

IGOR RODRIGUES MENDES

ASPECTOS DA INTERAÇÃO ENTRE O BEGOMOVÍRUS *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV) E O DNA SATÉLITE *Euphorbia yellow mosaic alphasatellite* (EuYMA) EM *Euphorbia heterophylla*: EFEITOS NA INFECÇÃO E TRANSMISSÃO POR *Bemisia tabaci*

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
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M538a
2016
Mendes, Igor Rodrigues, 1990-
Aspectos da interação entre o begomovírus *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV) e o DNA satélite *Euphorbia yellow mosaic alphasatellite* (EuYMA) em *Euphorbia heterophylla* : efeitos na infecção e transmissão por *Bemisia tabaci* / Igor Rodrigues Mendes. – Viçosa, MG, 2016.
x, 37f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Francisco Murilo Zerbini Júnior.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Begomovírus - Aspectos genéticos. 2. *Euphorbia yellow mosaic virus*. 3. *Euphorbia heterophylla*. 4. Vírus de plantas - Genética. 5. *Euphorbia yellow mosaic alphasatellite*. 6. Mosca-branca . I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia. II. Título.

CDD 22. ed. 574.88

IGOR RODRIGUES MENDES

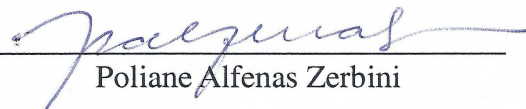
ASPECTOS DA INTERAÇÃO ENTRE O BEGOMOVÍRUS *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV) E O DNA SATÉLITE *Euphorbia yellow mosaic alphasatellite* (EuYMA) EM *Euphorbia heterophylla*: EFEITOS NA INFECÇÃO E TRANSMISSÃO POR *Bemisia tabaci*

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: 25 de fevereiro de 2016.



Claudine Márcia de Carvalho



Poliane Alfenas Zerbini



Francisco Murilo Zerbini Júnior
(Orientador)

*A Deus,
por mais essa conquista e por iluminar e guiar a minha vida e meus caminhos em
todos os momentos.*

*Aos meus pais Élia Celeste e José Antônio e ao meu irmão Iury,
pelo amor, carinho, apoio e confiança depositados em mim sempre, para que mais um
desafio fosse cumprido,*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo maravilhoso dom da vida e por guiar meus passos, iluminar meus caminhos, mostrando sempre por onde é melhor seguir, e por me conceder a melhor família e as mais ricas amizades.

Aos meus maravilhosos pais e melhores do mundo, Élia Celeste e José Antônio, e ao meu amado irmão e melhor do mundo, Iury, por sempre estarem ao meu lado nos momentos fáceis e difíceis, e por não medirem esforços para que tudo fosse possível, sempre acreditando e incentivando o sucesso e a vitória. Obrigado pelo carinho, amor e confiança sempre em mim depositados. Essa conquista também é de vocês.

Ao Professor Francisco Murilo Zerbini, meu orientador, pela grande oportunidade profissional, pela excelente orientação (profissional e pessoal), dedicação, respeito, atenção e pela amizade construída ao longo da realização dos trabalhos.

Aos mestres e amigos do Departamento de Fitopatologia da UFV, por proporcionarem excelentes condições de realização dos trabalhos, pelas amizades construídas e por todos os momentos vividos.

Aos amigos do Laboratório de Virologia Vegetal Molecular (LVVM), Alison, Angélica, Adriana, Camila, César, Professora Claudine, Cleydson, Diogo, Gabriela, Hermano, João Paulo, Josi, Laíse, Larissa, Madelaine, Márcio, Marcos, Murilo, Patrícia, Robert, Roberta, Sarah, Sílvia, Tarsiane, Vitor e, em especial, à Talita, por toda ajuda na execução dos trabalhos e formulação das ideias.... Seu auxílio e amizade, Talita, foram essenciais e essa vitória também é sua.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Industrial, Ana, André, Fernanda Bruckner, Fernanda Pereira, Flávia, Laiane, Rafael e Professora Poliane.

A todos os amigos da graduação pelos momentos felizes que vivemos nesta fase maravilhosa da vida.

