

**PEDRO PAULO FERREIRA LEMOS**

**GENETIC VARIABILITY OF *Euphorbia yellow mosaic virus* AND *Macrotidium yellow vein virus* IN THEIR RESPECTIVE NATURAL HOSTS, *Euphorbia heterophylla* AND *Macrotidium lathyroides***

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

L557g  
2013

Lemos, Pedro Paulo Ferreira, 1988-  
Genetic variability of *Euphorbia yellow mosaic virus* and  
*Macrotidium yellow vein virus* in their respective natural hosts,  
*Euphorbia heterophylla* and *Macrotidium lathyroides* / Pedro  
Paulo Ferreira Lemos. – Viçosa, MG, 2013.  
viii, 90f. : il. (algumas color.) ; 29cm.

Texto em português e inglês.

Orientador: Francisco Murilo Zerbini Júnior.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Begomovírus. 2. Sementes. 3. Genética. I. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Programa de  
Pós-Graduação em Fitopatologia. II. Título.

CDD 22. ed. 571.9928

**PEDRO PAULO FERREIRA LEMOS**

**GENETIC VARIABILITY OF *Euphorbia yellow mosaic virus* AND *Macrotidium yellow vein virus* IN THEIR RESPECTIVE NATURAL HOSTS, *Euphorbia heterophylla* AND *Macrotidium lathyroides***

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

APROVADA: 15 de março de 2013.

---

Pesq. Gloria Patricia Castillo Urquiza

Prof. Poliane Alfnas Zerbini

---

Prof. Francisco Murilo Zerbini Junior  
(Orientador)

## **AGRADECIMENTOS**

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

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do Curso.

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

Ao professor Francisco Murilo Zerbini, pela orientação, oportunidade, amizade e por todos os ensinamentos.

Aos meus amigos do Laboratório de Virologia Vegetal Molecular e do Departamento de Fitopatologia.

A todos os amigos e familiares, que de alguma forma, contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal. E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vii
Introdução Geral .....	1
Revisão de Literatura.....	6
1. Família <i>Geminiviridae</i> .....	6
2. Replicação viral .....	9
3. Movimento do vírus na planta .....	11
4. Evolução dos geminivírus.....	14
5. Variabilidade e estrutura genética de populações de geminivírus.....	17
5.1. Mutação.....	17
5.2. Recombinação .....	20
5.3. Pseudo-recombinação .....	22
5.4. Estrutura genética de populações de geminivírus .....	25
6. Diversidade de begomovírus infectando plantas cultivadas e invasoras no Brasil .....	28
7. Begomovírus em amendoim-bravo ( <i>Euphorbia heterophylla</i> ).....	33
8. Begomovírus em figo-de-pombo ( <i>Macroptilium lathyroides</i> ) .....	35
Referências bibliográficas .....	41
Capítulo 1. Genetic variability of <i>Euphorbia yellow mosaic virus</i> and <i>Macroptilium yellow vein virus</i> in their respective natural hosts, <i>Euphorbia heterophylla</i> and <i>Macroptilium lathyroides</i> . .....	61
Abstract.....	63
Introduction.....	64
Material and Methods .....	67
Sample collection and storage.....	67
DNA amplification and cloning.....	68
Sequence comparisons and phylogenetic analysis.....	68
Recombination analysis .....	69
General descriptors of the genetic structure of viral populations .....	69
Detection of positive and negative selection at amino acid sites.....	70
Results.....	70
Viral detection and sequence comparisons .....	70
Genetic variability of EuYMV and MaYVV population.....	70

Selection analysis .....	71
Phylogenetic analysis .....	71
Intra- and inter-specific recombination analysis .....	72
Discussion .....	73
References .....	76
Figure legends .....	86

## RESUMO

LEMOS, Pedro Paulo Ferreira, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, março de 2013. **Genetic variability of *Euphorbia yellow mosaic virus* and *Macrotidium yellow vein virus* in their respective natural hosts, *Euphorbia heterophylla* and *Macrotidium lathyroides*.** Orientador: Francisco Murilo Zerbini Júnior.

Os begomovírus (gênero *Begomovirus*, família *Geminiviridae*) são um grupo vírus de plantas de grande importância econômica causando sérias perdas em diversas culturas tropicais e subtropicais. Acredita-se que a emergência dos begomovírus presentes no Brasil se deu por meio da transferência horizontal de vírus anteriormente restritos a plantas silvestres e invasoras para plantas cultivadas mediada pelo biótipo B de *Bemisia tabaci*. A maioria dos trabalhos realizados até o presente tiveram enfoque na caracterização molecular dos begomovírus e pouco se sabe sobre a variabilidade genética das populações destes no campo. O estudo desta variabilidade é importante para entender como os vírus evoluem no sentido de serem adotadas estratégias para o desenvolvimento de cultivares com resistência durável. Neste trabalho foi investigada a variabilidade genética de dois begomovírus encontrados em plantas invasoras, *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV) e *Macrotidium yellow vein virus* (MaYVV), que infectam *Euphorbia heterophylla* e *Macrotidium lathyroides*, respectivamente. Os resultados, baseados em 19 sequências de EuYMV e 18 de MaYVV obtidas de amostras coletadas em 2011 e 2012, reforçam a hipótese de que a estrutura genética de begomovírus pode ser modulada pelo hospedeiro por processos comuns de seleção, mutação e recombinação. Foram observados diferentes graus de variabilidade genética entre os dois vírus. O EuYMV apresentou maior variabilidade, semelhante a outros begomovírus que infectam plantas não cultivadas, enquanto o MaYVV apresentou baixa variabilidade. A diversidade nucleotídica do EuYMV (0,00819) foi aproximadamente quatro vezes mais elevada do que a do MaYVV (0,00197). A frequência de mutação do EuYMV ( $2,5 \times 10^{-3}$ ) foi superior à do MaYVV ( $4,2 \times 10^{-4}$ ). Esta diferença foi suportada

pela maior diversidade nucleotídica de todos os genes do EuYMV em comparação ao MaYVV: *CP* (aprox. três vezes maior), *Rep* (sete vezes), *Trap* (32 vezes), *Ren* (quatro vezes), *AC4* (oito vezes). Esses resultados indicam que a maior variabilidade genética de EuYMV pode ser explicada, principalmente, pelo gene *Trap*. A menor variabilidade observada para o MaYVV pode ser devido à sua provável emergência recente em comparação ao EuYMV, relatado desde a década de 1950 no Brasil.

## ABSTRACT

LEMOS, Pedro Paulo Ferreira, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, March, 2013. **Genetic variability of *Euphorbia yellow mosaic virus* and *Macropodium yellow vein virus* in their respective natural hosts, *Euphorbia heterophylla* and *Macropodium lathyroides*.** Adviser: Francisco Murilo Zerbini Júnior.

Begomoviruses (genus *Begomovirus*, family *Geminiviridae*) comprise a group of plant viruses of great economic importance causing serious economic losses in tropical and subtropical crops. It is believed that the emergence of begomoviruses in Brazil occurred through horizontal transfer of viruses previously restricted to non-cultivated plants by the B biotype of *Bemisia tabaci*. Little is known about the genetic variability of weed-infecting begomoviruses. The study of this variability is important to understand how viruses evolve in order to adopt strategies for the development of crop cultivars with durable resistance. In this study we investigated the genetic variability of two weed-infecting begomoviruses, *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV) and *Macropodium yellow vein virus* (MaYVV), which infect *Euphorbia heterophylla* and *Macropodium lathyroides*, respectively. Our results, based on 19 DNA-A sequences of EuYMV and 18 of MaYVV obtained from samples collected in 2011 and 2012, support the hypothesis that the genetic structure of begomoviruses can be modulated by their hosts by common processes of selection, mutation and recombination. We observed distinct degrees of genetic variability between the two viruses. EuYMV presented a higher variability, similar to other weed-infecting begomoviruses, while MaYVV presented a lower variability. The nucleotide diversity of EuYMV (0.00819) was four-fold higher than that of MaYVV (0.00197). The mutation frequency of EuYMV ( $2.5 \times 10^{-3}$ ) was higher than that of MaYVV ( $4.2 \times 10^{-4}$ ). This difference was supported by the higher nucleotide diversity of all genes of EuYMV compared to MaYVV: *CP* (~three-fold), *Rep* (~seven-fold), *Trap* (~32-fold), *Ren* (~four-fold), *AC4* (~eight-fold). Therefore the higher variability of EuYMV can be explained mostly by the *Trap* gene. The lower

diversity observed for MaYVV could be due to its recent emergence compared to EuYMV, reported since the 1950's in Brazil.

## INTRODUÇÃO GERAL

A família *Geminiviridae* engloba vírus com genoma composto por uma ou duas moléculas de DNA circular de fita simples, encapsidados em uma partícula icosaédrica geminada. 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 possuem um ou dois componentes genômicos, infectam plantas dicotiledôneas e são transmitidos naturalmente pela mosca-branca *Bemisia tabaci* (Homoptera:Aleyrodidae). Os begomovírus do "Velho Mundo" (Europa, Ásia e África) apresentam um ou dois componentes genômicos e frequentemente estão associados a DNAs satélites (Mansoor *et al.*, 2003). Por outro lado, begomovírus encontrados no "Novo Mundo" (Américas) apresentam dois componentes genômicos (denominados DNA-A e DNA-B), e até recentemente acreditava-se que não estavam associados a DNAs satélites. Entretanto, dois trabalhos recentes relataram a associação entre begomovírus e alfassatélites no Brasil e na Venezuela (Paprotka *et al.*, 2010c; Romay *et al.*, 2010).

Os begomovírus possuem grande importância econômica, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, e constituem sérios problemas à agricultura nestas regiões (Morales e Anderson, 2001; Monci *et al.*, 2002; Briddon, 2003; Were *et al.*, 2004). No Brasil, a incidência e os danos causados por *B. tabaci* aumentaram exponencialmente a partir da década de 70, em associação ao grande aumento da área plantada com soja. A soja é um excelente hospedeiro de *B. tabaci*, e sofre poucos danos com a presença da praga. A não adoção de medidas de controle permite que as

populações de insetos atinjam níveis elevados, com a posterior migração para outras plantas após a colheita da soja. Esse contexto levou à disseminação do begomovírus *Bean golden mosaic virus* (BGMV), agente causal do mosaico dourado do feijoeiro, em plantios de feijoeiro próximos a cultivos de soja (Costa, 1975). O mosaico dourado continua causando grandes prejuízos à cultura do feijoeiro em pelo menos 12 países da América Latina (Faria *et al.*, 2000; Morales e Anderson, 2001).

No Brasil, as culturas mais severamente afetadas pelos begomovírus tem sido o feijoeiro e o tomateiro (Faria e Maxwell, 1999; Zerbini *et al.*, 2005). Embora existam relatos de infecção por begomovírus em outras culturas importantes como a soja (Mello *et al.*, 2000; Mello *et al.*, 2002) e o pimentão (Nozaki *et al.*, 2005), esses tem ocorrido esporadicamente nas áreas de cultivo, não sendo considerados fatores limitantes à produção.

O primeiro relato de begomovírus 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 ocorria porque o biótipo A de *B. tabaci*, o único presente no país naquela época, coloniza o tomateiro com baixa eficiência (Bedford *et al.*, 1994). No entanto, no início da década de 1990 um complexo de begomovírus surgiu em tomateiro no Brasil, coincidindo com a introdução e disseminação do biótipo B de *B. tabaci*, biótipo que coloniza uma maior gama de hospedeiros (Ambrozevicius *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2003).

Acredita-se que a emergência dos begomovírus que infectam plantas cultivadas no Brasil seja resultado da transferência de vírus nativos que infectam plantas silvestres ou invasoras pelo biótipo B da mosca-branca. Possivelmente estas espécies presentes

em um novo hospedeiro evoluíram rapidamente via recombinação e pseudo-recombinação, dando origem às espécies atualmente detectadas no campo. A predominância de algumas espécies poderia ser devido a diferenças na adaptação ao novo hospedeiro ou diferenças na eficiência de transmissão pelo inseto vetor. A presença de diversas espécies no campo, todas transmitidas pelo mesmo inseto vetor, torna comum a ocorrência de infecções mistas (dois ou mais vírus presentes simultaneamente na mesma planta), aumentando a probabilidade da ocorrência de eventos de recombinação e pseudo-recombinação, o que pode levar ao surgimento de espécies melhor adaptadas ao hospedeiro (Pita *et al.*, 2001; Monci *et al.*, 2002; Andrade *et al.*, 2006a; Inoue-Nagata *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007).

Além das plantas cultivadas, muitas espécies silvestres e/ou invasoras têm sido relatadas como hospedeiras de begomovírus em vários países, incluindo o Brasil (Idris *et al.*, 2003b; Jovel *et al.*, 2004; Varsani *et al.*, 2009; Fiallo-Olivé *et al.*, 2010; Mubin *et al.*, 2010). As espécies silvestres mais comumente relatadas como hospedeiras pertencem às famílias Malvaceae, Euphorbiaceae e Fabaceae (Morales e Anderson, 2001). Alguns estudos demonstraram que begomovírus provenientes de plantas invasoras podem ser transmitidos para espécies cultivadas pelo inseto vetor ou mediante inoculação via extrato vegetal tamponado (Frischmuth *et al.*, 1997; Faria *et al.*, 2000; Morales e Anderson, 2001; Castillo-Urquiza *et al.*, 2007; Cotrim *et al.*, 2007).

No Brasil já foram realizados alguns estudos com o objetivo de caracterizar molecularmente isolados de begomovírus que infectam plantas silvestres e daninhas, sobretudo em associação às culturas do feijoeiro e do tomateiro (Ribeiro *et al.*, 1998; Faria e Maxwell, 1999; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008). Os resultados desses estudos revelaram que a variabilidade genética é alta entre os isolados de begomovírus que infectam plantas invasoras, maior do que em plantas cultivadas (Ambrozevicius *et al.*,

2002; Calegario, 2004; Castillo-Urquiza, 2008). Estudos sobre a distribuição e prevalência de diferentes espécies de vírus fornecem informações úteis para programas de melhoramento na busca de fontes de resistência duráveis. A estrutura genética de uma população reflete a história evolutiva e o potencial dessa população para evoluir (Pinel *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2004; Font *et al.*, 2007). O grau de variabilidade genética representa o potencial de um dado organismo em se adaptar ao ambiente. 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 (Seal *et al.*, 2006a).

No caso dos begomovírus esses estudos foram inicialmente baseados na amplificação de fragmentos do genoma viral via PCR, o que limitava a análise a espécies virais já caracterizadas. O desenvolvimento da técnica de amplificação por círculo rolante ("rolling-circle amplification", RCA; (Inoue-Nagata *et al.*, 2004), acoplado à grande redução nos custos do sequenciamento de DNA, permitiu a clonagem e o sequenciamento de um grande número de genomas virais completos em um curto espaço de tempo, sem a necessidade de conhecimento prévio da sequência do genoma viral. Dessa forma, a análise genética de populações virais foi enormemente facilitada, não apenas em hospedeiros cultivados como o tomateiro, mas também em hospedeiros silvestres (Haible *et al.*, 2006).

Embora diversos trabalhos nesse sentido já tenham sido realizados a partir de plantas cultivadas (Owor *et al.*, 2007; Castillo-Urquiza, 2008; Varsani *et al.*, 2008; Harkins *et al.*, 2009; Varsani *et al.*, 2009), estudos em hospedeiros silvestres ainda são escassos. Estes hospedeiros podem atuar como fonte de inóculo e fonte de variabilidade genética para o surgimento de novas espécies que infectam plantas cultivadas (Idris *et*

*al.*, 2003b; Jovel *et al.*, 2004; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008) podendo, portanto, contribuir para epidemias em hospedeiros cultivados.

Plantas daninhas como *Euphorbia heterophylla* e *Macroptilium lathyroides* são frequentemente encontradas associadas a plantios de feijoeiro nos estados de Alagoas e Goiás, respectivamente (Fernandes *et al.*, 2011; Tavares *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2013). Begomovírus que infectam estas espécies tem sido relatados e descritos desde o final da década de 80 na América Central e Caribe (Jaramillo e Lastra, 1996; Roye *et al.*, 1997).

No Brasil foi descrita recentemente uma espécie de begomovírus infectando *E. heterophylla*, o *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV) (Fernandes *et al.*, 2012), e três espécies infectando *M. lathyroides*, *Macroptilium yellow vein virus* (MaYVV), *Macroptilium yellow spot virus* (MaYSV) e *Macroptilium yellow net virus* (MaYNV) (Silva *et al.*, 2012). A análise da estrutura genética da população de MaYSV no estado de Alagoas revelou que esta espécie apresenta uma grande variabilidade, sendo maior do que em populações de begomovírus em plantas cultivadas (Lima *et al.*, 2013). Estudos da variabilidade genética de begomovírus fornecem importantes dados para a adoção de medidas de controle baseadas no melhoramento genético visando a maior durabilidade da resistência. Se o alvo da resistência for um gene com baixa variabilidade em populações de begomovírus, possivelmente esta resistência será mais durável. Entender a variabilidade genética dos vírus e de seus genes, portanto, é um primeiro passo para estabelecer quais genes virais devem ser utilizados como alvos para programas de melhoramento genético.

Este trabalho teve como objetivo determinar a variabilidade genética de populações dos begomovírus EuYMV e MaYVV infectando as plantas daninhas *Euphorbia heterophylla* e *Macroptilium lathyroides* associadas à cultura do feijoeiro nos estados de Alagoas e Goiás.

## REVISÃO DE LITERATURA

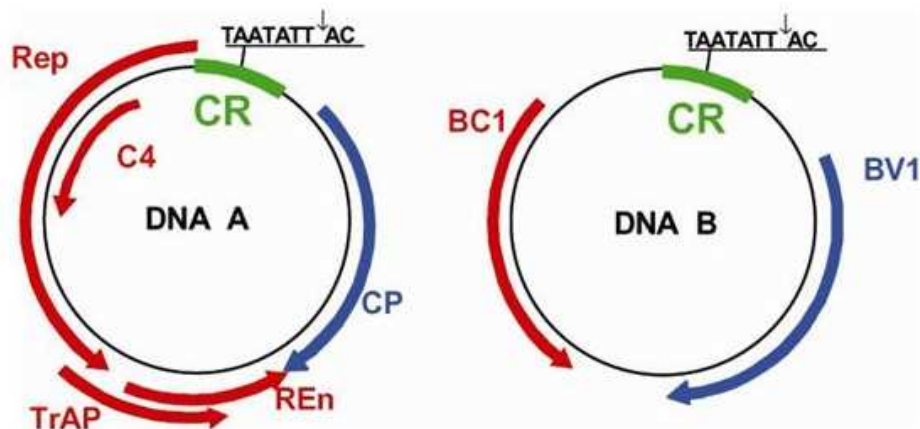
### 1. Família *Geminiviridae*

Os vírus pertencentes à família *Geminiviridae* apresentam genoma composto de DNA de fita simples (ssDNA) circular encapsidado em um capsídeo icosaédrico geminado. A família é dividida em quatro gêneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus*, com base no tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros, organização genômica e relacionamento filogenético (Stanley *et al.*, 2005). O gênero *Mastrevirus* inclui os geminivírus com um componente genômico, transmitidos por diversas espécies de cigarrinhas (Homoptera: Cicadellidae) a plantas monocotiledôneas. A espécie-tipo é o *Maize streak virus* (MSV), um vírus economicamente importante para a cultura do milho (*Zea mays*). No gênero *Curtovirus* estão incluídos os geminivírus com um componente genômico, transmitidos por cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) a plantas dicotiledôneas. O *Beet severe curly top virus* (BSCTV) é a espécie-tipo e o mais importante economicamente. O gênero *Topocuvirus* possui uma única espécie, o *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV), com um componente genômico, transmitido pela cigarrinha *Micrutalis malleifera* (Homoptera: Auchenorrhyncha) a plantas dicotiledôneas. O gênero *Begomovirus* engloba espécies com um ou dois componentes genômicos, transmitidas pela mosca-branca *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) a plantas dicotiledôneas (Stanley *et al.*, 2005). A espécie-tipo é o *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) (Fauquet *et al.*, 2008).

Os begomovírus do "Velho Mundo" (Europa, Ásia e África) possuem em sua maioria um componente genômico (monossegmentados), e estão frequentemente associados a moléculas de ssDNA circular conhecidas como DNA-1 (alfassatélites) e DNA  $\beta$  (betassatélites) (Bridson, 2003; Bridson e Stanley, 2006). Os alfassatélites são

semelhantes ao componente genômico denominado DNA-R dos nanovírus, os quais contêm uma ORF que codifica uma proteína associada à replicação (Rep), seguida de uma região rica em adenina e uma estrutura em forma de grampo que inclui a origem de replicação (Idris *et al.*, 2005). Os alfassatélites podem replicar autonomamente, mas requerem um vírus auxiliar para infecção sistêmica da planta e transmissão por inseto (Saunders e Stanley, 1999; Saunders *et al.*, 2000; Saunders *et al.*, 2002). Recentemente alfassatélites foram identificados no Brasil e na Venezuela associados aos begomovírus bissegmentados *Cleome leaf crumple virus* (CILCrV), *Euphorbia mosaic virus* (EuMV) e *Melon chlorotic mosaic virus* (MeCMV), sendo esses os primeiros relato de alfassatélites associados a begomovírus ocorrendo naturalmente no "Novo Mundo" (Américas) (Paprotka *et al.*, 2010c; Romay *et al.*, 2010). Os betassatélites dependem do vírus auxiliar para replicação e movimento sistêmico na planta. Seu genoma contém uma ORF, betaC1, que codifica uma proteína responsável pela indução de sintomas e que atua como supressora do silenciamento gênico pós-transcricional (Cui *et al.*, 2004; Cui *et al.*, 2005; Briddon e Stanley, 2006).

