relacionamento filogeográfico entre as espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ambrozevicius, L.P., Calegario, R.F., Fontes, E.P.B., Carvalho, M.G. e Zerbini, F.M. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v.27, p.372-377. 2002.
- Andrade, E.C., Manhani, G.G., Alfenas, P.F., Calegario, R.F., Fontes, E.P.B. e Zerbini, F.M. *Tomato yellow spot virus*, a tomato-infecting begomovirus from Brazil with a closer relationship to viruses from *Sida* sp., forms pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from *Sida*. *Journal of General Virology*, v.87, p.3687-3696. 2006.
- Bedford, I.D., Briddon, R.W., Brown, J.K., Rosell, R.C. e Markham, P.G. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographical regions. *Annals of Applied Biology*, v.125, p.311-325. 1994.
- Bezerra, I.C., Lima, M.F., Ribeiro, S.G., Giordano, L.B., Zerbini, F.M. e Ávila, A.C. Occurrence of geminivirus in tomato-producing areas in Submédio São Francisco. *Fitopatologia Brasileira*, v.22, p.331. 1997.
- Briddon, R.W. Cotton leaf curl disease, a multicomponent begomovirus complex. *Molecular Plant Pathology*, v.4, p.427-434. 2003.
- Calegario, R.F., Ferreira, S.S., Andrade, E.C. e Zerbini, F.M. Characterization of *Tomato yellow spot virus*, (ToYSV), a novel tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.42, p.1335-1343. 2007.
- Castillo-Urquiza, G.P., Beserra Junior, J.E.A., Alfenas-Zerbini, P., Varsani, A., Lima, A.T.M., Barros, D.R. e Zerbini, F.M. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato in Paty do Alferes, Rio de Janeiro state, Brazil. *Virus Reviews and Research*, v.12, p.233. 2007.
- Cotrim, M.A., Krause-Sakate, R., Narita, N., Zerbini, F.M. e Pavan, M.A. Diversidade genética de begomovirus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. *Summa Phytopathologica*, v.33, p.300-303. 2007.
- Czosnek, H. e Laterrot, H. A worldwide survey of tomato yellow leaf curl viruses. *Archives of Virology*, v.142, p.1391-1406. 1997.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. e Hicks, J.B. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.1, p.19-21. 1983.

- Delatte, H., Holota, H., Moury, B., Reynaud, B., Lett, J.M. e Peterschmitt, M. Evidence for a founder effect after introduction of Tomato yellow leaf curl virus-Mild in an insular environment. *Journal of Molecular Evolution*, v.65, p.112-118. 2007.
- Excoffier, L., Laval, G. e Schneider, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, v.1, p.47-50. 2005.
- 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, p.423. 1997.
- Fernandes, F.R., Albuquerque, L.C., Giordano, L.B., Boiteux, L.S., Ávila, A.C. e Inoue-Nagata, A.K. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes*, v.36, p.251-258. 2008.
- Fernandes, J.J., Carvalho, M.G., Andrade, E.C., Brommonschenkel, S.H., Fontes, E.P.B. e Zerbini, F.M. Biological and molecular properties of Tomato rugose mosaic virus (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Plant Pathology*, v.55, p.513-522. 2006.
- Font, M.I., Rubio, L., Martinez-Culebras, P.V. e Jorda, C. Genetic structure and evolution of natural populations of viruses causing the tomato yellow leaf curl disease in Spain. *Virus Research*, v.128, p.43-51. 2007.
- Galvão, R.M., Fernandes, A.V., Almeida, J.D., Alfenas, P.F., Andrade, E.C. e Fontes, E.P.B. Molecular characterization of two new tomato-infecting geminiviruses and the *Sida*-infecting geminiviruses complex from Brazil. *International Workshop on Bemisia and Geminiviral diseases*. San Juan - Puerto Rico, 1998. L-93 p.
- Garcia-Arenal, F., Fraile, A. e Malpica, J.M. Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology*, v.39, p.157-186. 2001.
- Ge, L., Zhang, J., Zhou, X. e Li, H. Genetic structure and population variability of tomato yellow leaf curl China virus. *Journal of Virology*, v.81, p.5902-5907. 2007.
- Haible, D., Kober, S. e Jeske, H. Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. *Journal of Virological Methods*, v.135, p.9-16. 2006.