A todos os amigos da Pós-Graduação em Fitopatologia, Inaia, Maria Izabel, Lilian, Hermano, Rosana, Lívio, Raul, Dani Lisboa, Polly, Aline, Franklin, Paula, Mari, Álefe, Carol, Luciano, César, Kaliane, Diogo, Josi, Cristiane, Maíra, Paulo, Nívea, Josinha, Dani Rezende, Rodrigo, Bruno, Leandro, Ana e Laís, por todas as horas de estudo e momentos que vivemos juntos.

Às minhas avós Terezinha de Jesus e Maria do Carmo e ao meu avô Antônio Gaione, pelo carinho e pela humildade, com os quais apoiavam e torciam por mim incondicionalmente. À toda minha família.

A todos os meus amigos, em especial aos meus amigos eternos que conquistei em Viçosa: Hermano (um verdadeiro irmão para mim), Nina, Inaia, Marliane, Merielle, Tomás, Lilian, Maria Izabel, Iana, Mari, Rosana, Luciana, Thaís, Bruno e Professora Maria Catarina. Com vocês os momentos complicados se tornaram mais simples, os pesados mais leves, e os tristes extremamente mais felizes. Com vocês foi bem melhor viver aqui, e será sempre. Guardarei vocês no meu coração para onde quer que eu vá, e nossa amizade durará até a eternidade.

À UFV, local que me possibilitou a estrutura e condição para a minha formação e a conquista deste título, e onde vivi os mais fascinantes momentos!

A todos que participaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, dedicando ao menos um pouco do seu tempo em me ajudar, meus sinceros agradecimentos.

Obrigado a todos vocês!!!

BIOGRAFIA

Igor Rodrigues Mendes, filho de Élia Celeste Rodrigues Mendes e José Antônio Mendes, nasceu em 25 de agosto de 1990, em Ubá, Minas Gerais.

Em 2009, ingressou no curso de graduação em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), campus Viçosa-MG, vindo a graduar-se em março de 2014. Neste mesmo mês, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da UFV, defendendo sua dissertação em fevereiro de 2016.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Família <i>Geminiviridae</i>	5
2.2. Gênero <i>Begomovirus</i>	6
2.3. DNAs satélites associados a begomovírus	8
2.4. Aspectos gerais de begomovírus em <i>Euphorbia heterophylla</i>	11
2.5. Transmissão de begomovírus e DNAs satélites por <i>Bemisia tabaci</i>	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Coleta, processamento e análise das amostras	17
3.2. Ensaio de supressão de silenciamento gênico	17
3.3. Ensaio de transmissão por <i>Bemisia tabaci</i>	18
4. RESULTADOS	20
4.1. Detecção, clonagem e caracterização viral a partir das amostras coletadas de <i>Euphorbia heterophylla</i>	20
4.2. A presença do EuYMA provoca alterações no fenótipo da infecção pelo EuYMV	20
4.3. Ensaio de supressão de silenciamento gênico	22
4.4. Ensaio de transmissão por <i>Bemisia tabaci</i>	23
5. DISCUSSÃO	26
6. REFERÊNCIAS	30

RESUMO

MENDES, Igor Rodrigues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2016. **Aspectos da interação entre o begomovírus *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV) e o DNA satélite *Euphorbia yellow mosaic alphasatellite* (EuYMA) em *Euphorbia heterophylla*: efeitos na infecção e transmissão por *Bemisia tabaci*.** Orientador: Francisco Murilo Zerbini Júnior.