Os begomovírus do Novo Mundo possuem dois componentes genômicos (bissegmentados) denominados DNA-A e DNA-B, cada um com aproximadamente 2600 nucleotídeos (Figura 1), com uma única exceção, o *Tomato leaf deformation virus* (ToLDeV), encontrado no Equador e no Peru e que possui genoma monossegmentado (Melgarejo *et al.*, 2013). Os dois componentes genômicos de uma mesma espécie viral não possuem identidade entre as suas sequências, exceto por uma região com aproximadamente 200 nucleotídeos denominada região comum (RC), que inclui a origem de replicação (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999).



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

O DNA-A dos begomovírus bissegmentados pode codificar de quatro a seis proteínas: uma proteína associada à replicação, Rep ("replication-associated protein"), 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"), fator transcricional dos genes *CP* e *NSP* e que também atua como supressora do silenciamento gênico (Sunter e Bisaro, 1992; Voinnet *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2005); a proteína Ren ("replication-enhancer protein"), fator acessório da replicação viral (Sunter *et al.*, 1990; Pedersen e Hanley-Bowdoin, 1994); e a proteína capsidial ("coat protein", CP), 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"), envolvida no movimento célula-a-célula do vírus por meio do aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas (Noueiry *et al.*, 1994), e NSP ("nuclear shuttle protein"), responsável pelo transporte do DNA através do envelope nuclear (Noueiry *et al.*, 1994; Sanderfoot *et al.*, 1996).

## **2. Replicação viral**

No processo de infecção dos geminivírus, as partículas virais são inoculadas na planta pelo inseto vetor e o genoma viral (ssDNA) se desassocia de forma espontânea do capsídeo (Lazarowitz, 1992; Palmer e Rybicki, 1998). No interior da célula o ssDNA viral é transportado para o núcleo, onde é convertido em um intermediário de fita dupla (dsDNA) denominado forma replicativa (RF). A maneira como esta conversão ocorre não é conhecida, no entanto evidências indiretas, como a necessidade de desestabilização local do dsDNA para o iniciação da replicação por círculo rolante em procariotos por "strand-nicking enzymes", indicam que é realizada por fatores do hospedeiro. A RF serve como molde para síntese dos novos componentes genômicos e também para a transcrição dos genes virais. O genoma viral é replicado via mecanismo de círculo rolante semelhante ao utilizado pelos bacteriófagos  $\phi$ X174 e M13, utilizando a RF como molde (Stenger *et al.*, 1991; Stanley, 1995).

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 nucleotídeos conservada em todas as espécies (Davies *et al.*, 1987; Lazarowitz, 1992). Nesta região se localiza uma sequência repetida e invertida

composta predominantemente por guanina e citosina, formando uma estrutura conservada em forma de grampo ("structurally-conserved element", SCE), com uma sequência 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 nesse nonanucleotídeo que ocorre a clivagem (TAATATT//AC) que inicia o processo de replicação por círculo rolante (Fontes *et al.*, 1994; Laufs *et al.*, 1995). Essa clivagem é realizada pela proteína Rep, que atua como endonuclease sítio-específica com requerimento de estrutura e sequência (Laufs *et al.*, 1995; Orozco e Hanley-Bowdoin, 1998). Na região comum encontram-se também sequências específicas para ligação da proteína Rep (Fontes *et al.*, 1992; Fontes *et al.*, 1994) e regiões promotoras da RNA polimerase 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 o TATA box do gene *Rep* e a SCE (Orozco e Hanley-Bowdoin, 1998), sendo constituído por duas sequências em repetição direta e pelo menos uma repetição invertida denominadas "iterons" (Arguello-Astorga *et al.*, 1994). 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 (Gutierrez, 1999). O reconhecimento pela proteína Rep é considerado vírus-específico (Arguello-Astorga *et al.*, 1994; Harrison e Robinson, 1999; Ramos *et al.*, 2003), de modo que a proteína só inicia a replicação de DNAs cognatos. O domínio funcional de Rep foi mapeado na sua região N-terminal e inclui o domínio de ligação a DNA, conservado em todas as proteínas Rep (Jupin, 1995; Gladfelter *et al.*, 1997; Chatterji *et al.*, 1999).

Uma vez que o reconhecimento e ligação aos iterons por Rep é específico, foi proposto que este depende da sequência de nucleotídeos dos iterons e da sequência de aminoácidos de um motivo conservado na proteína Rep denominado domínio relacionado aos iterons ("iteron-related domain", IRD) (Arguello-Astorga e Ruiz-Medrano, 2001). Porém, a replicação do DNA-B do *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) pela Rep do *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) indica que a interação entre os aminoácidos do IRD e os iterons não é a única forma de reconhecimento da origem de replicação, uma vez que tanto os iterons quanto os IRDs são diferentes entre esses dois vírus (Andrade *et al.*, 2006b). Além disso, a ausência de iterons nos DNAs satélites associados a begomovírus é uma evidência adicional de que outros fatores afetam o reconhecimento da origem de replicação pela proteína Rep (Lin *et al.*, 2003; Stanley, 2004).

### **3. Movimento do vírus na planta**

O movimento do vírus no interior do hospedeiro pode ser dividido em dois processos: movimento célula-a-célula via plasmodesmas, e movimento a longa distância, no qual o vírus atinge o sistema vascular e é transportado sistemicamente para toda a planta. Para esse fim, a partir do DNA-B dos begomovírus bissegmentados são codificadas duas proteínas relacionadas ao movimento viral, NSP e MP. Como os begomovírus replicam no núcleo da célula hospedeira, necessitam de uma etapa adicional de transporte do núcleo para o citoplasma, a qual é realizada pela proteína NSP (Palmer e Rybicki, 1998). Já a proteína MP associa-se à membrana celular e altera o limite de exclusão dos plasmodesmas, viabilizando o transporte do genoma viral (Noueiry *et al.*, 1994). Estas duas proteínas atuam de forma cooperativa para mediar o

tráfego intra- e intercelular do DNA viral (Sanderfoot e Lazarowitz, 1995), permitindo ao vírus infectar sistemicamente o hospedeiro.

Os estudos sobre o movimento viral na planta tem como base a interação física entre as proteínas de movimento MP e NSP (Rojas *et al.*, 2005b). A interação direta das proteínas MP e NSP *in vitro* foi demonstrada para o TGMV utilizando-se o sistema duplo-híbrido de levedura (Mariano *et al.*, 2004). A interação *in vitro* entre NSP e MP do *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) foi recentemente demonstrada, também utilizando-se o sistema duplo-híbrido de levedura. Nestes estudos foi identificada uma GTPase citoplasmática designada NIG (NSP-interacting GTPase), que interage com NSP de begomovírus *in vitro* e *in vivo* e promove o transporte da proteína viral do núcleo para o citoplasma, onde ela é redirecionada para a periferia da célula para interagir com MP (Carvalho *et al.*, 2008).

Dois modelos foram propostos para explicar o movimento intracelular de begomovírus (Levy e Tzfira, 2010). No primeiro modelo, denominado "couple-skating" (Kleinow *et al.*, 2008), NSP transporta ssDNA ou dsDNA do núcleo para a periferia da célula e, no citoplasma, MP atua nos plasmodesmas para facilitar o movimento célula-a-célula do complexo NSP-DNA (Sanderfoot e Lazarowitz, 1995; Frischmuth *et al.*, 2004; Frischmuth *et al.*, 2007; Kleinow *et al.*, 2008). No segundo modelo, denominado "relay-race", NSP inicialmente transporta o dsDNA do núcleo para o citoplasma. No citoplasma, o dsDNA se associa a MP, e o complexo MP-dsDNA se movimenta célula-a-célula através dos plasmodesmas (Noueiry *et al.*, 1994; Rojas *et al.*, 1998).

Seguindo o movimento célula-a-célula, o vírus atinge os plasmodesmas associados ao tecido vascular e então inicia-se o movimento a longa distância. O movimento viral a longa distância é passivo, acompanhando o fluxo de fotoassimilados dos tecidos fonte para os tecidos dreno através do sistema vascular. A grande maioria

dos vírus é transportada via floema na forma de partícula completa, atingindo, a partir do ponto de penetração, primeiramente as raízes, em seguida as folhas jovens e posteriormente a planta toda, estabelecendo uma infecção sistêmica (Jeffrey *et al.*, 1996).

Para mastrevírus, curtovírus e begomovírus monossegmentados, a proteína CP é necessária para os movimentos célula-a-célula e a longa distância (Rojas *et al.*, 2001; Gafni e Epel, 2002). Além da CP, as proteínas V2 e C4 também são necessárias para o movimento de begomovírus monossegmentados. No caso de *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), a CP é responsável pelo transporte do DNA do núcleo para o citoplasma, funcionando como uma proteína análoga a NSP dos begomovírus bissegmentados, e o movimento célula-a-célula através do plasmodesma é mediado pelas proteínas C4 e/ou V2 (Rojas *et al.*, 2001; Rojas *et al.*, 2005b). Recentemente, foi demonstrado que a proteína C4 do curtovírus *Beet severe curly top virus* (BSCTV) é capaz de se ligar de forma não específica a ssDNA e a dsDNA, é essencial para o desenvolvimento de sintomas e, quando expressa em plantas infectadas com mutantes deficientes para C4, pode complementar *in trans* o movimento sistêmico. Em conjunto, esses dados sugerem o envolvimento de C4 no movimento desse vírus (Chen *et al.*, 2010).

A proteína CP é dispensável para o estabelecimento da infecção sistêmica de begomovírus bissegmentados na maioria dos casos já estudados (Rojas *et al.*, 2005a). Tanto MP quanto NSP reconhecem o DNA viral de maneira específica com relação à forma e comprimento (Rojas *et al.*, 1998; Gilbertson *et al.*, 2003), o que elimina a necessidade da proteína capsidial para o movimento a longa distância. Raras exceções, como o begomovírus bissegmentado *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), são

capazes inclusive de infectar sistemicamente alguns hospedeiros na ausência do DNA-B cognato (Galvão *et al.*, 2003; Fontenelle *et al.*, 2007).

#### **4. 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 (Rojas *et al.*, 2005b). 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.*, 2005b).

Estudos filogenéticos propõem que os geminivírus são derivados de um ancestral comum que possuía apenas um componente, infectava monocotiledôneas e era transmitido por cigarrinhas (Rybicki, 1994; Rojas *et al.*, 2005b). Comparações de sequências entre espécies dos gêneros *Mastrevirus*, *Curtovirus* e *Begomovirus* demonstraram que as primeiras são mais divergentes entre si, o que sugere que os mastrevírus divergiram 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.

Análises filogenéticas dos betassatélites e seus begomovírus associados sugerem que o satélite e o vírus auxiliar co-evoluíram como consequência do isolamento geográfico após a separação dos continentes e adaptação ao hospedeiro (Zhou *et al.*, 2003; Rojas *et al.*, 2005b). 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*, que teria surgido após recombinação entre um curtovírus ancestral e um 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; Yazdi *et al.*, 2008; Varsani *et al.*, 2009; Briddon *et al.*, 2010a).

Atualmente, com base em análises filogenéticas do DNA-A de 212 espécies, os begomovírus estão classificados em sete diferentes grupos de acordo com sua origem geográfica ou planta hospedeira (Padidam *et al.*, 1995; Fauquet *et al.*, 2008). Os begomovírus do Velho Mundo segregam em grupos originados na África, Índia, Japão e "resto da Ásia". Entretanto, um número crescente de vírus, os quais são referidos como "outsiders", não se encaixam nesses grupos baseados em região geográfica ou hospedeira. Esses vírus são originários da Indochina, Indonésia e Austrália. Begomovírus do Novo Mundo formam grupos de acordo com a origem geográfica

(América Central ou do Sul). Duas espécies originárias do Vietnã isoladas de *Corchorus* sp. são relacionadas aos begomovírus do Novo Mundo, e formam um grupo referido como "corchovírus" (Ha *et al.*, 2006; 2008). Dois grupos de vírus, um infectando leguminosas originárias da Índia e Sudeste da Ásia ("legumovírus") e outro composto de vírus isolados de *Ipomoea* spp., particularmente batata-doce (*I. batatas*) originários da América, Ásia e Europa ("sweepovírus"), são distintos e basais a todos os demais begomovírus. A posição anômala desses begomovírus reflete uma história evolutiva distinta. Para os legumovírus foi sugerido que isto seria devido ao isolamento genético de suas espécies hospedeiras (Qazi *et al.*, 2007).

Um cenário atual para a evolução da família *Geminiviridae* foi proposto por (Nawaz-Ul-Rehman e Fauquet, 2009). Nesse, plasmídeos que replicam em algas vermelhas e outras formas de vida mais primitivas conseguiram adquirir novos genes, tornando-se independentes de seu hospedeiro e assim capazes de infectar plantas, provavelmente em primeiro lugar monocotiledôneas, como um pré-mastrevírus. Esta evolução deve ter coincidido com a aquisição da transmissão por insetos. Em algum momento eles passaram a infectar dicotiledôneas, mas ainda tinham o mesmo tipo de vetor, as cigarrinhas. Com a aquisição de novos genes tornou-se um pré-monossegmentado transmitido por mosca-branca. Esse begomovírus monossegmentado teve a capacidade de capturar outras moléculas, adquirindo então um alfassatélite a partir de um pré-nanovírus ou um betassatélite de uma fonte desconhecida. Por recombinação entre um begomovírus monossegmentado que infecta dicotiledôneas e um mastrevírus foram formados híbridos que deram origem aos ancestrais dos curtovírus e topocovírus. Em um período posterior, um monossegmentado conseguiu capturar um ancestral do que hoje é o componente B, e esta combinação de dois componentes foi extremamente bem sucedida no Novo Mundo ao ponto de

begomovírus bissegmentados serem os únicos presentes no continente americano, após a deriva dos continentes que aconteceu há cerca de 125 milhões de anos.

Briddon *et al.*, (2010b) demonstraram por meio de análises filogenéticas e exaustivas comparações par-a-par do DNA-A e DNA-B de begomovírus que estas moléculas de fato tem histórias evolutivas diferentes. O DNA-B apresenta maior variação genética quando comparado ao DNA-A. Esse fato pode ser atribuído à menor quantidade de funções codificadas pelo DNA-B, sendo assim mais permissivo à variação, evoluindo exclusivamente em resposta ao hospedeiro (o DNA-A deve manter também a interação com o vetor). Uma explicação alternativa é que o DNA-B teria uma origem distinta do DNA-A, surgido inicialmente como um satélite que foi capturado pelo seu progenitor monossegmentado e posteriormente evoluído para se tornar parte integral do genoma (Nawaz-UI-Rehman e Fauquet, 2009; Briddon *et al.*, 2010b).

## **5. Variabilidade e estrutura genética de populações de geminivírus**

Populações de geminivírus, incluindo os begomovírus, possuem um elevado grau de variabilidade genética. A alta taxa de mutação (Duffy e Holmes, 2008; Duffy e Holmes, 2009), a ocorrência de eventos frequentes de recombinação (Padidam *et al.*, 1999b) e a ocorrência de pseudo-recombinação entre vírus com genoma bissegmentado (Andrade *et al.*, 2006a) contribuem para esse elevado grau de variabilidade. Mutação, recombinação e pseudo-recombinação são as principais fontes de variabilidade genética de vírus em plantas (García-Arenal *et al.*, 2003; Seal *et al.*, 2006b).

### **5.1. Mutação**

Assim como para todos os vírus, a evolução dos geminivírus depende primariamente de mutações. Há evidências de que a rápida evolução dos geminivírus é,

ao menos em parte, dirigida por processos mutacionais que agem especificamente sobre ssDNA (Harkins *et al.*, 2009).

O impacto das mutações pontuais tem sido estudado 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. Os resultados demonstraram que isolados de MSV apresentam alta frequência de mutação, da ordem de  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  (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* (TYLCCV), 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). Uma série de experimentos de evolução a longo prazo (de 6 a 32 anos) também revelaram alta frequência de mutação, entre  $2$  e  $3 \times 10^{-4}$ , para MSV e *Sugarcane streak Réunion virus* (SSRV), sugerindo que mastrevírus provavelmente não co-divergem com seus hospedeiros (Harkins *et al.*, 2009). Estes resultados discordam com a hipótese de aparente co-divergência entre alguns mastrevírus e seus hospedeiros, o que implicaria em taxas de substituições de apenas  $10^{-8}$  subs/sítio/ano na natureza (Wu *et al.*, 2008).

Duffy e Holmes (2008, 2009) realizaram análises estruturadas no tempo de isolados de TYLCV e *East African cassava mosaic virus* (EACMV) para estimar a taxa de substituição de nucleotídeos desses begomovírus. A taxa de substituição para o TYLCV foi estimada em  $2,88 \times 10^{-4}$  subs/sítio/ano para o genoma completo (Duffy e Holmes, 2008). O gene *CP* apresentou uma taxa maior ( $4,63 \times 10^{-4}$  subs/sítio/ano) e a região intergênica (não codificadora) apresentou uma taxa ainda maior ( $1,75 \times 10^{-3}$  subs/sítio/ano). Entretanto, as substituições observadas foram na maioria sinônimas,

sugerindo que as altas taxas observadas refletem mais uma rápida dinâmica mutacional do que uma frequência de evolução adaptativa que refletiria em mutações não sinônimas (Duffy e Holmes, 2008). Para o EACMV as taxas foram estimadas em  $1,6 \times 10^{-3}$  e  $1,33 \times 10^{-4}$  subs/sítio/ano para o DNA-A e DNA-B, respectivamente (Duffy e Holmes, 2008). O gene *CP* apresentou  $1,37 \times 10^{-3}$  subs/sítio/ano e o gene *Rep* mostrou  $1,24 \times 10^{-3}$  subs/sítio/ano. Os genes presentes no DNA-B, *NSP* e *MP*, apresentaram  $2,77 \times 10^{-4}$  e  $3,45 \times 10^{-4}$ , respectivamente. Contudo, os autores validaram esses altos níveis de heterogeneidade apenas para o DNA-A e o gene *CP*. Foi observado então que as taxas de substituição indicadas para essas duas espécies de begomovírus, entre  $10^{-3}$  e  $10^{-5}$ , corroboram em geral aquelas determinadas experimentalmente para o MSV (Isnard *et al.*, 1998; Harkins *et al.*, 2009) e TYLCCNV (Ge *et al.*, 2007).

Erros de incorporação de nucleotídeos durante a replicação viral também contribuem para a variabilidade genética. Estudos de bactérias e sistemas animais indicaram que as taxas de substituição dos vírus de dsDNA e ssDNA diferem significativamente (Duffy *et al.*, 2008). Taxas de substituição para fagos bacterianos, poliomavírus e papilomavírus, com genoma composto de dsDNA, são da ordem de  $10^{-7}$  a  $10^{-8}$  subs/sítio/ano (Drake, 1991; Holmes, 2004; Raney *et al.*, 2004). Em contraste, altas taxas de substituição ( $10^{-4}$ ) foram relatadas para parvovírus e circovírus (vírus de ssDNA) (Gallian *et al.*, 2002; Biagini, 2004). Semelhante aos geminivírus, os parvovírus e circovírus replicam seu genoma via círculo rolante, sugerindo que os altos níveis de heterogeneidade relatados para begomovírus e mastrevírus podem refletir os mesmos erros de replicação (Arguello-Astorga *et al.*, 2004). Foi sugerido que os mecanismos de correção de erro associados à replicação de DNA em eucariotos não sejam eficientes na replicação por círculo rolante e, ou, na replicação de ssDNA (Van Der Walt *et al.*, 2008).

## 5.2. *Recombinação*

Recombinação é o processo pelo qual segmentos de uma fita de DNA ou RNA tornam-se incorporados na fita de um indivíduo diferente durante o processo de replicação (Padidam *et al.*, 1999b). A recombinação é um evento bastante comum em geminivírus (Padidam *et al.*, 1999b; Lefeuvre *et al.*, 2009), e parece contribuir grandemente para sua diversificação genética, aumentando seu potencial evolucionário e adaptação local (Harrison e Robinson, 1999; Padidam *et al.*, 1999b; Berrie *et al.*, 2001; Monci *et al.*, 2002). A elevada frequência de recombinação nesse grupo de vírus pode ser em parte explicada pela existência de uma possível estratégia de replicação dependente de recombinação (RDR) (Jeske *et al.*, 2001; Preiss e Jeske, 2003) em adição à replicação por círculo rolante (RCR) (Saunders *et al.*, 2001), e 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; García-Andrés *et al.*, 2006; Davino *et al.*, 2009), com evidência de infecção do mesmo núcleo da célula por mais de um begomovírus (Morilla *et al.*, 2004).

Eventos de recombinação têm sido diretamente implicados na emergência de novas doenças e epidemias em plantas cultivadas. Essas incluem a epidemia devastadora do mosaico da mandioca, causada pelo recombinante EACMV na Uganda e países vizinhos (Zhou *et al.*, 1997; Pita *et al.*, 2001); as epidemias do complexo TYLCV na bacia ocidental do Mediterrâneo, com o surgimento dos recombinantes *Tomato yellow leaf curl Málaga virus* (TYLCMaV) e *Tomato yellow leaf curl Axarquía virus* (TYLCAxV) em campos de tomate na Espanha (Monci *et al.*, 2002; García-Andrés *et al.*, 2006; García-Andrés *et al.*, 2007a; García-Andrés *et al.*, 2007b); e as epidemias de *Cotton leaf curl virus* (CLCuV) em algodão no Paquistão causadas por um complexo de

espécies incluindo diversos begomovírus recombinantes (Zhou *et al.*, 1998; Idris e Brown, 2002).