- Inoue-Nagata, A.K., Albuquerque, L.C., Rocha, W.B. e Nagata, T. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi 29 DNA polymerase. *Journal of Virological Methods*, v.116, p.209-211. 2004.
- Inoue-Nagata, A.K., Martin, D.P., Boiteux, L.S., Giordano, L.D., Bezerra, I.C. e De Avila, A.C. New species emergence via recombination among isolates of the Brazilian tomato infecting Begomovirus complex. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.41, p.1329-1332. 2006.
- Isnard, M., Granier, M., Frutos, R., Reynaud, B. e Peterschmitt, M. Quasispecies nature of three maize streak virus isolates obtained through different modes of selection from a population used to assess response to infection of maize cultivars. *Journal of General Virology*, v.79, p.3091-3099. 1998.
- Jones, R.A.C. Using epidemiological information to develop effective integrated virus disease management strategies. *Virus Research*, v.100, p.5-30. 2004.
- Lima, A.T.M., Pereira, C.O., Alfenas, P.F., Paula, M.B., Mello, R.N. e Zerbini, F.M. Primeiro relato de infecção pelo geminivírus *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) em tomateiro no estado de Santa Catarina. *Fitopatologia Brasileira*, v.31(Suplemento), p.S224. 2006.

- Lin, H.X., Rubio, L., Smythe, A.B. e Falk, B.W. Molecular population genetics of Cucumber mosaic virus in California: Evidence for founder effects and reassortment. *Journal of Virology*, v.78, p.6666-6675. 2004.
- Lourenção, A.L. e Nagai, H. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. *Bragantia*, v.53, p.53-59. 1994.
- Melo, P.C.T. Mosca branca ameaça produção de hortaliças. Campinas, SP, Brazil: Asgrow do Brasil Sementes Ltda., Technical Bulletin 1992.
- Monci, F., Sanchez-Campos, S., Navas-Castillo, J. e Moriones, E. A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Virology*, v.303, p.317-326. 2002.
- Morales, F.J. e Anderson, P.K. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology*, v.146, p.415-441. 2001.
- Morales, F.J. e Jones, P.G. The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. *Virus Research*, v.100, p.57-65. 2004.
- Moreno, I.M., Malpica, J.M., Diaz-Pendon, J.A., Moriones, E., Fraile, A. e Garcia-Arenal, F. Variability and genetic structure of the population of watermelon mosaic virus infecting melon in Spain. *Virology*, v.318, p.451-460. 2004.
- Nakhla, M.K., Maxwell, D.P., Martinez, R.T., Carvalho, M.G. e Gilbertson, R.L. Widespread occurrence of eastern Mediterranean "strain" of tomato yellow leaf curl geminivirus in tomatoes in the Dominican Republic. *Plant Disease*, v.78, p.926. 1994.
- Nielsen, R. e Wakeley, J. Distinguishing migration from isolation: A Markov chain Monte Carlo approach. *Genetics*, v.158, p.885-896. 2001.
- Nutter, F.W. Quantifying the temporal dynamics of plants virus epidemics: a review. *Crop Protection*, v.16, p.603-618. 1997.
- Pinel, A., Abubakar, Z., Traore, O., Konate, G. e Fargette, D. Molecular epidemiology of the RNA satellite of Rice yellow mottle virus in Africa. *Archives of Virology*, v.148, p.1721-1733. 2003.
- Pita, J.S., Fondong, V.N., Sangare, A., Otim-Nape, G.W., Ogwal, S. e Fauquet, C.M. Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. *Journal of General Virology*, v.82, p.655-665. 2001.
- Polston, J.E. e Anderson, P.K. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Disease*, v.81, p.1358-1369. 1997.
- Resende, R.O. e Cupertino, F.P. Doenças causadas por vírus em tomateiro. *Informe Agropecuário*, v.18, p.19-27. 1996.
- Rezende, W.L., Militão Neto, V., Goulart, L.R., Giovanini, M.P., Juliatti, F.C. e Fernandes, J.J. Infecção mista em plantas de tomate infectadas por geminivírus, detectada por meio de LIS-SSCP-PCR. *Fitopatologia Brasileira*, v.22, p.338. 1997.