A maioria dos begomovírus monossegmentados do Velho Mundo (família *Geminiviridae*) estão associados a DNAs satélites, classificados como alfa- e betassatélites. Os alfassatélites são capazes de replicar-se de forma autônoma, mas dependem do vírus auxiliar para o movimento, encapsidação e transmissão pelo inseto vetor (*Bemisia tabaci*). Recentemente, o *Euphorbia yellow mosaic alphasatellite* (EuYMA) foi encontrado em associação com o begomovírus *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV), infectando plantas de *Euphorbia heterophylla* no Brasil. Compreender a dinâmica da interação entre begomovírus e DNAs satélite em plantas não cultivadas, tais como *E. heterophylla*, é importante porque eles podem ser transferidos para plantas cultivadas, dado o hábito polífago de *B. tabaci*. Este estudo teve como objetivos: (i) analisar as diferenças fenotípicas da infecção pelo EuYMV na presença e na ausência do EuYMA; (ii) avaliar se a proteína alfa-Rep do EuYMA possui atividade supressora de silenciamento de RNA; (iii) comparar a transmissão do EuYMV por *B. tabaci* MEAM1, na ausência e na presença do EuYMA. Foram coletadas amostras (n=165) de *E. heterophylla* em diversos estados do Brasil. Clones infecciosos foram gerados para realizar-se a caracterização biológica e inoculação das plantas. EuYMV foi detectado em 126 amostras e EuYMA foi detectado em apenas seis amostras. Isoladamente, o EuYMV causa clorose internerval e mosaico amarelo. Em associação com o EuYMA, os sintomas são mais severos, caracterizados por mosaico amarelo muito mais intenso, encarquilhamento foliar e redução do crescimento. O DNA-A do EuYMV pode infectar

E. heterophylla na ausência do DNA-B, provocando ou não um mosaico amarelo atenuado. A sequência codificadora completa do gene *alfa-Rep* do EuYMA foi clonada em vetor binário e transformada em células de *Agrobacterium tumefaciens*. Um ensaio de supressão de silenciamento de RNA foi realizado com esta construção em plantas de *Nicotiana benthamiana*. Os resultados indicam que a proteína alfa-Rep do EuYMA não atua como supressora de silenciamento de RNA. Foi realizado um ensaio de transmissão do EuYMV por *B. tabaci*, na presença e ausência de EuYMA, em duas repetições biológicas. Vinte plantas foram utilizadas para cada tratamento. Isoladamente, o EuYMV foi transmitido para 17 e 18 plantas na primeira e segunda repetição, respectivamente. Em associação com EuYMA, o vírus foi transmitido para 15 e 14 plantas na primeira e segunda repetição, respectivamente, uma diferença estatisticamente significativa. Assim, os resultados indicam que o EuYMA afeta negativamente a transmissão do EuYMV pelo vetor, conseqüentemente afetando a disseminação do vírus no campo.

ABSTRACT

MENDES, Igor Rodrigues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2016.
Aspects of the interaction between the begomovirus *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV) and the DNA satellite *Euphorbia yellow mosaic alphasatellite* (EuYMA) in *Euphorbia heterophylla*: effects on infection and transmission by *Bemisia tabaci*.
Advisor: Francisco Murilo Zerbini Júnior.

The majority of Old World monopartite begomoviruses (family *Geminiviridae*) are associated with satellite DNAs, classified as alpha- and betasatellites. Alphasatellites are capable of autonomous replication, but depend on the helper virus for movement, encapsidation and transmission by the insect vector (*Bemisia tabaci*). Recently, *Euphorbia yellow mosaic alphasatellite* (EuYMA) was found in association with *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV), infecting *Euphorbia heterophylla* plants in Brazil. Understanding the dynamics of the interaction between begomoviruses and satellite DNAs in non-cultivated plants, such as *E. heterophylla*, is important as they can be transferred to cultivated plants, given the polyphagous habit of *B. tabaci*. The objectives of this study were: (i) to analyze phenotypic differences of EuYMV infection in the presence and absence of EuYMA; (ii) to evaluate whether the alpha-Rep protein of EuYMA possesses RNA silencing suppressor activity; (iii) to compare the transmission of EuYMV by *B. tabaci* MEAM1 in the absence and presence of EuYMA. Samples (n=165) of *E. heterophylla* were collected in several states of Brazil. Infectious clones were generated to perform the biological characterization and inoculation. EuYMV was detected in 126 samples and EuYMA was detected only in six samples. Alone, EuYMV causes interveinal chlorosis and yellow mosaic. In combination with EuYMA, the symptoms are more severe, characterized by a more intense yellow mosaic, leaf shriveling and stunting. The DNA-A of EuYMV can infect *E. heterophylla* in the absence of the DNA-B, causing attenuated yellow mosaic or no symptoms at all.