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.*, 1999a). Embora na época o número de genomas completos sequenciados fosse pequeno, os autores analisaram todas as combinações par-a-par possíveis e identificaram 420 fragmentos recombinantes tanto entre espécies como entre gêneros da família *Geminiviridae*.

Os mecanismos precisos que controlam a recombinação em begomovírus permanecem desconhecidos (Padidam *et al.*, 1999a). No entanto, é conhecido que sítios recombinantes não são uniformemente distribuídos ao longo do genoma, com a existência de sítios frequentes ("hot spots") e não-frequentes ("cold spots") (Stanley, 1995; Fauquet *et al.*, 2005; García-Andrés *et al.*, 2007b; Lefeuvre *et al.*, 2009). Análises bioinformáticas para detectar vírus recombinantes ocorrendo naturalmente revelaram que a origem de replicação viral é um sítio frequente de recombinação (Gutierrez, 1999; Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). A comparação de sequências de begomovírus mono- e bissegmentados depositadas no GenBank até maio de 2006 (123 e 116 sequências, respectivamente) indicou que a região gênica que codifica a porção N-terminal da proteína Rep, assim como a região intergênica adjacente (RC), são frequentemente intercambiadas durante a replicação. Também foram identificados sítios frequentes de recombinação localizados na região intergênica entre os genes *CP* e *Ren* (Lefeuvre *et al.*, 2007).

A análise comparativa da distribuição de sítios de recombinação dentro do genoma de diversas famílias de vírus de ssDNA novamente sugeriu a distribuição não aleatória dos sítios e também uma tendência significativa para estes se localizarem tanto

fora como na periferia dos genes. Além disso, foi observado que poucos sítios de recombinação foram encontrados dentro de genes que codificam proteínas estruturais (Lefeuvre *et al.*, 2009). Esses resultados sugerem que a seleção natural agindo contra vírus que expressam proteínas recombinantes é a principal determinante na distribuição não aleatória dos sítios de recombinação na maioria das famílias de vírus de ssDNA (Lefeuvre *et al.*, 2009).

Eventos de recombinação também têm sido relatados entre begomovírus e DNA satélites, e entre diferentes moléculas de betassatélites (Briddon *et al.*, 2001; Saunders *et al.*, 2001; Briddon *et al.*, 2003; Nawaz-Ul-Rehman *et al.*, 2009).

### **5.3. Pseudo-recombinação**

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 genômicos entre dois vírus distintos (Gilbertson *et al.*, 1993b; Sung e Coutts, 1995; Andrade *et al.*, 2006a); revisado por (Rojas *et al.*, 2005b). 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 de pseudo-recombinantes formados a partir da mistura de componentes genômicos de dois isolados de BGYMV. Quando inoculada, a mistura formada a partir de DNA-A do isolado da Guatemala (BGYMV-GA) e DNA-B do isolado da República Dominicana (BGYMV-DR) foi capaz de induzir os mesmos sintomas apresentados pelos parentais, enquanto o pseudo-recombinante recíproco induziu sintomas atenuados e tardios. Esses resultados

demonstram que geminivírus com regiões comuns suficientemente similares podem formar pseudo-recombinantes infecciosos, mas ressaltam que frequentemente os pseudo-recombinantes recíprocos apresentam diferenças na eficiência de replicação e infecção sistêmica (Faria *et al.*, 1994). Esse fato foi também observado para o *African cassava mosaic virus* (ACMV) (Stanley *et al.*, 2005) e TGMV (Von Arnim e Stanley, 1992). Por outro lado, componentes genômicos do BGYMV e do *Bean golden mosaic virus* (BGMV), que possuem identidade inferior a 75% em suas sequências de nucleotídeos, não formam pseudo-recombinantes infecciosos (Gilbertson *et al.*, 1993a)

A especificidade da ligação da proteína Rep aos iterons é considerada a principal determinante da formação de pseudo-recombinantes viáveis entre diferentes espécies/estirpes de begomovírus (Arguello-Astorga *et al.*, 1994; Eagle *et al.*, 1994; Fontes *et al.*, 1994; Chatterji *et al.*, 1999; Andrade *et al.*, 2006a; Bull *et al.*, 2007). Outro fator importante é a conservação da sequência de aminoácidos da proteína Rep, especialmente os três aminoácidos do IRD que estariam envolvidos diretamente na ligação aos iterons (Arguello-Astorga e Ruiz-Medrano, 2001; Ruiz-Medrano *et al.*, 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. Por outro lado, 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 *Sida golden mosaic virus* (SiGMV) de Honduras (SiGMV-[Ho<sub>yv</sub>]) 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<sub>yv</sub>] 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).

Um pseudo-recombinante produzido entre o DNA-A do *Tomato mottle virus* (ToMoV) e o DNA-B do *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV), embora infeccioso, apresentou acúmulo reduzido do DNA-B e induziu sintomas atenuados em *N. benthamiana* (Gilbertson *et al.*, 1993b; Hou e Gilbertson, 1996). Entretanto, após três passagens mecânicas sucessivas nesse hospedeiro, os sintomas tornaram-se idênticos aos produzidos pelo ToMoV e o nível do DNA-B tornou-se igual ao do DNA-A. A análise das regiões comuns dos 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 e da recombinação na evolução de geminivírus e em sua adaptação a novos hospedeiros.

Pseudo-recombinantes infecciosos foram formados entre o DNA-A do TGMV e o DNA-B do ToYSV, que possuem iterons similares. A não 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.*, 2006a).

O *Passion fruit severe leaf distortion virus* (PSLDV) e o ToCMoV, os quais apresentam os mesmos iterons, formam um pseudo-recombinante viável, pois todas as plantas de *Nicotiana benthamiana* inoculadas com a combinação PSLDV-A e ToCMoV-B foram infectadas sistemicamente. Entretanto, o pseudo-recombinante recíproco (PSLDV-B e ToCMoV-A) não foi viável. Os mesmos resultados foram observados com PSLDV e ToYSV, os quais possuem iterons distintos. O pseudo-recombinante PSLDV-A e ToYSV-B foi viável em plantas de *N. benthamiana* inoculadas (Ferreira *et al.*, 2010). Estes resultados reforçam a hipótese de que outros fatores além da identidade dos iterons estão associados à viabilidade de pseudo-recombinantes.

#### **5.4. Estrutura genética de populações de geminivírus**

A estrutura genética de populações de vírus de plantas refere-se à quantidade de variabilidade genética e a sua distribuição dentro e entre subpopulações (García-Arenal *et al.*, 2001). Definir a estrutura genética é o primeiro passo para se 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). Para a maior parte dos objetivos, a genética de populações fornece as ferramentas mais convenientes para estimar a variabilidade 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; García-Andrés *et al.*, 2007a).

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. Trabalhos realizados nos últimos 20 anos 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 diversas espécies de begomovírus (Fauquet e Fargette, 1990; Legg e Raya, 1993; Fargette *et al.*, 1994) (curiosamente, não existem relatos de begomovírus que infectam mandioca no Brasil, o centro de origem e diversidade genética desta cultura; provavelmente os begomovírus que infectam a mandioca no continente africano foram transferidos horizontalmente a partir de plantas silvestres). 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).

Na Tanzânia, sete espécies de begomovírus que infectam mandioca foram relatadas (Ndunguru *et al.*, 2005). Diversos eventos de recombinação foram detectados entre as estirpes TZ1 e TZ7 do *East African cassava mosaic Cameron virus* (EACMCV). A análise das sequências indicou que as duas estirpes têm a mesma origem e não foram introduzidas recentemente. A variabilidade genética da população viral foi analisada também com base no DNA-B, o que indicou a existência de diversos eventos

de recombinação. Os resultados indicam que a região central do continente africano é um centro de diversidade genética de begomovírus (Ndunguru *et al.*, 2005).

Font *et al.*, (2007) determinaram a estrutura e variabilidade genética de populações de *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) e TYLCV em plantas de tomateiro em seis regiões da Espanha (Andaluzia, Ilhas Canárias, Lanzarote, Levante, Majorca e Murcia) entre os anos de 1997 e 2001. A análise de PCR-RFLP do gene *CP* e da *RC* de 358 isolados revelou a presença de 14 haplótipos, e eventos de recombinação foram identificados na *RC*. Em todas as regiões geográficas, exceto Murcia, as populações eram compostas de um haplótipo predominante com uma baixa diversidade genética ( $<0,0180$ ), ou estavam evoluindo para esta condição. Em Murcia houve mudanças na predominância de haplótipos. O haplótipo I (TYLCSV) era predominante em 1997, mas sua frequência decresceu em 1998, com o aumento correspondente do haplótipo III (TYCLV), de modo que ambos os haplótipos apresentaram frequências semelhantes. Em 1999, o haplótipo II surgiu e rapidamente tornou-se predominante na população. Esses resultados sugerem que a seleção negativa ocorreu de forma acentuada nessas populações. No entanto, o surgimento de haplótipos altamente adaptados se dispersando na população indica que seleção positiva também estava ocorrendo.

No Brasil, Castillo-Urquiza (2008), estudando duas populações de begomovírus que infectam tomateiro, *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) e *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV) na região Sudeste do Brasil (municípios de Coimbra, MG e Paty do Alferes, RJ), observou maior variabilidade genética na população de ToCmMV. Demonstrou ainda que entre subpopulações de ToCmMV em Coimbra e Paty de Alferes havia maior variabilidade na subpopulação localizada em Coimbra.

A partir de amostras provenientes de um banco de germoplasma de batata doce e amostras coletadas em campos de produção do Brasil, Albuquerque *et al.* (2012) clonaram 34 genomas de begomovírus monossegmentados e verificaram a ocorrência de múltiplos eventos de recombinação. A maioria dos eventos ocorreu na região intergênica (IR) e na ORF C1.

#### **6. Diversidade de begomovírus infectando plantas cultivadas e invasoras no Brasil**

Durante as duas últimas décadas, os begomovírus têm emergido como um dos principais patógenos de plantas, particularmente nas regiões tropicais e subtropicais no mundo, causando severas perdas econômicas (Morales, 2006). No Brasil, as culturas mais severamente afetadas tem sido o feijoeiro e o tomateiro (Faria e Maxwell, 1999; Zerbini *et al.*, 2005).

Begomovírus que infectam feijoeiro (*Phaseolus* spp.) são distribuídos através das Américas, sendo sua incidência um fator limitante para a produtividade dessa cultura. Quatro espécies já foram descritas: *Bean calico mosaic virus* (BCaMV), BDMV, BGMV e BGYMV (Fauquet *et al.*, 2008). Foi demonstrado que isolados brasileiros de BGMV apresentam um baixo grau de variabilidade genética, o que não é comum para begomovírus (Faria e Maxwell, 1999). No entanto, estudos mais recentes realizados em populações de BGMV infectando fava (*Phaseolus lunatus*) baseada na análise de genomas completos indicaram alta variabilidade genética (Silva *et al.*, 2006; Ramos-Sobrinho *et al.*, 2010).

Apesar da ocorrência frequente de BGMV em feijoeiro, infecções de begomovírus em soja não são comuns no Brasil. Ocorrências esporádicas têm sido relatadas desde 1980, com a detecção de BGMV, *Sida mottle virus* (SiMoV) e duas possíveis novas espécies em amostras coletadas na região Sudeste (Mello *et al.*, 2002); e

BGMV, *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV) e *Okra mottle virus* (OMoV) na região Centro-Oeste do país (Fernandes *et al.*, 2009). Este cenário está em contraste com a Argentina, onde a infecção de soja por três begomovírus distintos, incluindo o SiMoV, é frequente na região Noroeste, causando perdas moderadas a severas na produção (Rodríguez-Pardina *et al.*, 2010).

Uma situação oposta é observada para begomovírus que infectam solanáceas, onde um grande número de espécies tem sido descritas (Ribeiro *et al.*, 2003; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2008).

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, aumentando a probabilidade da ocorrência de eventos de recombinação e pseudo-recombinação, o que pode levar ao surgimento de espécies melhor adaptadas ao hospedeiro (Pita *et al.*, 2001; Monci *et al.*, 2002; Andrade *et al.*, 2006a; Inoue-Nagata *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007). Uma vez presentes no novo hospedeiro, os vírus de plantas invasoras podem ter evoluído rapidamente via recombinação e pseudo-recombinação, dando origem às espécies atualmente detectadas. A predominância de algumas espécies pode ser devido a diferenças na adaptação ao tomateiro ou diferenças na eficiência de transmissão pelo vetor (Castillo-Urquiza *et al.*, 2008).

Três observações corroboram essa hipótese. Em primeiro lugar, todas as espécies de begomovírus detectadas até o presente em tomateiro no Brasil são de ocorrência restrita ao país. 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 descritos em plantas silvestres/daninhas, como o SiMoV (Fernandes *et al.*, 1999) e o SimMV (Jovel *et al.*, 2004), já foram encontrados infectando naturalmente o tomateiro (Calegario, 2004; Castillo-Urquiza *et al.*, 2007; Cotrim *et al.*, 2007).

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 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) já foi demonstrada (Andrade *et al.*, 2006a).

Paprotka *et al.*, (2010a) estudaram a diversidade genética de begomovírus presentes em acesso de batata-doce naturalmente infectados em um banco de germoplasma brasileiro. Nesse estudo foram identificadas duas novas espécies, Sweet potato golden vein-associated virus (SPGVaV) e Sweet potato mosaic-associated virus (SPMaV), além de três novos isolados e vários variantes do *Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV). A comparação de sequências dos begomovírus encontrados nesses acessos revelou a presença de sinais de recombinação em seus genomas, ressaltando o risco do surgimento de novos begomovírus no material propagado vegetativamente no banco de germoplasma.

Além das plantas cultivadas, muitas espécies silvestres e/ou invasoras têm sido relatadas como hospedeiras de begomovírus em vários países, incluindo o Brasil (Idris *et al.*, 2003b; Jovel *et al.*, 2004; Varsani *et al.*, 2009; Fiallo-Olivé *et al.*, 2010; Mubin *et al.*, 2010). As espécies mais comumente relatadas como hospedeiras pertencem às famílias Malvaceae, Euphorbiaceae e Fabaceae (Morales e Anderson, 2001). Alguns

estudos demonstraram que begomovírus provenientes de plantas invasoras podem ser transmitidos para espécies cultivadas pelo inseto vetor ou mediante inoculação via extrato vegetal tamponado (Frischmuth *et al.*, 1997; Faria *et al.*, 2000; Morales e Anderson, 2001; Castillo-Urquiza *et al.*, 2007; Cotrim *et al.*, 2007).

No Brasil já foram realizados alguns estudos com o objetivo de caracterizar molecularmente isolados de begomovírus que infectam plantas silvestres e daninhas, sobretudo em associação às culturas do feijoeiro e do tomateiro (Ribeiro *et al.*, 1998; Faria e Maxwell, 1999; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008). Os resultados desses estudos revelaram que, a exemplo do que ocorre com plantas cultivadas, a diversidade genética é alta entre os isolados de begomovírus que infectam plantas invasoras (Ambrozevicus *et al.*, 2002; Calegario, 2004; Castillo-Urquiza, 2008).

Na Serra do Ibiapaba, CE, amostras assintomáticas de plantas invasoras de sete famílias botânicas e 18 espécies vegetais foram avaliadas por ELISA e PCR para infecção por begomovírus. Espécies de plantas daninhas pertencentes às famílias Amaranthaceae (*Amaranthus deflexus*, *A. spinosus*, *A. viridis*), Asteraceae (*Acanthospermum hispidum*, *Ageratum conyzoides*, *Bidens pilosa*), Euphorbiaceae (*Euphorbia heterophylla*) e Rubiaceae (*Borreria capitata*) foram identificadas como hospedeiras naturais de begomovírus (Santos *et al.*, 2003; Arnaud *et al.*, 2007). Silva *et al.* (2010) realizaram ensaios de inoculação por mosca-branca e enxertia com o objetivo de observar a transmissão de begomovírus a partir de tomateiros infectados para quatro espécies de plantas invasoras (*Amaranthus spinosus*, *A. viridis*, *Ageratum conizoydes* e *B. pilosa*) e verificação de seu retorno para o tomateiro. Os resultados indicaram que o vetor transmitiu eficientemente o vírus para as quatro espécies. Por enxertia, apenas *B. pilosa* foi infectada. Esses resultados demonstram que as espécies invasoras são hospedeiras alternativas dos begomovírus de tomateiro presentes na região da Serra de

Ibiapaba e em condições de campo, na presença do vetor, podem constituir importantes fontes de inóculo para essa cultura. No entanto, as espécies de begomovírus infectando estas plantas não foram identificadas.

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* (Capparaceae), *Cnidocolus urens* (Euphorbiaceae), *Desmodium* sp., *Macroptilium lathyroides* (Fabaceae), *Herissantia crispa*, *Sidastrum micranthum*, *S. rhombifolia*, *Sida spinosa* (Malvaceae), *Triumfetta semitriloba* e *Waltheria indica* (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.

Castillo-Urquiza *et al.* (2008) analisaram a presença de begomovírus em tomateiro e plantas invasoras associadas à cultura. Foram encontradas seis novas espécies, três provenientes do tomateiro e três provenientes das invasoras *Blainvillea rhomboidea* (*Blainvillea yellow spot virus*, BLYSV), *Sida rhombifolia* (*Sida yellow mosaic virus*, SiYMV) e *Sida micrantha* (*Sida common mosaic virus*, SiCmMV).

A partir de material foliar de plantas sintomáticas pertencentes às famílias Malvaceae, Euphorbiaceae e Capparaceae, coletadas no município de Miranda (Mato Grosso do Sul), foram identificadas duas novas espécies de begomovírus, *Cleome leaf crumple virus* (CILCrV), obtido de *Cleome affinis*, e *Sida mosaic Brazil virus* (SiMBV). Além disso, foram encontrados dois alfassatélites associados ao *Euphorbia mosaic virus* (*Euphorbia mosaic virus* Mato Grosso do Sul-associated DNA1) e ao CILCrV (*Cleome leaf crumple virus-associated DNA1*) (Paprotka *et al.*, 2010c).

No estado da Bahia foi identificado um novo begomovírus, o *Abutilon Brazil virus* (AbBV), que infecta *Abutilon* sp.. Análises filogenéticas demonstraram que ambos os componentes genômicos do vírus são distintos da espécie clássica, *Abutilon mosaic virus* (AbMV), originária do oeste da Índia. O DNA-A é mais relacionado a begomovírus da América Central que infectam *Sida* sp. e *Euphorbia* sp., e o DNA- B mais relacionado a begomovírus que infectam *Sida* sp. e *Okra* sp. Além disso, inoculação via biobalística comprovou sua transmissão para *Malva parviflora*, a qual desenvolveu sintomas característicos de clareamento de nervuras e mosaico (Paprotka *et al.*, 2010b).

#### **7. Begomovírus em amendoim bravo (*Euphorbia heterophylla*)**

A *Euphorbia heterophylla*, popularmente conhecida como amendoim bravo ou leiteira, é uma importante planta daninha nos países tropicais incluindo o Brasil. Originária da região tropical e subtropical das Américas (Cronquist, 1981), possui uma grande variabilidade morfológica. As folhas são simples ou lobadas aglomeradas na parte superior do ramo, alternadas e possuem grande variação no formato e tamanho, mesmo dentro de uma mesma população de plantas. É uma planta ereta, geralmente não ramificada, com tamanho variável de 30 a 80cm, e produz um látex branco típico de espécies da família Euphorbiaceae (Wilson, 1981).

*E. heterophylla* apresenta um ciclo anual curto de duas a três gerações por ano e uma grande capacidade de multiplicação. Suas sementes são produzidas em frutos que quando maduros modificam sua coloração e ao final da maturação realizam deiscência explosiva lançando as sementes a uma distância relativamente grande da planta mãe (Barroso, 1984). Sua importância como planta daninha se dá pelo rápido crescimento

comparado às plantas cultivadas, o que gera competição pela irradiação solar e nutrientes no solo (Kissmann e Groth, 1992).

Relatos de vírus infectando plantas de *Euphorbia spp.* tem sido feitos desde a década de 1950, quando Costa e Bennett (1950) demonstraram no Brasil que um vírus que provavelmente corresponde ao *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV) foi transmitido pela mosca-branca para tomateiro tendo como fonte de inóculo plantas de *Euphorbia prunifolia*.

O *Euphorbia mosaic virus* foi caracterizado como um geminivírus por Jaramillo & Lastra (1996), que estudaram as propriedades físico-químicas e sorológicas do vírus a partir de purificação viral. Esse vírus parece ser disseminado pela América Central e Caribe, com relatos no México, Porto Rico e Jamaica (Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007; Gregorio-Jorge *et al.*, 2010).

Um begomovírus, denominado *Euphorbia mosaic Venezuela virus* (EuYMVM) foi descrito recentemente na Venezuela (Zambrano *et al.*, 2012 ). O vírus foi capaz de infectar *Euphorbia spp.*, tomateiro e pimentão (*Capsicum annuum*) via inoculação por biobalística. Em 2011, o EuYMV foi clonado a partir de amostras de *Macropitium artropurpureus* no Nordeste do Brasil, demonstrando este ser um novo hospedeiro (Silva *et al.*, 2012).

Uma evidência de recombinação envolvendo begomovírus que infectam *Euphorbia sp.* foi relatada por Singh *et al.* (2012) na Índia. A análise demonstrou que o *Radish leaf curl virus* (RLCV) é um possível recombinante que tem como parentais o *Euphorbia leaf curl virus* (EuLCV) e o *Papaya leaf curl virus* (PaLCV). Esta evidência reforça a hipótese de que infecções mistas em plantas silvestres e daninhas podem gerar novas espécies virais.