- Ribeiro, S.G., Ambrozevicus, L.P., Ávila, A.C., Bezerra, I.C., Calegario, R.F., Fernandes, J.J., Lima, M.F., Mello, R.N., Rocha, H. e Zerbini, F.M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology*, v.148, p.281-295. 2003.

- Ribeiro, S.G., Bezerra, I.C., Lima, M.F., Ávila, A.C. e Giordano, L.B. Occurrence of geminivirus in tomato plants in Bahia. VIII Encontro Nacional de Virologia (Resumos). São Lourenço, MG: SBV, 1996. 290 p.
- Ribeiro, S.G., Martin, D.P., Lacorte, C., Simões, I.C., Orlandini, D.R.S. e Inoue-Nagata, A.K. Molecular and biological characterization of Tomato chlorotic mottle virus suggests that recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses. *Phytopathology*, v.97, p.702-711. 2007.
- Ribeiro, S.G., Mello, L.V., Boiteux, L.S., Kitajima, E.W. e Faria, J.C. Tomato infection by a geminivirus in the Federal District, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v.19, p.330. 1994.
- Rodriguez-Cerezo, E. e Garcia-Arenal, F. Genetic heterogeneity of the RNA genome population of the plant virus U5-TMV. *Virology*, v.170, p.418-423. 1989.
- Rojas, M.R., Gilbertson, R.L., Russell, D.R. e Maxwell, D.P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease*, v.77, p.340-347. 1993.
- Rozas, J., Sánchez-Delbarrio, J.C., Messeguer, X. e Rozas, R. DnaSP: DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, v.19, p.2496-2497. 2003.
- Rybicki, E.P. A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of Geminiviridae. *Archives of Virology*, v.139, p.49-77. 1994.
- Sacristan, S., Fraile, A. e Garcia-Arenal, F. Population dynamics of Cucumber mosaic virus in melon crops and in weeds in Central Spain. *Phytopathology*, v.94, p.992-998. 2004.
- Santos, C.D.G., Ávila, A.C., Inoue-Nagata, A.K. e Resende, R.O. Espécies vegetais hospedeiras de begomovírus isolados de tomateiro em Goiás e no Distrito Federal. *Fitopatologia Brasileira*, v.29, p.450-455. 2004.
- Sanz, A.I., Fraile, A., Gallego, J.M., Malpica, J.M. e García-Arenal, F. Genetic variability of natural populations of cotton leaf curl geminivirus, a single-stranded DNA virus. *Journal of Molecular Evolution*, v.49, p.672-681. 1999.
- Sawangjit, S., Chatchawanphanich, O., Chiemsombat, P., Attathom, T., Dale, J. e Attathom, S. Molecular characterization of tomato-infecting begomoviruses in Thailand. *Virus Research*, v.109, p.1-8. 2005.
- Seal, S.E., Jeger, M.J. e Van Den Bosch, F. Begomovirus evolution and disease management. *Advances in Virus Research*, v.67, p.297-316. 2006.
- Stanley, J., Bisaro, D.M., Briddon, R.W., Brown, J.K., Fauquet, C.M., Harrison, B.D., Rybicki, E.P. e Stenger, D.C. Family *Geminiviridae*. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. e Ball, L.A. (Ed.). *Virus Taxonomy*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p.301-326.
- Stenger, D.C. e McMahon, C.L. Genotypic diversity of beet curly top virus populations in the western United States. *Phytopathology*, v.87, p.737-744. 1997.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. e Kumar, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, v.24, p.1596-1599. 2007.
- Weir, B.S. *Genetic data analysis II: Methods for discrete population genetic data*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associated Inc. 1996. 445 p.
- Were, H.K., Winter, S. e Maiss, E. Viruses infecting cassava in Kenya. *Plant Disease*, v.88, p.17-22. 2004.

- Zerbini, F.M., Andrade, E.C., Barros, D.R., Ferreira, S.S., Lima, A.T.M., Alfenas, P.F. e Mello, R.N. Traditional and novel strategies for geminivirus management in Brazil. *Australasian Plant Pathology*, v.34, p.475-480. 2005.
- Zerbini, F.M., Zambolim, E.M., Fernandes, J.J., Gilbertson, R.L. e Carrijo, I.V. Um novo geminivírus isolado de tomateiro (*L. esculentum*) em Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira*, v.21, p.430. 1996.