The complete coding sequence of the *alpha-Rep* gene of EuYMA was cloned in a binary vector and transformed in *Agrobacterium tumefaciens*. An RNA silencing suppression assay was performed with this construct in *Nicotiana benthamiana* plants. The results indicate that the alpha-Rep protein of EuYMA does not act as an RNA silencing suppressor. A transmission assay of EuYMV by *B. tabaci*, in the presence and absence of EuYMA, was performed in two biological replications. Twenty plants were used for each treatment. Alone, EuYMV was transmitted to 17 and 18 plants, in the first and second replication respectively. In association with EuYMA, the virus was transmitted to 15 and 14 plants, in the first and second replication respectively, a difference which was statistically significant. Thus, our results indicate that EuYMA negatively affects the transmission of EuYMV by the vector, consequently affecting the spread of the virus in the field.

1. INTRODUÇÃO

Os vírus classificados na família *Geminiviridae* possuem genoma composto de DNA fita simples circular, envolto por um único tipo de proteína capsidial que confere à partícula uma morfologia icosaédrica geminada (Brown *et al.*, 2012). A família é composta por sete gêneros (*Begomovirus*, *Becurtovirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus*), definidos com base no tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros, organização genômica e relacionamento filogenético (Brown *et al.*, 2012; Varsani *et al.*, 2014).

O gênero *Begomovirus* inclui vírus de plantas de grande relevância para a agricultura, devido à severidade das doenças por eles causadas em diversas culturas de grande importância econômica, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Morales e Anderson, 2001; Monci *et al.*, 2002; Briddon, 2003; Were *et al.*, 2004). Esses vírus possuem um ou dois componentes genômicos, infectam plantas dicotiledôneas e são transmitidos naturalmente pela mosca-branca *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) (Brown *et al.*, 2015). Com base em estudos filogenéticos e características do genoma, os begomovírus podem ser divididos em dois grupos: Velho Mundo (Europa, África e Ásia) e Novo Mundo (as Américas) (Rybicki, 1994; Padidam *et al.*, 1999; Paximadis *et al.*, 1999; Briddon *et al.*, 2010). A maioria dos begomovírus do Velho Mundo são monossegmentados e estão associados a DNAs satélites (alfa- e betassatélites) (Mansoor *et al.*, 2003). Os begomovírus encontrados no Novo Mundo são bissegmentados, com exceção do *Tomato leaf deformation virus* (ToLDeV) relatado no Peru e no Equador (Melgarejo *et al.*, 2013; Sanchez-Campos *et al.*, 2013). Os dois componentes genômicos dos begomovírus bissegmentados são denominados DNA-A (que contém genes envolvidos na replicação, supressão de respostas de defesa da planta e encapsidação do genoma viral) e DNA-B (que contém genes envolvidos no movimento viral intra- e intercelular) (Rojas *et al.*, 2005).

A maioria dos alfassatélites não exerce influência óbvia nos sintomas induzidos pelos begomovírus em seus hospedeiros, embora aparentemente afetem a replicação de betassatélites (mas não a do begomovírus auxiliar) (Wu e Zhou, 2005; Idris *et al.*, 2011; Zhou, 2013). Entretanto, alguns alfassatélites podem atenuar os sintomas causados por complexos begomovírus-betassatélites nos estágios iniciais da infecção (Wu e Zhou, 2005; Idris *et al.*, 2011).

Relatos recentes demonstraram a associação de alfassatélites com begomovírus bissegmentados do Novo Mundo, infectando plantas não-cultivadas no Brasil e em Cuba (Paprotka *et al.*, 2010; Jeske *et al.*, 2014) e uma planta cultivada (meloeiro) na Venezuela (Romay *et al.*, 2010). Alfassatélites relacionados foram relatados em Singapura, Omã, Índia e Paquistão (Saunders *et al.*, 2002; Idris *et al.*, 2011; Zaffalon *et al.*, 2012). A proteína de replicação (alpha-Rep) do alfassatélite isolado no Paquistão atua como supressora de silenciamento de RNA (Nawaz-Ul-Rehman *et al.*, 2010). No estudo realizado por Paprotka *et al.* (2010), os autores observaram que a presença do alfassatélite estava correlacionada com um aumento na severidade dos sintomas causados pelo *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV) em plantas de *Euphorbia* spp. Esta foi a primeira (e, até o presente, a única) indicação de que alguns alfassatélites podem estar envolvidos no aumento da patogenicidade de geminivírus. Apesar de terem sido descobertos há mais de quinze anos, pouco se sabe sobre os efeitos da presença de alfassatélites em infecções por begomovírus (Zhou, 2013).