## **8. *Begomovirus em figo de pombo (Macrottilium lathyroides)***

*Macrottilium lathyroides*, popularmente conhecido como figo de pombo, feijão de rolinha, ou feijão dos arrozais, é uma espécie da família Fabaceae nativa da América Central e do Sul (Ferreira *et al.*, 2001). É uma planta xerófila, pouco exigente em fertilidade do solo que germina a partir de bancos de sementes presentes no solo. Vegeta também em locais mal drenados e com pH baixo e é adaptada a precipitações anuais entre 475 a 3000mm (Skerman *et al.*, 1988; Ferreira *et al.*, 2004). Embora seja considerada uma planta invasora, pode ser utilizada como forrageira e constitui uma boa fonte de proteína, sendo utilizada viva como banco de proteína ou conservada na forma de feno (Ferreira *et al.*, 2004).

É uma planta trepadeira herbácea anual ou semi-perene, podendo atingir até 1m de altura. Torna-se um pouco lenhosa na base do caule, e sobrevive no campo por até 2 anos. Apresenta folhas compostas trifoliadas, ovadas a lanceoladas ou estritamente elípticas de tamanho entre 3-8 cm de comprimento por 1-3,5 cm de largura, com a face abaxial glabra, face adaxial pilosa, com pecíolo de 1-5 cm de comprimento. As flores são campanuladas (típicas da família Fabaceae) papilionadas em pedicelos curtos, de coloração vermelha a púrpura raramente brancas ou rosadas, medem de 4-6 mm de comprimento, e são dispostas em inflorescências semi-eretas de cerca de 15cm suportadas por pedúnculos de cerca de 30cm. As vagens são lineares, sub-cilíndricas, de 5-12cm de comprimento, 2-3cm de largura, levemente curvadas, glabras ou pubescentes, tornando-se espiraladas na maturidade e contendo até 20 sementes. As sementes são oblíquas oblongas, com aproximadamente 3 mm de comprimento, de coloração mosqueada nas cores de cinza a marrom entre escuro e claro (Skerman *et al.*, 1988).

No Brasil, o figo de pombo tem sido relatado como planta daninha em diversas culturas, como soja no estado do Mato Grosso do Sul (Concenço *et al.*, 2012), feijão, cenoura e tomate industrial no Nordeste (Fontes *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2012).

Estudos sobre a infecção de begomovírus em *M. lathyroides* tiveram início quando Roye *et al.* (1997) utilizaram sondas correspondentes a fragmentos do DNA-A e DNA-B de BGMV marcadas com digoxigenina e compararam sequências parciais da região comum e dos genes *Rep*, *NSP* e *MP* de possíveis novos vírus provenientes de amostras da Jamaica. Foi verificado que os isolados obtidos eram distintos dos begomovírus que infectam plantas cultivadas, definindo um novo grupo. Devido à caracterização incompleta deste grupo de isolados, estes foram classificados em uma única espécie o *Macroptilium yellow mosaic virus* (MaYMV).

Em 1999, a partir de amostras de *M. lathyroides* coletadas em Porto Rico entre 1994 e 1999, foi identificado um isolado de begomovírus distinto do BGMV (Idris *et al.*, 1999). A partir de comparação de sequências da CP e da região comum dos componentes A e B, foi verificado que estas sequências compartilhavam apenas 77 a 79% e 62 a 69% de identidade (DNA-A e DNA-B, respectivamente) com isolados de BGMV provenientes da República Dominicana, Honduras, Guatemala e Jamaica. Este novo isolado também compartilhava apenas 73% de identidade com a sequência da CP do isolado obtido por Roye *et al.* (1997) na Jamaica. O isolado foi denominado *Macroptilium mosaic virus – Puerto Rico* (MaMV-PR).

Em 2002, foi feita a caracterização do genoma completo do *Macroptilium yellow mosaic virus* (Ramos *et al.*, 2002). Na época já havia relatos de sintomas mosaico em *M. lathyroides* em toda região do Caribe, indicando uma possível infecção viral nestas plantas. Amostras foliares de três diferentes localidades (Havana, Villa Clara e Camaguey, em Cuba) com sintomas característicos de infecção viral foram coletadas.

Foi feita a comparação de sequências dos genes *CP*, *Rep* e da região intergênica (região comum e região promotora do gene *CP*) com sequências dos begomovírus disponíveis na época. A maior identidade para todos os segmentos analisados foi com o BGYMV (CP 85-87%, Rep 81-82%, região intergênica 55-56%).

Em 2003 foram caracterizadas duas novas espécies de begomovírus infectando *M. lathyroides*: *Macroptilium yellow mosaic Florida virus* (MaYMFV) e *Macroptilium mosaic Puerto Rico virus* (MaMPRV, que correspondia ao MaMV-PR) (Idris *et al.*, 2003a). Os vírus foram clonados a partir de amostras foliares de *M. lathyroides* e feijão comum. A comparação de sequências de MaYMFV com outras espécies de begomovírus revelou que este vírus tem como seu parente mais próximo o BGYMV, compartilhando apenas 78% e 76% de identidade (DNA-A e DNA-B, respectivamente). Para o DNA-A, o MaMPRV apresentou como parente mais próximo o *Rhynchosia golden mosaic virus* (RGMV) com 78% de identidade. Para o DNA-B, o mais parente mais próximo foi o BGYMV com 72% de identidade. A gama de hospedeiros foi determinada a partir de agroinoculação de clones infecciosos e por meio de transmissão por inseto vetor, indicando que o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*), e a fava (*P. lunatus*) são hospedeiros de ambos os vírus, enquanto soja e *Malva parviflora* são hospedeiras do MaYMFV. A sintomatologia dos dois vírus também foi distinta em *M. lathyroides*, e apenas o MaYMFV foi transmitido por inoculação mecânica. Os autores ressaltaram a importância destes vírus, originalmente encontrados em plantas invasoras e capazes de infectar plantas cultivadas de grande importância econômica.

Foi também investigado se *M. lathyroides* atua como um hospedeiro alternativo de BGYMV (Bracero *et al.*, 2003). No trabalho foi realizada a transmissão via inseto vetor a partir de plantas de *P. vulgaris* para *M. lathyroides* e vice-versa. Os resultados confirmaram que *M. lathyroides* pode atuar como reservatório de BGYMV durante

períodos em que o feijoeiro não esteja presente no campo. A ocorrência de infecções mistas com outros isolados e espécies virais pode gerar possíveis recombinantes.

Em 2008, Amarakoon *et al.* caracterizaram um isolado de MaYMV infectando *M. lathyroides* na Jamaica. Este isolado apresentou 92% de identidade com o isolado de MaYMV de Cuba, 80% com o MaYMFV, e 68% de identidade com o MaMPRV. A gama de hospedeiros foi definida por biobalística e o isolado induziu sintomas em plantas de *M. lathyroides*, fava e pimenta (*Capsicum chinense* cv. Scotch Bonnet).

Em 2010, um novo begomovírus denominado *Macroptilium golden mosaic virus* (MGMV) foi caracterizado infectando *M. lathyroides* e *Wissadulla amplissima* na Jamaica (Collins *et al.*, 2010). Este isolado já havia sido estudado, porém a sequência de nucleotídeos completa do DNA-A não havia sido determinada (Roye *et al.*, 1997). Comparado a outras espécies de begomovírus, a espécie mais próxima é um begomovírus descrito na Índia, o *Corchorus yellow spot virus* (CoYSV), apresentando 79% de identidade com o DNA-A e 66% com o DNA B. Curiosamente este vírus, exceto para a proteína REn, compartilha características de begomovírus originários do Novo Mundo. Os autores discutem que a grande similaridade da REn com o CoYSV pode ser devido à ancestralidade do vírus. Provavelmente este vírus surgiu a partir de begomovírus bissegmentados do Velho Mundo que foram introduzidos no Novo Mundo. A hipótese é que a introdução destes begomovírus nas Américas levou ao surgimento das espécies atuais no Novo Mundo. A análise filogenética mostra que o CoYSV pode ser o ancestral remanescente que gerou os begomovírus do Novo Mundo. A gama de hospedeiros realizada no estudo indicou que o MGMV pode infectar, além de *M. lathyroides* e *Wissadulla amplissima*, plantas cultivadas como o feijoeiro, o tomateiro e o pimentão.

Recentemente, no Brasil foram caracterizadas três novas espécies de begomovírus infectando *M. lathyroides* na região Nordeste do Brasil, *Macrottilium yellow net virus* (MaYNV), *Macrottilium yellow spot virus* (MaYSV) e *Macrottilium yellow vein virus* (MaYVV) (Silva *et al.*, 2012). Análises filogenéticas indicaram que os três vírus se agrupam em clados distintos. O MaYNV foi agrupado com o *Tomato common mosaic virus* (ToCoMV); o MaYSV foi agrupado com o *Blainvillea yellow spot virus* (BYSV); e o MaYVV foi agrupado com o BGMV e o *Sida mosaic Brasil virus*. Os três vírus possuem baixa identidade com os vírus de *Macrottilium* descritos na América Central e Caribe, o que já era esperado devido ao reconhecido agrupamento das espécies do gênero *Begomovirus* com base em região geográfica, e não com base em hospedeiro (Brown *et al.*, 2012).

Relacionamentos filogenéticos inferidos pelo método de “neighbor-net”, utilizando um conjunto de dados contendo todas as espécies de begomovírus brasileiros, revelaram claras evidências de múltiplos eventos de recombinação (Silva *et al.*, 2012). Utilizando um segundo conjunto de dados contendo apenas begomovírus que infectam plantas da família Fabaceae, foi detectado um evento de recombinação em oito clones de MaYSV tendo como possível parental o *Blainvillea yellow spot virus* (BIYSV). Um terceiro conjunto de dados contendo apenas os 12 isolados de MaYSV detectou eventos de recombinação no gene *CP* envolvendo o MaYSV e o MaYNV, que foi identificado como um dos possíveis parentais. Estes resultados demonstram a grande diversidade de vírus que infectam *M. lathyroides* no Nordeste do Brasil e que eventos de recombinação podem gerar novos isolados e espécies de begomovírus.

Em 2013, Lima *et al.* compararam a estrutura genética da população de MaYSV infectando *M. lathyroides* e *Phaseolus vulgaris* de Alagoas com uma população de ToSRV infectando tomate e *Sida sp.* em Minas Gerais. A população de MaYSV

apresentou um número médio de diferença de nucleotídeos par-a-par ( $\pi$ ) oito vezes maior do que a de ToSRV. O gene *Rep* do MaYSV foi 10 vezes mais variável que a *Rep* de ToSRV. Não foram encontradas evidências de seleção adaptativa em MaYSV, enquanto foi encontrado apenas uma evidência no gene *CP* de ToSRV. Os resultados reforçam a hipótese de que a variabilidade de begomovírus em hospedeiros silvestres é maior do que em hospedeiros cultivados e indicam que a recombinação é a causa mais provável dessa variabilidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, L.C.; INOUE-NAGATA, A.K.; PINHEIRO, B.; RESENDE, R.O.; MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J.N. Genetic diversity and recombination analysis of sweepviruses from Brazil. *Virology Journal*, v. 20, p. 241, 2012.
- AMARAKOON, I.I.; ROYE, M.E.; BRIDDON, R.W.; BEDFORD, I.D.; J., S. Molecular and biological characterization of *Macropodium yellow mosaic virus* from Jamaica. *Plant Pathology*, v. 57, p. 417-426, 2008.
- AMBROZEVICIUS, L.P.; CALEGARIO, R.F.; FONTES, E.P.B.; CARVALHO, M.G.; 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.; 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, 2006a.
- ANDRADE, E.C.; MANHANI, G.G.; FONTES, E.P.B.; ZERBINI, F.M. Análise parcial dos determinantes genéticos virais responsáveis pela indução de sintomas por begomovírus em tomateiro e *Nicotiana benthamiana*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 31, p. S225, 2006b.
- ARGUELLO-ASTORGA, G.; LOPEZ-OCHOA, L.; KONG, L.J.; OROZCO, B.M.; SETTLAGE, S.B.; 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.; GUEVARA-GONZÁLEZ, R.G.; HERRERA-ESTRELLA, L.R.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. Geminivirus replication origins have a group-specific organization of interactive elements: a model for replication. *Virology*, v. 203, p. 90-100, 1994.
- ARGUELLO-ASTORGA, G.R.; 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.; 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.; IZABEL, O.S.; RAMALHO-NETO, C.E.; LIMA, G.S.A. Diversidade genética de begomovírus que infectam plantas invasoras na Região Nordeste. *Planta Daninha*, v. 24, p. 239-244, 2006.

- BARROSO, G.M. *Sistemática de angiospermas do Brasil*. 1. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1984.
- BEDFORD, I.D.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; ROSELL, R.C.; 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.
- BERRIE, L.C.; RYBICKI, E.P.; REY, M.E.C. Complete nucleotide sequence and host range of South African cassava mosaic virus: further evidence for recombination amongst begomoviruses. *Journal of General Virology*, v. 82, p. 53-58., 2001.
- BIAGINI, P. Human circoviruses. *Vet Microbiol*, v. 98, p. 95-101, 2004.
- BRACERO, V.; RIVERA, L.I.; BEAVER, J.S. DNA Analysis Confirms *Macrotidium lathyroides* as Alternative Host of *Bean golden yellow mosaic virus*. *Plant Disease*, v. 87, p. 1022-1025, 2003.
- 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.; 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.; 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.; HEYDARNEJAD, J.; KHOSROWFAR, F.; MASSUMI, H.; MARTIN, D.P.; VARSANI, A. Turnip curly top virus, a highly divergent geminivirus infecting turnip in Iran. *Virus Research*, v. 152, p. 169-175, 2010a.
- BRIDDON, R.W.; MANSOOR, S.; BEDFORD, I.D.; PINNER, M.S.; SAUNDERS, K.; STANLEY, J.; ZAFAR, Y.; MALIK, K.A.; 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.; PATIL, B.L.; BAGEWADI, B.; NAWAZ-UL-REHMAN, M.S.; FAUQUET, C.M. Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. *BMC Evolutionary Biology*, v. 10, p. 97, 2010b.
- BRIDDON, R.W.; PINNER, M.S.; STANLEY, J.; MARKHAM, P.G. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology*, v. 177, p. 85-94, 1990.

- BRIDDON, R.W.; STANLEY, J. Subviral agents associated with plant single-stranded DNA viruses. *Virology*, v. 344, p. 198-210, 2006.
- BROWN, J.K.; FAUQUET, C.M.; BRIDDON, R.W.; ZERBINI, F.M.; MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J. Family *Geminiviridae*. In: KING, A.M.Q.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B.; LEFKOWITZ, E.J. (Ed.). *Virus Taxonomy. 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London, UK: Elsevier Academic Press, 2012. p. 351-373.
- BULL, S.E.; BRIDDON, R.W.; SSERUBOMBWE, W.S.; NGUGI, K.; MARKHAM, P.G.; 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.; STANLEY, J. Infectivity, pseudorecombination and mutagenesis of Kenyan cassava mosaic begomoviruses. *J Gen Virol*, v. 88, p. 1624-1633, 2007.
- CALEGARIO, R.F. *Caracterização do isolado de begomovírus MG-Bi2, um possível membro da espécie Sida micrantha mosaic virus (SimMV)*. Tese M.S. Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 48 p., 2004.
- CALEGARIO, R.F.; FERREIRA, S.S.; ANDRADE, E.C.; 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.
- CAMPOS-OLIVAS, R.; LOUIS, J.M.; CLEROT, D.; GRONENBORN, B.; GRONENBORN, A.M. 1H, 13C, and 15N assignment of the N-terminal, catalytic domain of the replication initiation protein from the geminivirus TYLCV. *Journal of Biomolecular NMR*, v. 24, p. 73-74., 2002.
- CARVALHO, C.M.; FONTENELLE, M.R.; FLORENTINO, L.H.; SANTOS, A.A.; ZERBINI, F.M.; FONTES, E.P.B. A novel nucleocytoplasmic traffic GTPase identified as a functional target of the bipartite geminivirus nuclear shuttle protein. *Plant Journal*, v. 55, p. 869-880, 2008.
- CASTILLO-URQUIZA, G.P. *Diversidade e estrutura genética de begomovírus em duas regiões produtoras de tomate do Sudeste do Brasil*. Tese D.S. (Doutorado em Fitopatologia). Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 107 p., 2008.
- CASTILLO-URQUIZA, G.P.; BESERRA JR., J.E.A.; BRUCKNER, F.P.; LIMA, A.T.M.; VARSANI, A.; ALFENAS-ZERBINI, P.; ZERBINI, F.M. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Archives of Virology*, v. 153, p. 1985-1989, 2008.
- CASTILLO-URQUIZA, G.P.; BESERRA JUNIOR, J.E.A.; ALFENAS-ZERBINI, P.; VARSANI, A.; LIMA, A.T.M.; BARROS, D.R.; 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.; FAUQUET, C.M. Identification of replication specificity determinants in two strains of tomato leaf curl virus from New Delhi. *J Virol*, v. 73, p. 5481-5489, 1999.
- CHEN, H.; ZHANG, Z.H.; TENG, K.L.; LAI, J.B.; ZHANG, Y.Y.; HUANG, Y.L.; LI, Y.; LIANG, L.M.; WANG, Y.Q.; CHU, C.C.; GUO, H.S.; XIE, Q. Up-regulation of LSB1/GDU3 affects geminivirus infection by activating the salicylic acid pathway. *Plant Journal*, v. 62, p. 12-23, 2010.
- COLLINS, A.; REHMAN, M.M.; CHOWDA-REDDY, R.V.; WANG, A.M.; FONDONG, V.; BROWN, J.; ROYE, M. Molecular characterization and experimental host range of an isolate of *Macropodium golden mosaic virus* that infects *Wissadula amplissima* in Jamaica. *Virus Research*, v. 150, p. 148-152, 2010.
- CONCENÇO, G.; ANDRES, A.; GALON, L.; PONTES, C.; CORREIA, V. Controle de *Macropodium lathyroides* com herbicidas aplicados em pré e pós-emergência. *Revista Brasileira de Herbicidas*, v. 11, p. 35-38, 2012.
- 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.; MARAMOROSCH, K. (Ed.). *Tropical Diseases of Legumes*. New York: Academic Press, 1975. p. 171.
- COSTA, A.S.; BENNETT, C.W. Whitefly transmitted mosaic of *Euphorbia prunifolia*. *Phytopathology*, v. 40, p. 266-283, 1950.
- COSTA, A.S.; OLIVEIRA, A.R.; SILVA, D.M. Transmissão mecânica do mosaico dourado do tomateiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia*, v. 6, p. 147, 1975.
- COTRIM, M.A.; KRAUSE-SAKATE, R.; NARITA, N.; ZERBINI, F.M.; PAVAN, M.A. Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. *Summa Phytopathologica*, v. 33, p. 300-303, 2007.
- CRONQUIST, A. *An integrated system of classification of flowering plants*. 1981.
- CUI, X.F.; LI, G.X.; WANG, D.W.; HU, D.W.; ZHOU, X.P. A begomovirus DNA beta-encoded protein binds DNA, functions as a suppressor of RNA silencing, and targets the cell nucleus. *Journal of Virology*, v. 79, p. 10764-10775, 2005.
- CUI, X.F.; TAO, X.R.; XIE, Y.; FAUQUET, C.M.; ZHOU, X.P. A DNA beta associated with Tomato Yellow Leaf Curl China Virus is required for symptom induction. *Journal of Virology*, v. 78, p. 13966-13974, 2004.
- DAVIES, J.W.; STANLEY, J.; DONSON, J.; MULLINEAUX, P.M.; BOULTON, M.I. Structure and replication of geminivirus genomes. *Journal of Cell Science*, v. 7, p. 95-107, 1987.
- DAVINO, S.; NAPOLI, C.; DELLACROCE, C.; MIOZZI, L.; NORIS, E.; DAVINO, M.; ACCOTTO, G.P. Two new natural begomovirus recombinants associated with

- the tomato yellow leaf curl disease co-exist with parental viruses in tomato epidemics in Italy. *Virus Research*, v. 143, p. 15-23, 2009.
- DRAKE, J.W. A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 88, p. 7160-7164, 1991.
- DUFFY, S.; 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.
- DUFFY, S.; HOLMES, E.C. Validation of high rates of nucleotide substitution in geminiviruses: Phylogenetic evidence from East African cassava mosaic viruses. *Journal of General Virology*, v. 90, p. 1539-1547, 2009.
- DUFFY, S.; SHACKELTON, L.A.; HOLMES, E.C. Rates of evolutionary change in viruses: Patterns and determinants. *Nature Reviews Genetics*, v. 9, p. 267-276, 2008.
- EAGLE, P.A.; OROZCO, B.M.; 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.J.; FAUQUET, C.; FISHPOOL, L.D.C. Analysis of temporal disease progress of African cassava mosaic virus. *Phytopathology*, v. 84, p. 91-98, 1994.
- FARIA, J.C.; BEZERRA, I.C.; ZERBINI, F.M.; RIBEIRO, S.G.; LIMA, M.F. Situação atual das geminiviroses no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 25, p. 125-137, 2000.
- FARIA, J.C.; GILBERTSON, R.L.; HANSON, S.F.; MORALES, F.J.; AHLQUIST, P.G.; LONIELLO, A.O.; 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.; MAXWELL, D.P. Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. *Phytopathology*, v. 89, p. 262-268, 1999.
- FAUQUET, C.; 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.; ZHOU, X. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology*, v. 153, p. 783-821, 2008.
- FAUQUET, C.M.; SAWYER, S.; IDRIS, A.M.; BROWN, J.K. Sequence analysis and classification of apparent recombinant begomoviruses infecting tomato in the Nile and Mediterranean basins. *Phytopathology*, v. 95, p. 549-555, 2005.