Espécies de plantas não-cultivadas das famílias Asteraceae (*Blainvillea rhomboidea*), Caparaceae (*Cleome affinis*), Euphorbiaceae (*Cnidoscolus urens*, *Euphorbia heterophylla*), Fabaceae (*Crotalaria* sp., *Macroptilium lathyroides*, *Desmodium* sp.), Labiatae (*Leonurus sibiricus*), Malvaceae (*Herissantia crispa*, *Melochia* sp., *Pavonia* sp., *Sida rhombifolia*, *S. micrantha*, *S. spinosa*, *S. urens*), Solanaceae (*Nicandra physaloides*, *Solanum nigrum*) e Sterculiaceae (*Waltheria indica* e *Triumfetta semitriloba*) têm sido relatadas como hospedeiras de begomovírus no Brasil, constituindo um importante reservatório de vírus que

podem ser transmitidos para espécies cultivadas (Faria e Maxwell, 1999; Assunção *et al.*, 2006; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008; Tavares *et al.*, 2012; Barreto *et al.*, 2013; Fiallo-Olivé *et al.*, 2015; Pinto *et al.*, 2016).

Euphorbia heterophylla, popularmente conhecida como amendoim-bravo, tem ampla distribuição no território nacional e está presente em 74% das áreas produtoras de soja no planalto do Rio Grande do Sul, onde nos últimos anos vêm sendo observados genótipos resistentes a herbicidas (Vidal e Merotto Jr, 1999; Christoffoleti *et al.*, 2003; Vidal e Winkler, 2004). Em trabalho realizado para avaliar o comportamento de *B. tabaci* Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1) em diferentes espécies de plantas não-cultivadas, *E. heterophylla* foi a planta mais atrativa, com média de 12.2 adultos/cm² e uma das maiores médias de oviposição (Sottoriva *et al.*, 2014). Relatos de possíveis begomovírus infectando *Euphorbia* sp. no Brasil são encontrados na literatura desde 1950 (Costa e Bennett, 1950). Entretanto, apenas em 2011 ocorreu a primeira caracterização completa de um begomovírus a partir de plantas de *E. heterophylla* no país, o *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV), isolado de plantas que apresentavam sintomas de mosaico amarelo coletadas em Goiás e no Distrito Federal (Fernandes *et al.*, 2011).

Os begomovírus são transmitidos por *B. tabaci* de modo persistente circulativo (Ghanim *et al.*, 2007; Gilbertson *et al.*, 2015). As partículas virais são adquiridas via estilete durante o processo de alimentação em plantas infectadas, entram no esôfago e na câmara de filtro e subsequentemente são transportadas através da parede do intestino para a hemolinfa, onde circulam até adentrarem na glândula salivar, a partir da qual são transmitidas para novas plantas durante a alimentação do inseto (Hunter *et al.*, 1998; Ghanim *et al.*, 2001; Czosnek *et al.*, 2002; Ghanim *et al.*, 2007). A proteína capsidial (CP) é a única proteína viral essencial para a aquisição e transmissão pelo inseto vetor (Azzam *et al.*, 1994). Os alfassatélites, que codificam apenas uma proteína de replicação (denominada alpha-Rep), podem replicar de forma autônoma, porém dependem do begomovírus auxiliar para movimento na planta e

transmissão pelo vetor (Zhou, 2013). Estudos de transmissão de alfassatélites por *B. tabaci* são escassos na literatura.