- FERNANDES, A.V.; GALVÃO, R.M.; MACHADO, J.J.; ZERBINI, F.M.; 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.; INOUE-NAGATA, A.K. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes*, v. 36, p. 251-258, 2008.
- FERNANDES, F.R.; ALBUQUERQUE, L.C.; OLIVEIRA, C.L.; CRUZ, A.R.R.; ROCHA, W.B.; PEREIRA, T.G.; NAITO, F.Y.B.; DIAS, N.D.; NAGATA, T.; FARIA, J.C.; ZERBINI, F.M.; ARAGÃO, F.J.L.; INOUE-NAGATA, A.K. Molecular and biological characterization of a new Brazilian begomovirus, euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV), infecting *Euphorbia heterophylla* plants. *Archives of Virology*, v. 156, p. 2063-2069, 2011.
- FERNANDES, F.R.; CRUZ, A.R.R.; FARIA, J.C.; ZERBINI, F.M.; ARAGÃO, F.J.L. Three distinct begomoviruses associated with soybean in central Brazil. *Archives of Virology*, v. 154, p. 1567-1570, 2009.
- FERNANDES, J.J.; CARVALHO, M.G.; ANDRADE, E.C.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; FONTES, E.P.B.; ZERBINI, F.M. Biological and molecular properties of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Plant Pathology*, v. 55, p. 513-522, 2006.
- FERREIRA, O.G.L.; MONKS, P.L.; AFFONSO, A.B. Regeneração natural do feijão dos arrozais (*Macroptilium lathyroides* (L.) Urb. In: SBZ (Ed.). *REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA*. v. 38. Piracicaba2001. p. 138-139.
- FERREIRA, O.G.L.; MONKS, P.L.; MACHADO, A.N.; AFFONSO, A.B. Efeito do corte da parte aérea e de épocas de colheita sobre o rendimento e qualidade das sementes de feijão dos-arrozais. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 10, p. 175-178, 2004.
- FERREIRA, S.S.; BARROS, D.R.; DE ALMEIDA, M.R.; ZERBINI, F.M. Characterization of Passionfruit severe leaf distortion virus, a novel begomovirus infecting passionfruit in Brazil, reveals a close relationship with tomato-infecting begomoviruses. *Plant Pathology*, v. 59, p. 221-230, 2010.
- FIALLO-OLIVÉ, E.; MARTINEZ-ZUBIAUR, Y.; MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J. Complete nucleotide sequence of *Sida golden mosaic Florida virus* and phylogenetic relationships with other begomoviruses infecting malvaceous weeds in the Caribbean. *Archives of Virology*, v. 155, p. 1535-1537, 2010.
- FONDONG, V.N.; PITA, J.S.; REY, M.E.C.; KOCHKO, A.; BEACHY, R.N.; 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.; 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.
- FONTENELLE, M.R.; LUZ, D.F.; GOMES, A.P.; FLORENTINO, L.H.; ZERBINI, F.M.; FONTES, E.P. Functional analysis of the naturally recombinant DNA-A of the bipartite begomovirus *Tomato chlorotic mottle virus*. *Virus Res*, v. 126, p. 262-267, 2007.
- FONTES, E.P.B.; EAGLE, P.A.; SIPE, P.S.; LUCKOW, V.A.; 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, 1994.
- FONTES, E.P.B.; LUCKOW, V.A.; HANLEY-BOWDOIN, L. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. *Plant Cell*, v. 4, p. 597-608, 1992.
- FONTES, L.O.; RODRIGUES, A.P.M.S.; NASCIMENTO, P.G.M.L.; PAULA, V.F.S.; RAMOS, R.F. Manejo de plantas daninhas na cultura da cenoura em monocultura e consorciada com rabanete. *Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável*, v. 7, p. 162-169, 2012.
- FRISCHMUTH, S.; KLEINOW, T.; ABERLE, H.J.; WEGE, C.; HULSER, D.; JESKE, H. Yeast two-hybrid systems confirm the membrane association and oligomerization of BC1 but do not detect an interaction of the movement proteins BC1 and BV1 of Abutilon mosaic geminivirus. *Archives of Virology*, v. 149, p. 2349-2364, 2004.
- FRISCHMUTH, S.; WEGE, C.; HULSER, D.; JESKE, H. The movement protein BC1 promotes redirection of the nuclear shuttle protein BV1 of Abutilon mosaic geminivirus to the plasma membrane in fission yeast. *Protoplasma*, v. 230, p. 117-123, 2007.
- FRISCHMUTH, T.; ENGEL, M.; LAUSTER, S.; JESKE, H. Nucleotide sequence evidence for the occurrence of three distinct whitefly-transmitted, *Sida*-infecting bipartite geminiviruses in Central America. *J Gen Virol*, v. 78, p. 2675-2682, 1997.
- GAFNI, Y.; EPEL, B.L. The role of host and viral proteins in intra and inter-cellular trafficking of geminiviruses. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, v. 60, p. 231-241, 2002.
- GALLIAN, P.; BIAGINI, P.; ATTOUI, H.; CANTALOUBE, J.F.; DUSSOL, B.; BERLAND, Y.; DE MICCO, P.; DE LAMBALLERIE, X. High genetic diversity revealed by the study of TLMV infection in French hemodialysis patients. *Journal of Medical Virology*, v. 67, p. 630-635, 2002.
- GALVÃO, R.M.; MARIANO, A.C.; LUZ, D.F.; ALFENAS, P.F.; ANDRADE, E.C.; ZERBINI, F.M.; ALMEIDA, M.R.; FONTES, E.P.B. A naturally occurring recombinant DNA-A of a typical bipartite begomovirus does not require the cognate DNA-B to infect *Nicotiana benthamiana* systemically. *Journal of General Virology*, v. 84, p. 715-726, 2003.

- GARCÍA-ANDRÉS, S.; ACCOTTO, G.P.; NAVAS-CASTILLO, J.; 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, 2007a.
- GARCÍA-ANDRÉS, S.; MONCI, F.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E. Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: Evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature. *Virology*, v. 350, p. 433-442, 2006.
- GARCÍA-ANDRÉS, S.; TOMAS, D.M.; SANCHEZ-CAMPOS, S.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E. Frequent occurrence of recombinants in mixed infections of tomato yellow leaf curl disease-associated begomoviruses. *Virology*, v. 365, p. 210-219, 2007b.
- GARCÍA-ARENAL, F.; FRAILE, A.; MALPICA, J.M. Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology*, v. 39, p. 157-186, 2001.
- GARCÍA-ARENAL, F.; FRAILE, A.; MALPICA, J.M. Variation and evolution of plant virus populations. *International Microbiology*, v. 6, p. 225-232, 2003.
- GARRIDO-RAMIREZ, E.R.; SUDARSHANA, M.; GILBERTSON, R.L. *Bean golden yellow mosaic virus* from Chiapas, Mexico: Characterization, pseudorecombination with other bean-infecting geminiviruses and germ plasm screening. *Phytopathology*, v. 90, p. 1224-1232, 2000.
- GE, L.M.; ZHANG, J.T.; ZHOU, X.P.; LI, H.Y. 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.; 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.; 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.; 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.; HANLEY-BOWDOIN, L. Two domains of the AL 1 protein mediate geminivirus origin recognition. *Virology*, v. 239, p. 186-197, 1997.

- GREGORIO-JORGE, J.; BERNAL-ALCOCER, A.; BANUELOS-HERNANDEZ, B.; ALPUCHE-SOLIS, A.G.; HERNANDEZ-ZEPEDA, C.; MORENO-VALENZUELA, O.; FRIAS-TREVINO, G.; ARGUELLO-ASTORGA, G.R. Analysis of a new strain of Euphorbia mosaic virus with distinct replication specificity unveils a lineage of begomoviruses with short Rep sequences in the DNA-B intergenic region. . *Virology Journal*, v. 7, p. 275, 2010.
- GUTIERREZ, C. Geminivirus DNA replication. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 56, p. 313-329, 1999.
- GUTIERREZ, C.; RAMIREZ-PARRA, E.; CASTELLANO, M.M.; SANZ-BURGOS, A.P.; LUQUE, A.; MISSICH, R. Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. *Veterinary Microbiology*, v. 98, p. 111-119, 2004.
- HA, C.; COOMBS, S.; REVILL, P.; HARDING, R.; VU, M.; DALE, J. Corchorus yellow vein virus, a New World geminivirus from the Old World. *Journal of General Virology*, v. 87, p. 997-1003, 2006.
- HA, C.; COOMBS, S.; REVILL, P.; HARDING, R.; VU, M.; DALE, J. Molecular characterization of begomoviruses and DNA satellites from Vietnam: Additional evidence that the New World geminiviruses were present in the Old World prior to continental separation. *J Gen Virol*, v. 89, p. 312-326, 2008.
- HAIBLE, D.; KOBER, S.; JESKE, H. Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. *Journal of Virological Methods*, v. 135, p. 9-16, 2006.
- HANLEY-BOWDOIN, L.; SETTLAGE, S.B.; OROZCO, B.M.; NAGAR, S.; ROBERTSON, D. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 18, p. 71-106, 1999.
- HARKINS, G.W.; DELPORT, W.; DUFFY, S.; WOOD, N.; MONJANE, A.L.; OWOR, B.E.; DONALDSON, L.; SAUMTALLY, S.; TRITON, G.; BRIDDON, R.W.; SHEPHERD, D.N.; RYBICKI, E.P.; MARTIN, D.P.; VARSANI, A. Experimental evidence indicating that mastreviruses probably did not co-diverge with their hosts. *Virology Journal*, v. 6, p. 104, 2009.
- HARRISON, B.D.; ROBINSON, D.J. Natural genomic and antigenic variation in white-fly transmitted geminiviruses (begomoviruses). *Annual Review of Phytopathology*, v. 39, p. 369-398, 1999.
- HARRISON, B.D.; ZHOU, X.; OTIM NAPE, G.W.; LIU, Y.; ROBINSON, D.J. Role of a novel type of double infection in the geminivirus-induced epidemic of severe cassava mosaic in Uganda. *Annals of Applied Biology*, v. 131, p. 437-448, 1997.
- HARTL, D.L.; CLARK, A.G. *Principles of population genetics*. Sunderland: Sinauer Associates, 2007.
- HERNANDEZ-ZEPEDA, C.; IDRIS, A.M.; CARNEVALI, G.; BROWN, J.K.; MORENO-VALENZUELA, O.A. Preliminary identification and coat protein gene phylogenetic relationships of begomoviruses associated with native flora and

- cultivated plants from the Yucatan Peninsula of Mexico. *Virus Genes*, v. 35, p. 825-833, 2007.
- HEYRAUD-NITSCHKE, F.; SCHUMACHER, S.; LAUFS, J.; SCHAEFER, S.; SCHELL, J.; 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.; 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.; 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.; 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.
- HOLMES, E.C. The phylogeography of human viruses. *Molecular Ecology*, v. 13, p. 745-756, 2004.
- HOU, Y.M.; GILBERTSON, R.L. Increased pathogenicity in a pseudorecombinant bipartite geminivirus correlates with intermolecular recombination. *Journal of Virology*, v. 70, p. 5430-5436, 1996.
- IDRIS, A.M.; BIRD, J.; BROWN, J.K. First Report of a Bean-Infecting Begomovirus from *Macroptilium lathyroides* in Puerto Rico That Is Distinct from Bean Golden Mosaic Virus. *Plant Disease*, v. 83, p. 1071-1071, 1999.
- IDRIS, A.M.; BRIDDON, R.W.; BULL, S.E.; BROWN, J.K. Cotton leaf curl Gezira virus-satellite DNAs represent a divergent, geographically isolated Nile Basin lineage: predictive identification of a satDNA REP-binding motif. *Virus Research*, v. 109, p. 19-32, 2005.
- IDRIS, A.M.; BROWN, J.K. Molecular analysis of Cotton leaf curl virus-Sudan reveals an evolutionary history of recombination. *Virus Genes*, v. 24, p. 249-256., 2002.
- IDRIS, A.M.; HIEBERT, E.; BIRD, J.; BROWN, J.K. Two newly described begomoviruses of *Macroptilium lathyroides* and common bean. *Phytopathology*, v. 93, p. 774-783, 2003a.
- IDRIS, A.M.; HIEBERT, E.; BIRD, J.; BROWN, J.K. Two newly described begomoviruses of *Macroptilium lathyroides* and common bean. *Phytopathology*, v. 93, p. 774-783, 2003b.

- ILYINA, T.V.; KOONIN, E.V. Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes and archaeobacteria. *Nucleic Acids Res.*, v. 20, p. 3279-3285, 1992.
- INOUE-NAGATA, A.K.; ALBUQUERQUE, L.C.; ROCHA, W.B.; NAGATA, T. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi 29 DNA polymerase. *Journal of Virological Methods*, v. 116, p. 209-211, 2004.
- INOUE-NAGATA, A.K.; MARTIN, D.P.; BOITEUX, L.S.; GIORDANO, L.D.; BEZERRA, I.C.; 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.; 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.
- JARAMILLO, S.; LASTRA, R. Purification and properties of the geminivirus *Euphorbia mosaic virus*. *Journal of Phytopathology*, v. 115, p. 193-203, 1986.
- JEFFREY, J.L.; POOMA, W.; PETTY, I.T. Genetic requirements for local and systemic movement of tomato golden mosaic virus in infected plants. *Virology*, v. 223, p. 208-218., 1996.
- JESKE, H.; LUTGEMEIER, M.; PREISS, W. DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of *Abutilon mosaic virus*. *Embo Journal*, v. 20, p. 6158-6167, 2001.
- JOVEL, J.; RESKI, G.; ROTHENSTEIN, D.; RINGEL, M.; FRISCHMUTH, T.; JESKE, H. *Sida micrantha* mosaic is associated with a complex infection of begomoviruses different from *Abutilon mosaic virus*. *Arch Virol*, v. 149, p. 829-841, 2004.
- JUPIN, I., HEROCOURT, F., BENZ, B., 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.
- KISSMANN, K.G.; GROTH, D. *Plantas infestantes e nocivas*. São Paulo: Basf Brasileira, 1992.
- KLEINOW, T.; HOLEITER, G.; NISCHANG, M.; STEIN, M.; KARAYAVUZ, M.; WEGE, C.; JESKE, H. Post-translational modifications of *Abutilon mosaic virus* movement protein (BC1) in fission yeast. *Virus Research*, v. 131, p. 86-94, 2008.
- LAUFS, J.; TRAUT, W.; HEYRAUD, F.; MATZEIT, G.; ROGERS, S.G.; SCHELL, J.; 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, 1995.

- LAZAROWITZ, S.G. Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 11, p. 327-349, 1992.
- LEFEUVRE, P.; LETT, J.M.; VARSANI, A.; MARTIN, D.P. Widely conserved recombination patterns among single-stranded DNA viruses. *Journal of Virology*, v. 83, p. 2697-2707, 2009.
- LEFEUVRE, P.; MARTIN, D.P.; HOAREAU, M.; NAZE, F.; DELATTE, H.; THIERRY, M.; VARSANI, A.; BECKER, N.; REYNAUD, B.; LETT, J.M. Begomovirus 'melting pot' in the south-west Indian Ocean islands: Molecular diversity and evolution through recombination. *Journal of General Virology*, v. 88, p. 3458-3468, 2007.
- LEGG, J.P.; RAYA, M.D. Survey of cassava virus diseases in Tanzania. *International Journal of Pest Management*, p. 17-23, 1993.
- LEVY, A.; TZFIRA, T. Bean dwarf mosaic virus: a model system for the study of viral movement. *Molecular Plant Pathology*, v. 11, p. 451-461, 2010.
- LIMA, A.T.M.; RAMOS-SOBRINHO, R.; GONZÁLEZ-AGUILERA, J.; ROCHA, S.C.; SILVA, J.C.S.; XAVIER, C.A.D.; SILVA, F.N.; DUFFY, S.; ZERBINI, F.M. Synonymous site variation due to recombination explains higher genetic variability in begomovirus populations infecting non-cultivated hosts. *Journal of General Virology*, v. 94, p. 418-431, 2013.
- LIN, B.; AKBAR BEHJATNIA, S.A.; DRY, I.B.; RANGLES, J.W.; 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.
- MANSOOR, S.; BRIDDON, R.W.; ZAFAR, Y.; STANLEY, J. Geminivirus disease complexes: An emerging threat. *Trends Plant Sci*, v. 8, p. 128-134, 2003.
- MARIANO, A.C.; ANDRADE, M.O.; SANTOS, A.A.; CAROLINO, S.M.B.; OLIVEIRA, M.L.; BARACAT-PEREIRA, M.C.; BROMMONSHENKEL, S.H.; 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.; COSTA, A.S. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. *Summa Phytopathologica*, v. 1, p. 267-275, 1975.
- MELGAREJO, T.A.; KON, T.; ROJAS, M.R.; PAZ-CARRASCO, L.; ZERBINI, F.M.; GILBERTSON, R.L. Characterization of a New World Monopartite Begomovirus Causing Leaf Curl Disease of Tomato in Ecuador and Peru Reveals a New Direction in Geminivirus Evolution. *Journal of Virology*, v. 87, p. 5397-5413, 2013.
- MELLO, R.N.; ALMEIDA, A.M.R.; ZERBINI, F.M. Detection and identification of geminiviruses infecting soybean and associated weeds in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 25, p. 444, 2000.

- MELLO, R.N.; COTRIM, M.A.A.; LOPES, E.F.; MOREIRA, A.G.; CONTIN, F.S.; FONTES, E.P.B.; ALMEIDA, A.M.R.; ZERBINI, F.M. Survey of begomoviruses associated with soybean and identification of *Sida mottle virus* (SiMoV) infecting this crop in Brazil. *Virus Reviews and Research*, v. 7(Supplement), p. 157, 2002.
- MONCI, F.; SANCHEZ-CAMPOS, S.; NAVAS-CASTILLO, J.; 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. History and current distribution of begomoviruses in Latin America. *Advances in Virus Research*, v. 67, p. 127-162, 2006.
- MORALES, F.J.; ANDERSON, P.K. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology*, v. 146, p. 415-441, 2001.
- MORENO, I.M.; MALPICA, J.M.; DIAZ-PENDON, J.A.; MORIONES, E.; FRAILE, A.; 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.; WEGE, C. Tête à tête of tomato yellow leaf curl virus and tomato yellow leaf curl sardinia virus in single nuclei. *J Virol*, v. 78, p. 10715-10723, 2004.
- MUBIN, M.; SHAHID, M.S.; TAHIR, M.N.; BRIDDON, R.W.; MANSOOR, S. Characterization of begomovirus components from a weed suggests that begomoviruses may associate with multiple distinct DNA satellites. *Virus Genes*, v. 40, p. 452-457, 2010.
- NAWAZ-UL-REHMAN, M.S.; FAUQUET, C.M. Evolution of geminiviruses and their satellites. *Febs Letters*, v. 583, p. 1825-1832, 2009.
- NAWAZ-UL-REHMAN, M.S.; MANSOOR, S.; BRIDDON, R.W.; FAUQUET, C.M. Maintenance of an Old World Betasatellite by a New World Helper Begomovirus and Possible Rapid Adaptation of the Betasatellite. *Journal of Virology*, v. 83, p. 9347-9355, 2009.
- NDUNGURU, J.; LEGG, J.; AVELING, T.; THOMPSON, G.; 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.
- NOUEIRY, A.O.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell*, v. 76, p. 925-932, 1994.
- NOZAKI, D.N.; KRAUSE-SAKATE, R.; HASEGAWA, J.M.; CESAR, M.A.; DZIUBA, P.H.; PAVAN, M.A. Ocorrência de *Tomato severe rugose virus* em

- pimentão (*Capsicum annuum* L.) no estado de São Paulo. Fitopatologia Brasileira, v. 30 (Suplemento), p. S189, 2005.
- OROZCO, B.M.; 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.; HANLEY-BOWDOIN, L. Functional domains of a geminivirus replication protein. J Biol Chem, v. 272, p. 9840-9846, 1997.
- OWOR, B.E.; SHEPHERD, D.N.; TAYLOR, N.J.; EDEMA, R.; MONJANE, A.L.; THOMSON, J.A.; MARTIN, D.P.; VARSANI, A. Successful application of FTA Classic Card technology and use of bacteriophage phi29 DNA polymerase for large-scale field sampling and cloning of complete maize streak virus genomes. Journal of Virological Methods, v. 140, p. 100-105, 2007.
- PADIDAM, M.; BEACHY, R.N.; 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.; 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.; BEACHY, R.N.; FAUQUET, C.M. A phage single-stranded DNA (ssDNA) binding protein complements ssDNA accumulation of a geminivirus and interferes with viral movement. Journal of Virology, v. 73, p. 1609-1616, 1999a.
- PADIDAM, M.; SAWYER, S.; FAUQUET, C.M. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. Virology, v. 265, p. 218-224, 1999b.
- PALMER, K.E.; RYBICKI, E.P. The molecular biology of mastreviruses. Advances in Virus Research, v. 50, p. 183-234, 1998.
- PAPLOMATAS, E.J.; PATEL, V.P.; HOU, Y.M.; NOUEIRY, A.O.; GILBERTSON, R.L. Molecular characterization of a new sap-transmissible bipartite genome geminivirus infecting tomatoes in Mexico. Phytopathology, v. 84, p. 1215-1224, 1994.
- PAPROTKA, T.; BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N.; RESENDE, R.O.; JESKE, H.; FARIA, J.C.; RIBEIRO, S.G. Genomic diversity of sweet potato geminiviruses in a Brazilian germplasm bank. Virus Research, v. 149, p. 224-233, 2010a.
- PAPROTKA, T.; METZLER, V.; JESKE, H. The complete nucleotide sequence of a new bipartite begomovirus from Brazil infecting *Abutilon*. Archives of Virology, v. 155, p. 813-816, 2010b.

- PAPROTKA, T.; METZLER, V.; JESKE, H. The first DNA 1-like alpha satellites in association with New World begomoviruses in natural infections. *Virology*, v. 404, p. 148-157, 2010c.
- PEDERSEN, T.J.; HANLEY-BOWDOIN. Molecular characterization of the AL3 protein encoded by a bipartite geminivirus. *Virology*, v. 202, p. 1070-1075, 1994.
- PINEL, A.; ABUBAKAR, Z.; TRAORE, O.; KONATE, G.; 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.; 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.
- PREISS, W.; JESKE, H. Multitasking in replication is common among geminiviruses. *J Virol*, v. 77, p. 2972-2980, 2003.
- QAZI, J.; ILYAS, M.; MANSOOR, S.; BRIDDON, R.W. Legume yellow mosaic viruses: Genetically isolated begomoviruses. *Molecular Plant Pathology*, v. 8, p. 343-348, 2007.
- RAMOS-SOBRINHO, R.; SILVA, S.J.C.; SILVA, T.A.L.; RIBEIRO, S.G.; LIMA, G.S.A.; ASSUNÇÃO, I.P.; ZERBINI, F.M. Genetic structure of a population of the begomovirus *Bean golden mosaic virus* (BGMV) that infects lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in the state of Alagoas, Brazil. In: Program and Abstracts, 6th International Geminivirus Symposium and 4th International ssDNA Comparative Virology Workshop, November 7-12, 2010, Guanajuato, México. 2010.
- RAMOS, P.L.; FERNÁNDEZ, A.; CASTRILLO, G.; DÍAZ, L.; ECHEMENDÍA, A.L.; FUENTES, A.; PERAL, R.; PUJOL, M.; ASCENCIO-IBÁÑEZ, J.T.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.; ARGUELLO-ASTORGA, G. Macroptilium yellow mosaic virus, a New Begomovirus Infecting Macroptilium lathyroides in Cuba. *Plant Disease*, v. 86, p. 1049-1049, 2002.
- RAMOS, P.L.; GUEVARA-GONZALEZ, R.G.; PERAL, R.; ASCENCIO-IBANEZ, J.T.; POLSTON, J.E.; ARGUELLO-ASTORGA, G.R.; VEGA-ARREGUIN, J.C.; 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.
- RANEY, J.L.; DELONGCHAMP, R.R.; VALENTINE, C.R. Spontaneous mutant frequency and mutation spectrum for gene A of phiX174 grown in *E. coli*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 44, p. 119-127, 2004.
- RIBEIRO, S.G.; AMBROZEVICIUS, L.P.; ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; CALEGARIO, R.F.; FERNANDES, J.J.; LIMA, M.F.; MELLO, R.N.; ROCHA, H.;

- ZERBINI, F.M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology*, v. 148, p. 281-295, 2003.
- RIBEIRO, S.G.; ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; FERNANDES, J.J.; FARIA, J.C.; LIMA, M.F.; GILBERTSON, R.L.; ZAMBOLIM, E.M.; ZERBINI, F.M. Widespread occurrence of tomato geminiviruses in Brazil, associated with the new biotype of the whitefly vector. *Plant Disease*, v. 82, p. 830, 1998.
- RIBEIRO, S.G.; MARTIN, D.P.; LACORTE, C.; SIMÕES, I.C.; ORLANDINI, D.R.S.; 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.
- RIDGEN, J.E.; DRY, I.B.; KRAKE, L.R.; 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.
- RODRÍGUEZ-PARDINA, P.E.; HANADA, K.; LAGUNA, I.G.; ZERBINI, F.M.; DUCASSE, D.A. Molecular characterization and relative incidence of bean- and soybean-infecting begomoviruses in northwestern Argentina. *Annals of Applied Biology*, v. 158, p. 69-78, 2010.
- ROJAS, A.; KVARNHEDEN, A.; MARCENARO, D.; VALKONEN, J.P.T. Sequence characterization of Tomato leaf curl Sinaloa virus and Tomato severe leaf curl virus: Phylogeny of New World begomoviruses and detection of recombination. *Archives of Virology*, v. 150, p. 1281-1299, 2005a.
- ROJAS, M.R.; HAGEN, C.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology*, v. 43, p. 361-394, 2005b.
- ROJAS, M.R.; JIANG, H.; SALATI, R.; XOCONOSTLE-CAZARES, B.; SUDARSHANA, M.R.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, tomato yellow leaf curl virus. *Virology*, v. 291, p. 110-125, 2001.
- ROJAS, M.R.; NOUEIRY, A.O.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. Bean dwarf mosaic geminivirus movement proteins recognize DNA in a form- and size-specific manner. *Cell*, v. 95, p. 105-113, 1998.
- ROMAY, G.; CHIRINOS, D.; GERAUD-POUEY, F.; DESBIEZ, C. Association of an atypical alphasatellite with a bipartite New World begomovirus. *Archives of Virology*, v. 155, p. 1843-1847, 2010.
- ROYE, M.E.; MCLAUGHLIN, W.A.; NAKHLA, M.K.; 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.

- ROYE, M.E.; WERNECKE, M.E.; MCLAUGHLIN, W.A.; NAKHLA, M.K.; MAXWELL, D.P. Tomato dwarf leaf curl virus, a new bipartite geminivirus associated with tomatoes and peppers in Jamaica and mixed infection with tomato yellow leaf curl virus. *Plant Pathology*, v. 48, p. 370-378, 1999.
- RUIZ-MEDRANO, R.; XOCONOSTLE-CAZARES, B.; LUCAS, W.J. The phloem as a conduit for inter-organ communication. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 4, p. 202-209., 2001.
- RYBICKI, E.P. A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of Geminiviridae. *Archives of Virology*, v. 139, p. 49-77, 1994.
- SANDERFOOT, A.A.; INGHAM, D.J.; 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 Physiol*, v. 110, p. 23-33, 1996.
- SANDERFOOT, A.A.; 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.
- SANTOS, C.D.G.; GONÇALVES, M.F.B.; 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.; GARCÍA-ARENAL, F.; ZHOU, X.; ROBINSON, D.J.; KHALID, S.; BUTT, T.; 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.; BEDFORD, I.D.; BRIDDON, R.W.; MARKHAM, P.G.; WONG, S.M.; STANLEY, J. A unique virus complex causes *Ageratum yellow vein disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 97, p. 6890-6895, 2000.
- SAUNDERS, K.; BEDFORD, I.D.; STANLEY, J. Pathogenicity of a natural recombinant associated with *ageratum yellow vein disease*: implications for geminivirus evolution and disease etiology. *Virology*, v. 282, p. 38-47, 2001.
- SAUNDERS, K.; BEDFORD, I.D.; STANLEY, J. Adaptation from whitefly to leafhopper transmission of an autonomously replicating nanovirus-like DNA component associated with *ageratum yellow vein disease*. *J Gen Virol*, v. 83, p. 907-913, 2002.
- SAUNDERS, K.; 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.; 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.; 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.; RANGLES, J.W.; REZAIAN, M.A. *Agrobacterium tumefaciens* supports DNA replication of diverse geminivirus types. *FEBS Lett*, v. 516, p. 179-182., 2002.
- SILVA, A.K.F.; SANTOS, C.D.G.; NASCIMENTO, A.K.Q. Begomovirus transmission from weeds to tomato by the whitefly. *Planta Daninha*, v. 28, p. 507-514, 2010.
- SILVA, S.J.C. *Detecção, caracterização molecular e diversidade genética de begomovirus que infectam fava (Phaseolus lunatus L.)*. Dissertação MS. Dep. de Agronomia, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, AL. 87 p., 2006.
- SILVA, S.J.C.; CASTILLO-URQUIZA, G.P.; HORA-JUNIOR, B.T.; ASSUNÇÃO, I.P.; LIMA, G.S.A.; PIO-RIBEIRO, G.; MIZUBUTI, E.S.G.; ZERBINI, F.M. Species diversity, phylogeny and genetic variability of begomovirus populations infecting leguminous weeds in northeastern Brazil. *Plant Pathology*, v. 61, p. 457-467, 2012.
- SINGH, A.; CHATTOPADHYAY, B.; CHAKRABORTY, S. Biology and interactions of two distinct monopartite begomoviruses and betasatellites associated with radish leaf curl disease in India. *Virology Journal*, v. 9, p. 43, 2012.
- SKERMAN, P.J.; CAMERON, D.G.; RIVEROS, F. *Tropical forrage legumes*. Rome: ONU, 1988.
- 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.; STENGER, D.C. Family *Geminiviridae*. In: FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; 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.; REVINGTON, G.N.; STEVENSON, M.C.; 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.; COUTTS, R.H. Pseudorecombination and complementation between potato yellow mosaic geminivirus and tomato golden mosaic geminivirus. *J Gen Virol*, v. 76, p. 2809-2815, 1995.

- SUNTER, G.; BISARO, D.M. Transactivation of geminivirus AR1 and BR2 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. *Plant Cell*, v. 4, p. 1321-1331, 1992.
- SUNTER, G.; HARTITZ, M.D.; HORMUZDI, S.G.; BROUGH, C.L.; 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.
- TAVARES, S.S.; RAMOS-SOBRINHO, R.; GONZÁLEZ-AGUILERA, J.; LIMA, G.S.A.; ASSUNÇÃO, I.P.; ZERBINI, F.M. Further molecular characterization of weed-associated begomoviruses in Brazil with an emphasis on *Sida* spp. *Planta Daninha*, v. 30, p. 305-315, 2012.
- TORRES-PACHECO, I.; GARZÓN-TIZNADO, J.A.; BROWN, J.K.; BECERRA-FLORA, A.; RIVERA-BUSTAMANTE, R. Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the Southern United States. *Phytopathology*, v. 86, p. 1186-1192, 1996.
- UNSELD, S.; RINGEL, M.; KONRAD, A.; LAUSTER, S.; 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 DER WALT, E.; MARTIN, D.P.; VARSANI, A.; POLSTON, J.E.; RYBICKI, E.P. Experimental observations of rapid Maize streak virus evolution reveal a strand-specific nucleotide substitution bias. *Virology Journal*, v. 5, p. 104, 2008.
- VANITHARANI, R.; CHELLAPPAN, P.; PITA, J.S.; FAUQUET, C.M. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *J Virol*, v. 78, p. 9487-9498, 2004.
- VARSANI, A.; SHEPHERD, D.N.; DENT, K.; MONJANE, A.L.; RYBICKI, E.P.; MARTIN, D.P. A highly divergent South African geminivirus species illuminates the ancient evolutionary history of this family. *Virology Journal*, v. 6, p. 36, 2009.
- VARSANI, A.; SHEPHERD, D.N.; MONJANE, A.L.; OWOR, B.E.; ERDMANN, J.B.; RYBICKI, E.P.; PETERSCHMITT, M.; BRIDDON, R.W.; MARKHAM, P.G.; OLUWAFEMI, S.; WINDRAM, O.P.; LEFEUVRE, P.; LETT, J.M.; MARTIN, D.P. Recombination, decreased host specificity and increased mobility may have driven the emergence of maize streak virus as an agricultural pathogen. *Journal of General Virology*, v. 89, p. 2063-2074, 2008.
- VOINNET, O.; PINTO, Y.M.; 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.; 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.

- WANG, H.; BUCKLEY, K.J.; YANG, X.; BUCHMANN, R.C.; BISARO, D.M. Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Journal of Virology*, v. 79, p. 7410-7418, 2005.
- WANG, H.; HUANG, L.F.; 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.; MAISS, E. Viruses infecting cassava in Kenya. *Plant Disease*, v. 88, p. 17-22, 2004.
- WILSON, A.K. *Euphorbia heterophylla: a review of distribution, importance and control*. London, 1981. (Tropical Pest Management).
- WU, B.; MELCHER, U.; GUO, X.; WANG, X.; FAN, L.; ZHOU, G. Assessment of codivergence of mastreviruses with their plant hosts. *BMC Evol Biol*, v. 8, p. 335, 2008.
- YAZDI, H.R.B.; HEYDARNEJAD, J.; MASSUMI, H. Genome characterization and genetic diversity of beet curly top Iran virus: a geminivirus with a novel nonanucleotide. *Virus Genes*, v. 36, p. 539-545, 2008.
- ZAMBRANO, K.; FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, T.; MARYS, E. Molecular characterization of a new begomovirus that infects *Euphorbia heterophylla* and *Solanum lycopersicum* in Venezuela. *Archives of Virology*, v. 157, p. 379-382, 2012.
- ZERBINI, F.M.; ANDRADE, E.C.; BARROS, D.R.; FERREIRA, S.S.; LIMA, A.T.M.; ALFENAS, P.F.; MELLO, R.N. Traditional and novel strategies for geminivirus management in Brazil. *Australasian Plant Pathology*, v. 34, p. 475-480, 2005.
- ZHOU, X.; LIU, Y.; CALVERT, L.; MUNOZ, C.; OTIM-NAPE, G.W.; ROBINSON, D.J.; 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.; LIU, Y.; ROBINSON, D.J.; HARRISON, B.D. Four DNA-A variants among Pakistani isolates of cotton leaf curl virus and their affinities to DNA-A of geminivirus isolates from okra. *Journal of General Virology*, v. 79, p. 915-923, 1998.
- ZHOU, X.; XIE, Y.; TAO, X.; ZHANG, Z.; LI, Z.; FAUQUET, C.M. Characterization of DNAbeta associated with begomoviruses in China and evidence for co-evolution with their cognate viral DNA-A. *J Gen Virol*, v. 84, p. 237-247, 2003.

## CAPÍTULO 1

### **Genetic variability of the begomoviruses *Euphorbia yellow mosaic virus* and *Macrotidium yellow vein virus* in their respective natural hosts, *Euphorbia heterophylla* and *Macrotidium lathyroides***

Lemos, P.P.F, Ramos-Sobrinho, R., Lima, A.T.M., Silva, J.C.F., Xavier, C.A.D., Castillo-Urquiza, G.P., Zerbini, F.M. Genetic variability of the begomoviruses *Euphorbia yellow mosaic virus* and *Macrotidium yellow vein virus* in their respective natural hosts, *Euphorbia heterophylla* and *Macrotidium lathyroides*. Archives of Virology, *in preparation*.

**Genetic variability of the begomoviruses *Euphorbia yellow mosaic virus* and *Macropodium yellow vein virus* in their respective natural hosts, *Euphorbia heterophylla* and *Macropodium lathyroides***

Pedro P. F. Lemos<sup>a</sup>, Roberto Ramos-Sobrinho<sup>a</sup>, Alison T.M. Lima, José C.F. Silva, César A.D. Xavier, Gloria P. Castillo-Urquiza, F. Murilo Zerbini\*

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

\*Corresponding author: Francisco Murilo Zerbini

Phone: (+55-31) 3899-2935; Fax: (+55-31) 3899-2240; E-mail: zerbini@ufv.br

<sup>a</sup>These authors contributed equally to this work.

## Abstract

Begomoviruses (genus *Begomovirus*, family *Geminiviridae*) comprise a group of plant viruses of great economic importance causing serious economic losses in tropical and subtropical crops. It is believed that the emergence of begomoviruses in Brazil occurred through the horizontal transfer of viruses previously restricted to non cultivated plants by the B biotype of *Bemisia tabaci*. Little is known about the genetic variability of weed-infecting begomoviruses. The study of this variability is important to understand how viruses evolve, in order to adopt strategies for the development of crop cultivars with durable resistance. In this study we investigated the genetic variability of two weed-infecting begomoviruses, *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV) and *Macroptilium yellow vein virus* (MaYVV), which infect *Euphorbia heterophylla* and *Macroptilium lathyroides*, respectively. Our results, based on 19 DNA-A sequences of EuYMV and 18 of MaYVV obtained from samples collected in 2011 and 2012, support the hypothesis that the genetic structure of begomoviruses can be modulated by their hosts by common processes of selection, mutation and recombination. We observed distinct degrees of genetic variability between the two viruses. EuYMV presented a higher variability, similar to other weed-infecting begomoviruses, while MaYVV presented a low variability. The nucleotide diversity of EuYMV (0.00819) was four fold higher than that of MaYVV (0.00197). The mutation frequency of EuYMV ( $2.5 \times 10^{-3}$ ) was higher than MaYVV ( $4.2 \times 10^{-4}$ ). This difference was supported by the higher nucleotide diversity of all genes of EuYMV compared to those of MaYVV: *CP* (~three fold), *Rep* (~seven fold), *Trap* (~32 fold), *Ren* (~four fold), *AC4* (~eight fold). Therefore the higher variability of EuYMV can be explained mostly by the *Trap* gene. The lower diversity observed for MaYVV could be due to its recent emergence compared to EuYMV, reported since the 1950's in Brazil.

**Key words:** geminivirus, genetic variability, phylogeny, recombination, evolution

## Introduction

Begomoviruses (genus *Begomovirus*, family *Geminiviridae*) constitute one of the most economically important groups of plant viruses. They cause serious diseases in many economically important vegetable and field crops in tropical and subtropical regions of the world [30]. In Brazil, begomoviruses are limiting factors to tomato (*Solanum lycopersicum*), common bean (*Phaseolus vulgaris*) and, to a lesser extent, sweet and hot pepper (*Capsicum* spp.) cultivation [13, 30].

Begomoviruses have a circular genome of single-stranded DNA encapsidated in twinned icosahedral particles and are transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci* [5]. Begomoviruses found in the Old World have one or two genomic components, and are often associated with a DNA satellite known as DNA beta or betasatellite [26]. Begomoviruses found in the New World have two components known as DNA-A and DNA-B. The DNA-A contains genes responsible for replication and encapsidation of the viral progeny, while the DNA-B contains genes involved in intra- and intercellular movement [5]. Each component is encapsidated in a different particle and both are required for systemic infection.

Weeds and wild hosts, mostly in the families Euphorbiaceae, Fabaceae, Malvaceae and Solanaceae, have been described as natural or reservoir hosts of several begomoviruses [25, 28, 46, 47]. It is believed that weeds can play a role as reservoirs of crop-infecting viruses [45], acting as primary inoculum sources [15] or as "mixing vessels" from which novel species could emerge by recombination and/or pseudorecombination [2, 22, 25, 38]. Viral populations restricted to weeds may have distinct selective constraints based on the supposedly wider genetic basis of weeds compared to crop species, and therefore such populations could evolve faster than those infecting crops [25, 50].

Surveys carried out to identify weed-associated begomoviruses in Brazil indicated that a very high species diversity is present, mirroring the situation found in cultivated hosts, and this diversity can be a source of viruses horizontally transmitted to cultivated hosts [1, 6, 14, 34, 46, 47, 49].

The weed *Euphorbia heterophylla* is native from Central and South America and is frequently found in association with crops. In Brazil it is found in the southern, southeastern, and mid-western regions. Reports of infection of *E. heterophylla* plants with whitefly-transmitted viruses date as far back as the 1950's [8]. However the first begomovirus infecting *E. heterophylla* was characterized only in 1986 in Mexico, and was named *Euphorbia mosaic virus* (EuMV) [23]. This virus appears to be widespread in Central America and the Caribbean having been reported in Mexico, Puerto Rico and Jamaica [18, 19]. A second begomovirus, *Euphorbia mosaic Venezuela virus* (EuMVV), was recently characterized in Venezuela [51], and was shown to be able to infect sweet pepper, tomato and *E. heterophylla* by biolistics.

*Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV), possibly the same virus reported in Brazil in 1950 by Costa e Bennet, was fully characterized in 2011 [14]. Biolistic inoculation indicated that it is able to infect sweet pepper, *Datura stramonium* and *Nicotiana benthamiana*. These results highlight the potential of weed viruses to become economically important in cultivated hosts. Studies investigating the genetic variability of *Euphorbia*-infecting begomoviruses are yet not available.

*Macroptilium lathyroides* is another native weed associated with crops in Central and South America. In Brazil, *M. lathyroides* has been reported in several crops such as soybean in Mato Grosso do Sul state, common bean, and processing tomatoes in the north-eastern region [47].

Begomoviruses infecting *M. lathyroides* have been reported in the Caribbean since 1997 [20, 41]. The first species was characterized in 2002 and named *Macrotidium yellow mosaic virus* (MaYMV) [37]. In 2003, *Macrotidium yellow mosaic Florida virus* (MaYMFV) and *Macrotidium mosaic Puerto Rico virus* (MaMPRV) were characterized [20]. The host range of MaMPRV was assessed by agroinoculation and whitefly transmission. Plants of common bean (*Phaseolus vulgaris*) and lima bean (*P. lunatus*) were hosts of both viruses, while soybean and *Malva parviflora* were infected only by MaYMFV. In 2010, *Macrotidium golden mosaic virus* (MGMV) was characterized infecting *M. lathyroides* and *Wissadulla amplissima* in Jamaica [7]. The host range indicated that MGMV can also infect common bean, tomatoes and sweet pepper. *M. lathyroides* is also an alternative host of *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) [3]. Collins *et al.* [7] emphasized the importance of these *Macrotidium*-infecting viruses being able to infect several economically important crops, suggesting that *M. lathyroides* could act as a mixing vessel for recombination events and subsequent emergence of novel species.

Recently in Brazil, three new begomovirus species infecting *M. lathyroides* were characterized: *Macrotidium yellow net virus* (MaYNV) *Macrotidium yellow spot virus* (MaYSV) and *Macrotidium yellow vein virus* (MaYVV) [47]. Phylogenetic analysis indicated that the three viruses are grouped into distinct clades: MaYNV with *Tomato common mosaic virus* (ToCoMV), MaYSV with *Blainvillea yellow spot virus* (BYSV), and MaYVV with *Bean golden mosaic virus* (BGMV) and *Sida mosaic Brazil virus* (SiMBV). These three viruses have low sequence identity with the viruses of *M. lathyroides* described in Central America and the Caribbean, which was expected due to the grouping of begomovirus species based on geographical location rather than host [5].

In 2013, Lima *et al.* [25] compared the genetic structure of a population of MaYSV infecting *M. lathyroides* and common bean in Alagoas with a population of ToSRV infecting tomato and *Sida sp.* in Minas Gerais. The population of MaYSV had a nucleotide diversity ( $\pi$ ) eight fold higher than that of ToSRV, essentially because the Rep gene of MaYSV was 10 times more variable than the ToSRV Rep. There was no evidence of adaptive selection in MaYSV, while this was found only in the CP gene for ToSRV. These results support a hypothesis that the variability of begomoviruses in wild hosts can be higher than in cultivated hosts and indicate that recombination is the most likely cause of this variability. We hypothesise that the variability of begomoviruses in the field can be modulated by the genetic basis of the host: in cultivated hosts the virus has less room to evolve due to the narrow genetic basis of most commercial cultivars and hybrids; conversely, in non-cultivated hosts the viral population would be more diverse due to differential selection driven by the supposedly wider genetic basis of the host, result of the random crossing of plants.

The objective of this work was to determine the genetic variability of *Euphorbia yellow mosaic virus* and *Macrotidium yellow vein virus* infecting their respective natural hosts, *E. heterophylla* and *M. lathyroides*.

## **Material and Methods**

### *Sample collection and storage*

Foliar samples of *Macrotidium lathyroides* with typical symptoms of begomovirus infection (Figure 1B) were collected in lima bean fields located around the city of Palmeira dos Índios, Alagoas state (AL), in July 2011. Foliar samples of *Euphorbia heterophylla*, also with typical symptoms of begomovirus infection (Figure

1A), were collected in common bean fields located around Santo Antônio de Goiás, Goiás (GO), in July 2012. Twenty samples of each plant species were collected in areas of approximately 1ha. For each sample the following information was recorded: date of collection, GPS coordinates of the sampling location, and symptoms (description and digital image of the sample at the moment of collection). Samples were press-dried and stored at room temperature as herbarium-like samples until analyzed.

#### *DNA amplification and cloning*

Total DNA was extracted as described [9], and full-length viral genomes were amplified by rolling-circle amplification (RCA) [21]. RCA products were cleaved with *Hind* III (which cleaves both genomic components of both viruses in a single point) and ligated to the pBLUESCRIPT KS+ (pKS+) plasmid vector (Stratagene), previously cleaved with the same enzyme. The plasmids were cloned in *E. coli* DH5 $\alpha$  according to standard procedures [43]. Viral inserts were completely sequenced by primer walking at Macrogen, Inc. (Seoul, South Korea). All genome sequences were organized to begin at the nicking site in the invariant nonanucleotide at the origin of replication (5'TAATATT//AC3').

#### *Sequence comparisons and phylogenetic analysis*

Sequences were initially analysed with the BLAST $n$  algorithm to determine viral species with higher nucleotide sequence identities. Pairwise comparisons were performed with SDT v.1.0 [31]. Besides the sequences determined in this study, reference sequences of DNA-A for each begomovirus from Brazil and selected begomoviruses from the Americas were retrieved from GenBank (Supplementary Table S1). Specific sets of sequences were then prepared for each analysis to be performed.

Multiple nucleotide sequence alignments used for the recombination and phylogenetic analyses were prepared using the MUSCLE module [12] implemented in MEGA 5.05 [48]. Phylogenies were reconstructed using Bayesian inference using MrBayes GPU v. 3.0 [40] with 50,000,000 generations. The best fit nucleotide substitution model was estimated using MrModeltest v. 2.2 [32].

#### *Recombination analysis*

Evidence for recombination was assessed using therdp, Geneconv, Bootscan, Maximum Chi square, Chimaera, SisterScan and 3Seq methods implemented in the Recombination Detection Program (RDP) version 3.0 [27] using default settings. Statistical significance was inferred by *P*-values lower than the Bonferroni-corrected cut-off. Only the recombination events detected by more than four out of the seven methods implemented in RDP were considered reliable.

#### *General descriptors of the genetic structure of viral populations*

Diversity indices were calculated using DnaSP v. 5.10 [42]. The main descriptors of molecular variability were estimated for each population/ subpopulation, including the total number of segregating sites (*s*), total number of mutations (*Eta*), average number of nucleotide differences between sequences (*k*), nucleotide diversity ( $\pi$ ), mutation frequencies, number of haplotypes (*h*), haplotype diversity (*Hd*), Watterson's estimate of the population mutation rate based on the total number of segregating sites ( $\theta$ -*w*) and on the total number of mutations ( $\theta$ -*Eta*). The nucleotide diversity ( $\pi$ ) was also calculated for each open reading frame (ORF) for both viruses.

### *Detection of positive and negative selection at amino acid sites*

To detect amino acid sites under positive and negative selection, Tajima's D, Fu and Li's D\* and F\* neutrality tests were performed for the CP, Rep, Trap, Ren, and AC4 ORFs using DnaSP v. 5.10 [42]. Additionally, the differences between synonymous and non synonymous substitution rates were analysed using the ML-based Single Likelihood Ancestor Counting (SLAC) method implemented in the DataMonkey server ([www.datamonkey.org](http://www.datamonkey.org)).

## **Results**

### *Viral detection and sequence comparisons*

A total of 40 samples (20 for *E. heterophylla*, 20 for *M. lathyroides*) tested positive for the presence of a begomovirus based on the detection of a ~2,600 bp band after digestion of the RCA products with *Hind* III (data not shown). From these samples, 37 full length DNA-A components were cloned, 19 from *E. heterophylla* and 18 from *M. lathyroides*. BLAST analysis and pairwise sequence comparisons indicated the presence of *Euphorbia yellow mosaic virus* in the samples of *E. heterophylla* (98-100% identity with EuYMV JF756676) (Figure 2), and of *Macroptilium yellow vein virus* (MaYVV) in the samples of *M. lathyroides* (94.4-94.5% identity with MaYVV JN419021) (Figure 3).

### *Genetic variability in EuYMV and MaYVV populations*

Population analyses indicated that the populations of EuYMV and MaYVV have different degrees of genetic variability. The EuYMV population had a higher number of haplotypes, an eight-fold higher nucleotide diversity, and a six-fold higher mutation frequency in comparison to the MaYVV population (Table 1). Interestingly, both

populations have a lower degree of genetic variability compared to the populations of BIYSV [39], *Cleome leaf cruple virus* (CLCrV) [46] and MaYSV [47] (Table 1). The EuYMV population presented a similar variability with a ToSRV population obtained from the cultivated host *Solanum lycopersicum* [39] (Table 1). In contrast, the MaYVV population presented the lowest genetic variability observed. It is the only population with a mutation frequency in the order of  $10^{-4}$ , and has the lower haplotype diversity compared to all the other populations (11 haplotypes in a total of 18 clones of different samples) (Table 1).

The nucleotide diversity ( $\pi$ ), calculated for gene (Table 2), showed a higher variability for the EuYMV population compared to the MaYVV population in all cases: 3-fold for *CP*, 6.6-fold for *Rep*, 32.5-fold for *Trap*, 4.1-fold for *Ren*, 8.4-fold for *AC4*. This higher nucleotide diversity of all EuYMV genes (but specially *Trap*) could explain the higher genetic variability for the EuYMV population compared to the MaYVV population.

### *Selection analysis*

From all neutrality tests applied to the viral populations, only Tajima's *D* for the *Rep* and *AC4* genes of EuYMV was significant (Table 3). The dN/dS values obtained by the SLAC method indicated the occurrence of positive selection only for the *Trap* gene of EuYMV. Values approximately equal to 1 were obtained for the *AC4* gene of EuYMV and the *Ren* gene of MaYVV, indicating that these genes are under neutral selection. Values <1 obtained for all other genes indicate negative selection (Table 3). The dN/dS values of MaYVV *Trap* and *AC4* could not be determined due to the low variability of these genes in the population. The three amino acid sites identified in the EuYMV population as under significant negative selection were aa149 and aa271 in

Rep, and aa38 in REn. One amino acid site in the MaYVV population, aa 121 in REn, was identified as under neutral selection.

### *Phylogenetic analysis*

Phylogenetic relationships were analyzed based on a dataset of complete DNA-A nucleotide sequences using Bayesian inference. The phylogenetic tree was constructed using a single representative sequence of each haplotype from both populations obtained in this study (Figure 4). Reference sequences of begomoviruses from the Americas originally isolated from weeds (families Asteraceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Malvaceae, and Solanaceae) and reference sequences of begomoviruses infecting crops which are associated with *E. heterophylla* and *M. lathyroides* (Supplementary Table S1) were also included in the analysis.

As expected, due to the geographical clustering observed in the phylogenetic tree (Figure 2), MaYVV did not cluster with other *Macroptilium*-infecting begomoviruses from Central America and the Caribbean. The MaYVV haplotypes clustered with begomoviruses which infect weeds from the Malvaceae and Fabaceae families in Brazil (MaYVV, SiBV and BGMV). Curiously, EuYMV isolates clustered in a clade composed mostly of begomoviruses from Central and North America.

### *Intra- and inter-specific recombination analysis*

Recombination analysis using RDP3 with a dataset containing the sequences obtained in this work did not detect intra-specific recombination in the populations of either virus. A second dataset, the same used for phylogenetic analysis, was used to detect inter-specific recombination. Four recombination events were detected, two for EuYMV and two for MaYVV (Table 4). All four recombination events included part of

the *Rep* gene (Table 4). No recombination was detected between the isolates of EuYMV and MaYVV.

## Discussion

Since the introduction of the B biotype of the whitefly *Bemisia tabaci* in Brazil in the mid 1990's, the incidence and severity of these viruses has increased dramatically [30]. This new biotype is highly polyfagous and has enabled the transmission of indigenous begomoviruses to new cultivated hosts [29], increasing the likelihood of mixed infections and the subsequent emergence of novel recombinant variants [38].

There are few works about the standing genetic variability of begomovirus species in non-cultivated hosts. Here we present a study contrasting the genetic variability of two begomoviruses that have been described infecting ubiquitous weeds associated with common bean and lima bean crops, EuYMV in *Euphorbia heterophylla* and MaYVV in *Macroptilium lathyroides*, with other species of begomoviruses infecting cultivated and non-cultivated hosts [39, 46, 47].

Our results, based on 37 viral genome sequences cloned from samples collected in 2011 and 2012, support the hypothesis that the genetic structure of begomoviruses can be modulated by their hosts by common processes of selection, mutation and recombination.

Population analyses indicated a differential genetic variability between the EuYMV and MaYVV populations (Table 1). Nevertheless, both viruses have a lower degree of genetic variability compared to populations of BIYSV, CILCrV and MaYSV [25, 47]. EuYMV presented a degree of variability similar to ToSRV, while MaYVV presented the lowest degree of all viruses analyzed.

The low variability of the MaYVV population suggests that this begomovirus could be going through a genetic bottleneck, could be a newly emergent species, or has been recently introduced into *M. lathyroides* at the sampled location. Probably, the host *M. lathyroides* plays an important role in the genetic variability of MaYVV. When the virus was first introduced or emerged in this host, it could have undergone a selection process so that only the best fit isolates became established. Such genetic bottleneck causes a sharp reduction in the genetic variability of the population [17]. If this hypothesis is correct, the genetic variability of the MaYVV population should increase as this newly adapted population expands and is transmitted to new hosts, specially cultivated ones. In agriculture, increased host use and diminished bottlenecks can potentially increase the population size of a new pathogen and their genetic variability, as observed for begomoviruses [35, 45].

The higher degree of genetic variability of the EuYMV population could be explained by its longer co-evolution time with the host. *E. heterophylla* with symptoms of begomovirus infection remarkably similar to the ones observed in our survey has been reported since 1950 in Brazil [8]. Recent studies have showed that the mutation rate of begomovirus populations is equivalent to those of RNA viruses [10, 11].

Alternatively, the differential degree of genetic variability between MaYVV and EuYMV could represent a different potencial of each virus to evolve. Further studies monitoring the variability of each population over a longer period of time will be necessary to verify this hypothesis.

The nucleotide diversity ( $\pi$ ) calculated for each viral gene reflects the higher variability of the EuYMV population compared to the MaYVV population, but it is specially striking in the case of the *Trap* gene. The selection analysis indicated that this

region is under strong positive selection. The *Trap* gene overlaps the *Rep* gene, which has been reported as a recombination hot spot for other begomoviruses [24, 25, 36].

Recombination is the most studied evolutionary process acting upon geminivirus populations and it is believed that this process greatly contributes to geminivirus evolution [4, 16, 33, 44]. We did not detect recombination amongst the isolates within either population. To verify the occurrence of inter-specific recombination involving EuYMV and MaYVV we used a dataset comprising New World begomoviruses. Two putative events were detected for EuYMV, and two for MaYVV (Table 4). Our analyses found only inter-specific recombination events with breakpoints located in the *Rep* gene and in the 5'-end of the common region, the same genomic region in which higher variability was detected for EuYMV.

The putative parental virus of MaYVV identified in recombination event 1 (*Tomato severe leaf curl virus* - ToSLCV) was not considered reliable due its distant geographical location (Guatemala). The parental virus identified for event 2 is considered reliable due to its possible coexistence with MaYVV in the field. For EuYMV, both events (events 3 and 4) were not considered reliable due to the same issue raised for MaYVV event 1.

It has been well established that the phylogeny of begomoviruses is based on geographical location rather than host [5]. Phylogenetic analysis showed that EuYMV haplotypes grouped in a cluster supported by host, containing the two viruses that infect *Euphorbia spp.* from Brazil (EuYMV) and Central America/Caribbean (EuMV), as previously reported [14, 47]. Conversely, MaYVV haplotypes did not cluster with *M. lathyroides*-infecting begomoviruses from Central America and the Caribbean. Instead, they clustered with Brazilian begomoviruses infecting *Sida micrantha* (SiBV) and *P. vulgaris* (BGMV), as previously reported [47].

In conclusion, our results identified differential genetic variability between populations of two begomoviruses naturally infecting non-cultivated hosts. These differences could be due to differential selection processes occurring in their respective hosts. The lower variability observed for the MaYVV population may be due to a recent introduction or to mutations that cause fitness penalties of evolving genomes (deleterious mutations establishing a less variable population). Alternatively, MaYVV, which has been described in 2012, could have emerged recently, and the population may not have had enough time to co-evolve with its host, contrary to EuYMV, which was first reported in Brazil in the 1950's.

## References

1. Ambrozevicius LP, Calegario RF, Fontes EPB, Carvalho MG, Zerbini FM (2002) Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatol Bras* 27:372-377
2. 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
3. Bracero V, Rivera LI, Beaver JS (2003) DNA analysis confirms *Macroptilium lathyroides* as alternative host of *Bean golden yellow mosaic virus*. *Plant Dis* 87:1022-1025
4. Briddon RW, Bedford ID, Tsai JH, Markham PG (1996) Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, tomato pseudo-curly top virus, suggests a recombinant origin. *Virology* 219:387-394
5. Brown JK, Fauquet CM, Briddon RW, Zerbini FM, Moriones E, Navas-Castillo J (2012) Family *Geminiviridae*. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (eds) *Virus Taxonomy 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, London, UK, pp 351-373
6. Castillo-Urquiza GP, Beserra Jr. JEA, Bruckner FP, Lima ATM, Varsani A, Alfenas-Zerbini P, Zerbini FM (2008) Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Arch Virol* 153:1985-1989
7. Collins A, Rehman MM, Chowda-Reddy RV, Wang AM, Fondong V, Brown J, Roye M (2010) Molecular characterization and experimental host range of an isolate of *Macroptilium golden mosaic virus* that infects *Wissadula amplissima* in Jamaica. *Virus Res* 150:148-152

8. Costa AS, Bennett CW (1950) Whitefly transmitted mosaic of *Euphorbia prunifolia*. *Phytopathology* 40:266-283
9. Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11-15
10. Duffy S, Holmes EC (2008) Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus*. *J Virol* 82:957-965
11. Duffy S, Holmes EC (2009) Validation of high rates of nucleotide substitution in geminiviruses: Phylogenetic evidence from East African cassava mosaic viruses. *J Gen Virol* 90:1539-1547
12. Edgar RC (2004) MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5:1-19
13. Faria JC, Bezerra IC, Zerbini FM, Ribeiro SG, Lima MF (2000) Situação atual das geminiviruses no Brasil. *Fitopatol Bras* 25:125-137
14. Fernandes FR, Albuquerque LC, Oliveira CL, Cruz ARR, Rocha WB, Pereira TG, Naito FYB, Dias ND, Nagata T, Faria JC, Zerbini FM, Aragão FJL, Inoue-Nagata AK (2011) Molecular and biological characterization of a new Brazilian begomovirus, euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV), infecting *Euphorbia heterophylla* plants. *Arch Virol* 156:2063-2069
15. Frischmuth T, Engel M, Lauster S, Jeske H (1997) Nucleotide sequence evidence for the occurrence of three distinct whitefly-transmitted, *Sida*-infecting bipartite geminiviruses in Central America. *J Gen Virol* 78:2675-2682
16. García-Andrés S, Accotto GP, Navas-Castillo J, Moriones E (2007) 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* 359:302-312
17. García-Arenal F, Fraile A, Malpica JM (2003) Variation and evolution of plant virus populations. *Int Microbiol* 6:225-232
18. Gregorio-Jorge J, Bernal-Alcocer A, Banuelos-Hernandez B, Alpuche-Solis AG, Hernandez-Zepeda C, Moreno-Valenzuela O, Frias-Trevino G, Arguello-Astorga GR (2010) Analysis of a new strain of *Euphorbia mosaic virus* with distinct replication specificity unveils a lineage of begomoviruses with short Rep sequences in the DNA-B intergenic region. *Virol J* 7:275
19. Hernandez-Zepeda C, Idris AM, Carnevali G, Brown JK, Moreno-Valenzuela OA (2007) Preliminary identification and coat protein gene phylogenetic relationships of begomoviruses associated with native flora and cultivated plants from the Yucatan Peninsula of Mexico. *Virus Genes* 35:825-833
20. Idris AM, Hiebert E, Bird J, Brown JK (2003) Two newly described begomoviruses of *Macroptilium lathyroides* and common bean. *Phytopathology* 93:774-783
21. 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 Met* 116:209-211

22. Inoue-Nagata AK, Martin DP, Boiteux LS, Giordano LD, Bezerra IC, de Avila AC (2006) New species emergence via recombination among isolates of the Brazilian tomato-infecting begomovirus complex. *Pesq Agropec Bras* 41:1329-1332
23. Jaramillo S, Lastra R (1986) Purification and properties of the geminivirus *Euphorbia mosaic virus*. *J Phytopathol* 115:193-203
24. Lefeuvre P, Martin DP, Hoareau M, Naze F, Delatte H, Thierry M, Varsani A, Becker N, Reynaud B, Lett JM (2007) Begomovirus 'melting pot' in the south-west Indian Ocean islands: Molecular diversity and evolution through recombination. *J Gen Virol* 88:3458-3468
25. Lima ATM, Sobrinho RR, Gonzalez-Aguilera J, Rocha CS, Silva SJC, Xavier CAD, Silva FN, Duffy S, Zerbini FM (2013) Synonymous site variation due to recombination explains higher genetic variability in begomovirus populations infecting non-cultivated hosts. *J Gen Virol* 94:418-431
26. Mansoor S, Briddon RW, Zafar Y, Stanley J (2003) Geminivirus disease complexes: An emerging threat. *Trends Plant Sci* 8:128-134
27. Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefeuvre P (2010) RDP3: A flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* 26:2462-2463
28. Morales FJ, Anderson PK (2001) The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Arch Virol* 146:415-441
29. Morales FJ, Jones PG (2004) The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. *Virus Res* 100:57-65
30. Morales FJ (2006) History and current distribution of begomoviruses in Latin America. *Adv Virus Res* 67:127-162
31. Muhire B, Martin DP, Brown JK, Navas-Castillo J, Moriones E, Zerbini FM, Rivera-Bustamante R, Malathi VG, Briddon RW, Varsani A (2013) A genome-wide pairwise-identity-based proposal for the classification of viruses in the genus *Mastrevirus* (family *Geminiviridae*). *Arch Virol* 158:DOI 10.1007/s00705-00012-01601-00707
32. Nylander JAA (2004) MrModeltest v2. Program distributed by the author Evolutionary Biology Centre, Uppsala University
33. Padidam M, Beachy RN, Fauquet CM (1999) A phage single-stranded DNA (ssDNA) binding protein complements ssDNA accumulation of a geminivirus and interferes with viral movement. *J Virol* 73:1609-1616
34. Paprotka T, Metzler V, Jeske H (2010) The complete nucleotide sequence of a new bipartite begomovirus from Brazil infecting *Abutilon*. *Arch Virol* 155:813-816
35. Power AG (2000) Insect transmission of plant viruses: A constraint on virus variability. *Curr Opin Plant Biol* 3:336-340
36. Prasanna HC, Rai M (2007) Detection and frequency of recombination in tomato-infecting begomoviruses of South and Southeast Asia. *Virol J* 4:111
37. Ramos PL, Fernández A, Castrillo G, Díaz L, Echemendía AL, Fuentes A, Peral R, Pujol M, Ascencio-Ibañez JT, Rivera-Bustamante R, Arguello-Astorga GR

- (2002) *Macropodium yellow mosaic virus*, a New Begomovirus Infecting *Macropodium lathyroides* in Cuba. *Plant Dis* 86:1049
38. 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. *Phytopathology* 97:702-711
  39. Rocha CS, Castillo-Urquiza GP, Lima ATM, Silva FN, Xavier CAD, Hora-Junior BT, Beserra-Junior JEA, Malta AWO, Martin DP, Varsani A, Alfenas-Zerbini P, Mizubuti ESG, Zerbini FM (2013) Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly evolving, and segregated based on geographical location. *J Virol* 87:5784-5799
  40. Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574
  41. Roye ME, McLaughlin WA, Nakhla MK, Maxwell DP (1997) Genetic diversity among geminiviruses associated with the weed species *Sida* spp., *Macropodium lathyroides*, and *Wissadula amplissima* from Jamaica. *Plant Dis* 81:1251-1258
  42. Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP: DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19:2496-2497
  43. Sambrook J, Russel D (2001) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (3<sup>a</sup> ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
  44. Schnippenkoetter WH, Martin DP, Willment JA, Rybicki EP (2001) Forced recombination between distinct strains of *Maize streak virus*. *J Gen Virol* 82:3081-3090
  45. Seal SE, Jeger MJ, Van den Bosch F (2006) Begomovirus evolution and disease management. *Adv Virus Res* 67:297-316
  46. Silva SJC, Castillo-Urquiza GP, Hora-Júnior BT, Assunção IP, Lima GSA, Pio-Ribeiro G, Mizubuti ESG, Zerbini FM (2011) High genetic variability and recombination in a begomovirus population infecting the ubiquitous weed *Cleome affinis* in northeastern Brazil. *Arch Virol* 156:2205-2213
  47. Silva SJC, Castillo-Urquiza GP, Hora-Junior BT, Assunção IP, Lima GSA, Pio-Ribeiro G, Mizubuti ESG, Zerbini FM (2012) Species diversity, phylogeny and genetic variability of begomovirus populations infecting leguminous weeds in northeastern Brazil. *Plant Pathol* 61:457-467
  48. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731-2739
  49. Tavares SS, Ramos-Sobrinho R, Gonzalez-Aguilera J, Lima GSA, Assunção IP, Zerbini FM (2012) Further molecular characterization of weed-associated begomoviruses in Brazil with an emphasis on *Sida* spp. *Planta Dan* 30:305-315
  50. Webster CG, Coutts BA, Jones RAC, Jones MGK, Wylie SJ (2007) Virus impact at the interface of an ancient ecosystem and a recent agroecosystem: studies on three legume-infecting potyviruses in the southwest Australian floristic region. *Plant Pathol* 56:729-742

51. Zambrano K, Geraud-Pouey F, Chirinos D, Romay G, Marys E (2011) Tomato chlorotic leaf distortion virus, a new bipartite begomovirus infecting *Solanum lycopersicum* and *Capsicum chinense* in Venezuela. *Arch Virol* 156:2263-2266

**Table 1.** Comparative analysis of the genetic structure of *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV) and *Macropodium yellow vein virus* (MaYVV) populations from Santo Antônio de Goiás (GO) and Palmeira dos Índios (AL), Brazil, with other begomovirus populations from cultivated and non-cultivated hosts (BIYSV, *Blainvillea yellow spot virus*; MaYSV, *Macropodium yellow spot virus*; CILCRV, *Cleome leaf crumple virus*; ToSRV, *Tomato severe rugose virus*).

Population	Number of sequences	DNA-A Length(nt)	$s^*$	Eta <sup>†</sup>	$k^‡$	$\pi^§$	Mutation frequency	$h^  $	Hd <sup>¶</sup>	$\theta-w^{\#}$	$\theta-Eta^*$
EuYMV	19	2608	122	127	21.351	0.0082	$2.5 \times 10^{-3}$	17	0.988	0.0134	0.0142
MaYVV	18	2623	20	20	5.163	0.0018	$4.2 \times 10^{-4}$	11	0.908	0.0022	0.0022
BIYSV <sup>a</sup>	7	2661	200	211	65.619	0.0247	$1.1 \times 10^{-2}$	7	1.000	0.0307	0.0323
MaYSV <sup>b</sup>	12	2658	402	419	150.177	0.0572	$1.3 \times 10^{-2}$	12	1.000	0.0537	0.0542
CILCrV <sup>c</sup>	14	2756	253	267	51.758	0.0191	$6.9 \times 10^{-3}$	14	1.000	0.0294	0.0311
ToSRV <sup>a</sup>	27	2588	148	159	26.500	0.0102	$2.3 \times 10^{-3}$	26	0.997	0.0148	0.0159

\* Total number of segregating sites.

† Total number of mutations.

‡ Average number of nucleotide differences between sequences (Tajima's estimate of the population mutation rate,  $\theta$ ).

§ Nucleotide diversity.

|| Haplotype number.

¶ Haplotype diversity.

# Watterson's estimate of the population mutation rate based on the total number of segregating sites.

\* Watterson's estimate of the population mutation rate based on the total number of mutations.

<sup>a</sup> Rocha *et al.*, 2013.

<sup>b</sup> Silva *et al.*, 2012.

<sup>c</sup> Silva *et al.*, 2011.

**Table 2.** Nucleotide diversity ( $\pi$ ) of the viral genes from *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV) and *Macroptilium yellow vein virus* (MaYVV).

<b>Viral population</b>	<b>ORFs</b>				
	<b>CP</b>	<b>Rep</b>	<b>Trap</b>	<b>Ren</b>	<b>AC4</b>
<b>EuYMV</b>	0.00652	0.00782	0.00912	0.00874	0.00725
<b>MaYVV</b>	0.00220	0.00119	0.00028	0.00213	0.00086

**Table 3.** Results of the four neutrality tests performed for each gene in the DNA-A of viral isolates comprising populations of *Euphorbia mosaic virus* (EuYMV) and *Macropodium yellow vein virus* (MaYVV).

Population	Gene	Tajima's <i>D</i>	Fu and Li's <i>D</i> *	Fu and Li's <i>F</i> *	dN/dS
<b>EuYMV</b>	<i>CP</i> <sup>1</sup>	-1.53878	-1.53878	-1.40538	0.0703863
	<i>Rep</i>	-1.80714*	-1.71537	-2.02766	0.308164
	<i>Trap</i>	-0.16202	-0.16202	-0.69978	2.21518
	<i>Ren</i>	-0.48173	-1.33740	-1.26425	0.346247
	<i>AC4</i>	-1.97565*	-1.98332	-2.29849	0.993089
<b>MaYVV</b>	<i>CP</i>	-0.15908	-0.78589	-0.70534	0.164862
	<i>Rep</i>	-2.02766	-1.72671	-1.83617	0.490111
	<i>Trap</i>	-1.16467	-1.49949	-1.61172	ND
	<i>Ren</i>	-0.07163	-0.07163	-0.009318	1.06166
	<i>AC4</i>	-1.50776	1.98899	-2.13015	ND

<sup>1</sup> CP, Coat protein; Rep, Replication-associated protein; Trap, Trans-activating protein; Ren, Replication enhancer protein.

\*Significant values that reject the null hypothesis of selective neutrality; p<0.05

**Table 4.** Putative recombination events detected among the begomoviruses *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV) and *Macroptilium yellow vein virus* (MaYVV) from Goiás and Alagoas states, Brazil, respectively. Based on a data set including begomoviruses from Brazil and Central America.

	Recombination event <sup>1</sup>		Recombinant isolate	Minor parent	Major parent	Methods <sup>2</sup>	P-value <sup>3</sup>
	Initial	Final					
1	2022	2640*	BR:Pai20:11, BR:Pai29:11, BR:Pai34:11, BR:Pai28:11, BR:Pai25:11, BR:Pai24:11, BR:Pai21:11, BR:Pai22:11, BR:Pai23:11, BR:Pai27:11	Unknown	Tomato severe leaf curl virus - Guatemala	<b><u>R</u>GBMCS3</b>	2,88x10 <sup>-08</sup>
2	2125	2460	BR:Pai28:11 BR:Pai20:11 BR:Pai29:11, BR:Pai34:11, BR:Pai19:11, BR:Pai25:11, BR:Pai24:11, BR:Pai21:11, BR:Pai22:11, BR:Pai23:11, BR:Pai27:11	Unknown	Corchorus yellow spot virus - Mexico Tomato golden mosaic virus - Brazil Tomato severe rugose virus - Brazil	<b><u>R</u>GMCS3</b>	1,81x10 <sup>-09</sup>
3	1948	2444	BR:Sag23.1:12, BR:Sag19:12, BR:Sag22:12, BR:Sag15:12, BR:Sag16:12, BR:Sag7:12, BR:Sag20:12, BR:Sag8:12, BR:Sag14:12, BR:Sag10:12, BR:Sag23:12, BR:Sag12:12, BR:Sag13:12, BR:Sag11:12 BR:Sag17:12, BR:Sag18:12, BR:Sag24:12	Unknown	Macroptilium yellow mosaic - Cuba	<b><u>M</u>CS3</b>	3,58x10 <sup>-09</sup>
4	1464	1817*	BR:Sag20:12 BR:Sag23.1:12 BR:Sag19:12, BR:Sag22:12, BR:Sag15:12, BR:Sag16:12, BR:Sag7:12, BR:Sag8:12, BR:Sag14:12, BR:Sag10:12, BR:Sag23:12, BR:Sag12:12, BR:Sag13:12, BR:Sag11:12, BR:Sag17:12, BR:Sag18:12, BR:Sag24:12	Soybean blistering mosaic virus - Argentina	Bean golden yellow mosaic virus - Mexico Macroptilium yellow mosaic - Cuba Macroptilium yellow mosaic - Jamaica	<b><u>R</u>MC3</b>	3,04x10 <sup>-12</sup>

1- Numbering starts at the first nucleotide after the cleavage site at the origin of replication and increases clockwise.

2- R, RDP; G, GeneConv; B, Bootscan; M, MaxChi; C, Chimaera; S, SisScan; 3, 3Seq

3- The reported P-value is for the program in bold, underlined type and is the lowest P-value calculated for the event in question.

(?) - Indicates that the breakpoint could not be precisely pinpointed.

**Supplementary Table S1.** Reference sequences of begomoviruses from the Americas originally isolated from non-cultivated hosts (families Asteraceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Malvaceae, and Solanaceae) and of begomoviruses infecting crops which are associated with *E. heterophylla* and *M. lathyroides*, included in the phylogenetic and recombination analyses.

From Brazil		From other countries		
Virus	GenBank access number	Virus	GenBank access number	Country
<i>Abutilon Brazil virus</i>	FN434438	<i>Abutilon mosaic virus</i>	HQ588899	India
<i>Bean golden mosaic virus</i>	M88686	<i>Bean calico mosaic virus</i>	AF110189	EUA
<i>Blainvillea yellow spot virus</i>	EU710756	<i>Bean dwarf mosaic virus</i>	M88179	EUA
<i>Centrosema yellow spot virus</i>	JN419002	<i>Bean golden yellow mosaic virus</i>	AF173555	Mexico
<i>Cleome leaf crumple virus</i>	FN435999	<i>Corchorus yellow spot virus</i>	DQ875868	Mexico
<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i>	FJ619507	<i>Cotton leaf crumple virus</i>	AF480940	Mexico
<i>Macroptilium yellow net virus</i>	JN418998	<i>Desmodium leaf distortion virus</i>	DQ875870	Mexico
<i>Macroptilium yellow spot virus</i>	JN419005	<i>Euphorbia mosaic virus</i>	DQ318937	Mexico
<i>Macroptilium yellow vein virus</i>	JN419021	<i>Euphorbia mosaic virus</i>	AF068642	Puerto Rico
<i>Okra mottle virus</i>	EU914817	<i>Euphorbia mosaic virus</i>	HQ896201	Cuba
<i>Sida Brazil virus</i>	FN436001	<i>Macroptilium golden mosaic virus</i>	EF645647	Jamaica
<i>Sida common mosaic virus</i>	EU710751	<i>Macroptilium yellow mosaic virus</i>	EF585288	Honduras
<i>Sida mottle virus</i>	AY090555	<i>Macroptilium yellow mosaic virus</i>	EF585290	Jamaica
<i>Sida yellow leaf curl virus</i>	EU710750	<i>Macroptilium yellow mosaic Florida virus</i>	AY044135	EUA
<i>Sida yellow mosaic virus</i>	AY090558	<i>Okra yellow mosaic Mexico virus</i>	DQ022611	Mexico
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i>	AF490004	<i>Okra yellow mottle Igualea virus</i>	AY751753	Mexico
<i>Tomato golden mosaic virus</i>	K02029	<i>Rhynchosia mosaic Sinaloa virus</i>	DQ406672	Mexico
<i>Tomato leaf distortion virus</i>	EU710749	<i>Sida golden mosaic virus</i>	AF049336	EUA
<i>Tomato mild mosaic virus</i>	EU710752	<i>Sida golden yellow vein virus</i>	AJ577395	Cuba
<i>Tomato rugose mosaic virus</i>	AF291705	<i>Sida yellow mosaic Yucatan virus</i>	DQ875872	Mexico
<i>Tomato severe rugose virus</i>	DQ207749	<i>Sida yellow vein virus</i>	Y11099	Mexico
<i>Tomato yellow spot virus</i>	DQ336350	<i>Soybean blistering mosaic virus</i>	EF016486	Argentina
<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	EF417915	<i>Tobacco yellow crinkle virus</i>	FJ213931	Mexico
		<i>Tomato leaf curl New Delhi virus</i>	U15015	India
		<i>Tomato severe leaf curl virus</i>	AF130415	Guatemala
		<i>Tomato yellow leaf distortion virus</i>	FJ174698	Cuba
		<i>Wissadula golden mosaic</i>	DQ395343	Jamaica

## Figure legends

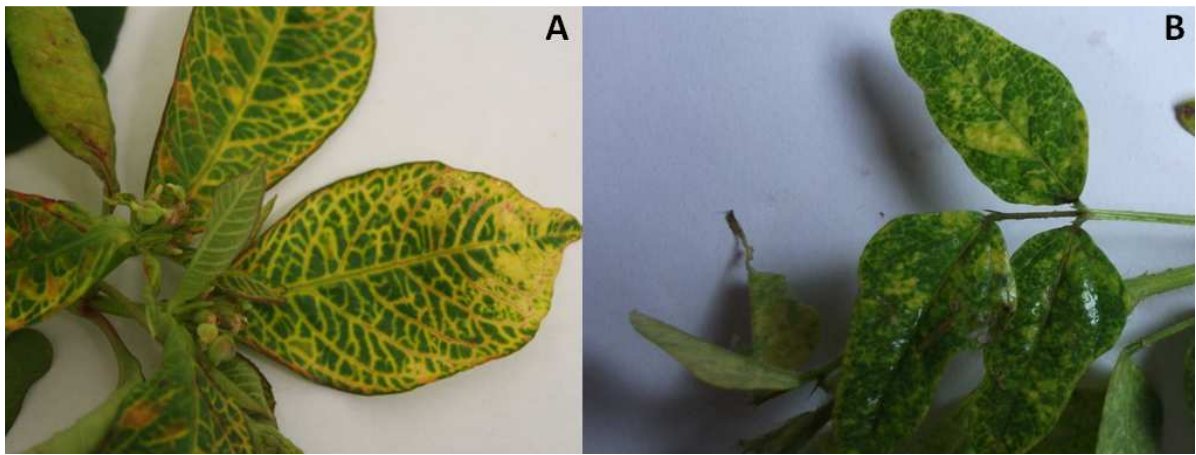
**Figure 1.** (A) Symptoms of *Euphorbia yellow mosaic virus* on *Euphorbia heterophylla* plants. (B) Symptoms of *Macrotidium yellow vein virus* on *Macrotidium lathyroides* plants.

**Figure 2.** Pairwise sequence comparisons between *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV) isolates cloned from *Euphorbia heterophylla* (this work) and other EuYMV isolates (GenBank access numbers JF756669, JF756670, JF756673, JF756674, JF756676). Identities were calculated using SDT v.1.0 [31].

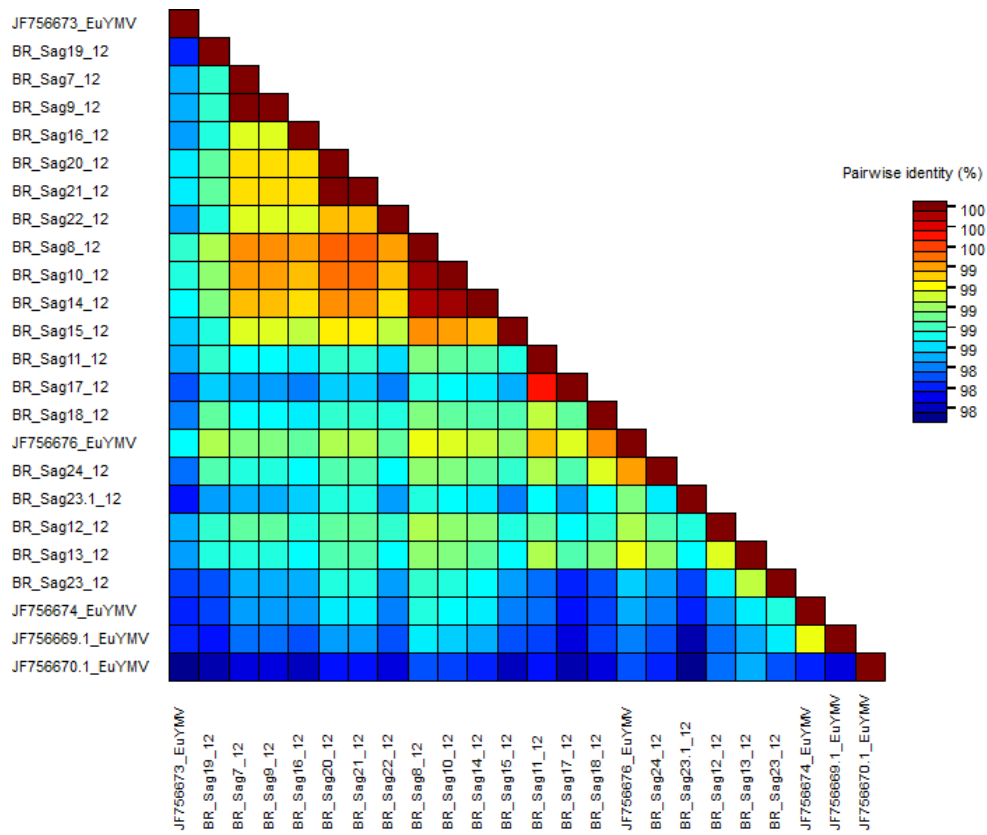
**Figure 3.** Pairwise sequence comparisons of *Macrotidium yellow vein virus* (MaYVV) isolates cloned from *Macrotidium lathyroides* (this work) with the single MaYVV sequence available in GenBank (JN419021). Identities were calculated with SDT v.1.0 [31].

**Figure 4.** Bayesian tree constructed with MrBayes GPU v. 3.0 based on a dataset of DNA-A sequences including the haplotypes of *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV) and *Macrotidium yellow vein virus* (MaYVV) obtained in this work and additional begomoviruses from Americas.

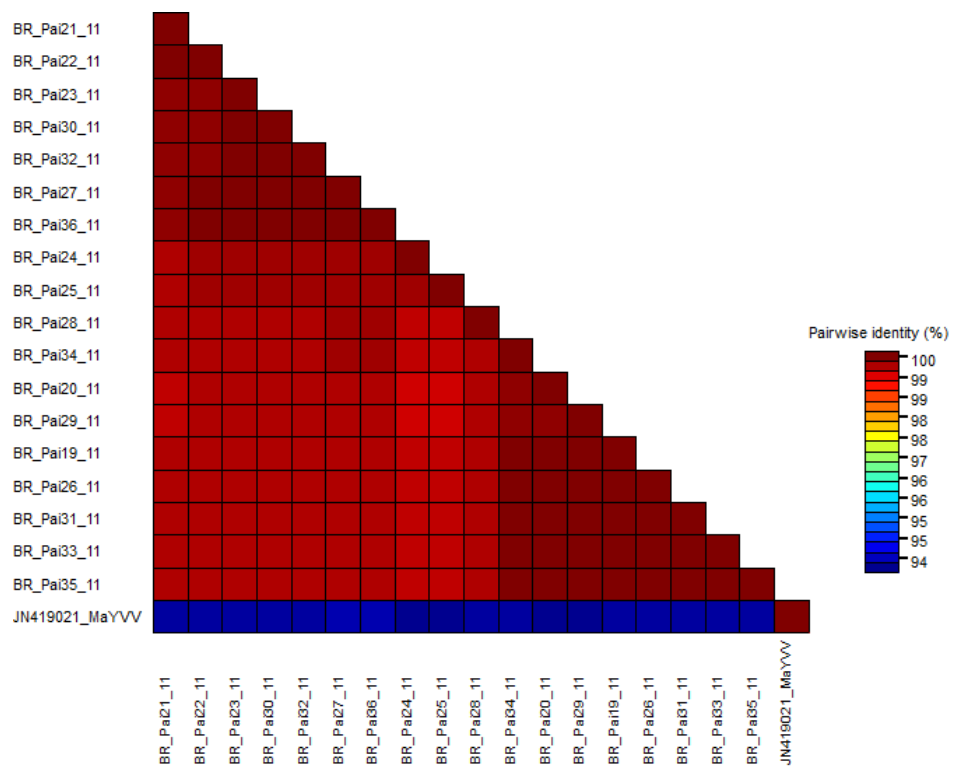
**Figure 1**



**Figure 2**



**Figure 3**



**Figure 4**