Em amostragem e análise prévia de plantas de *Euphorbia heterophylla* com sintomas típicos de infecção por begomovírus, coletadas em diversos estados do Brasil entre 2009 e 2014, o EuYMV foi detectado em 126 das 165 amostras coletadas. Além disso, o alfassatélite *Euphorbia yellow mosaic alphasatellite* (EuYMA; Paprotka *et al.*, 2010) também foi detectado, porém em apenas seis amostras. Considerando-se o papel relevante das plantas não-cultivadas como reservatórios de vírus que podem ser transmitidos para plantas cultivadas, é importante conhecer a dinâmica da infecção dos begomovírus nessas plantas, bem como a sua interação com os DNAs satélites a eles associados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Família *Geminiviridae*

Os vírus classificados na família *Geminiviridae* causam doenças relevantes para a produção agrícola em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, afetando severamente culturas como o algodoeiro, as cucurbitáceas, o feijoeiro, a mandioca, o milho, o pimentão e o tomateiro (Morales e Anderson, 2001; Legg e Fauquet, 2004; Martin e Shepherd, 2009; Martin e Elena, 2009). O aumento global da população e distribuição do inseto vetor (a mosca-branca *Bemisia tabaci*), a expansão do cultivo em monocultura e a ocorrência de um maior trânsito global de plantas são considerados os principais fatores que facilitaram a emergência dos geminivírus (Rojas *et al.*, 2005; Navas-Castillo *et al.*, 2011; Gilbertson *et al.*, 2015).

A família é composta pelos gêneros *Begomovirus*, *Becurtovirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus*, definidos com base no tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros, relacionamento filogenético e organização genômica (Brown *et al.*, 2012; Varsani *et al.*, 2014). Os geminivírus possuem genoma composto de DNA fita simples circular envolto por um único tipo de proteína capsidial, e a partícula possui morfologia icosaédrica geminada (Brown *et al.*, 2012). A proteína capsidial é conservada em sua capacidade para formar os vírions, porém é divergente quanto à especificidade pelo inseto vetor (Rojas *et al.*, 2005). A replicação do genoma ocorre pelo mecanismo de círculo rolante (Stenger *et al.*, 1991). Todos os geminivírus possuem uma região intergênica que contém diversos elementos de sequência altamente conservados, incluindo uma estrutura em forma de grampo contendo uma sequência de nove nucleotídeos (5'-TAATATTAC-3') que constitui a origem de replicação, e repetições diretas e invertidas de cinco nucleotídeos, denominadas iterons, essenciais para que a origem seja reconhecida pela proteína viral associada à replicação (Rojas *et al.*, 2005; Rizvi *et al.*, 2015).

2.2. Gênero *Begomovirus*

O gênero *Begomovirus* inclui vírus de plantas de grande relevância para a agricultura, devido à severidade das doenças por eles causadas em diversas culturas de grande importância econômica, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Morales e Anderson, 2001; Monci *et al.*, 2002; Briddon, 2003; Were *et al.*, 2004). A espécie-tipo é o *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) (Fauquet *et al.*, 2008).

Com base em estudos filogenéticos e características do genoma, os begomovírus podem ser divididos em dois grupos: Velho Mundo (Europa, África e Ásia) e Novo Mundo (as Américas) (Rybicki, 1994; Padidam *et al.*, 1999; Paximadis *et al.*, 1999; Briddon *et al.*, 2010). A maioria dos begomovírus do Velho Mundo são monossegmentados e estão associados a DNAs satélites (alfa- e betassatélites) (Mansoor *et al.*, 2003; Zhou, 2013). Os begomovírus nativos do Novo Mundo são bissegmentados (Figura 1), com exceção do *Tomato leaf deformation virus* (ToLDeV), descrito recentemente no Peru e Equador (Melgarejo *et al.*, 2013). O *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), um vírus monossegmentado nativo do Velho Mundo, foi introduzido na República Dominicana no início da década de 1990 e atualmente encontra-se presente em toda América Central, Caribe e em diversos estados do sul e sudoeste dos Estados Unidos (Nahkla *et al.*, 1994; Duffy e Holmes, 2007).

O DNA-A dos begomovírus do Novo Mundo contém cinco genes: *Rep*, que codifica a única proteína essencial à replicação, iniciadora do mecanismo de replicação por círculo rolante (Fontes *et al.*, 1992; Orozco *et al.*, 1997); *Trap*, que codifica um fator transcricional dos genes *CP* e *NSP*, e que também atua como supressora do silenciamento gênico (Voinnet *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2005); *Ren*, que codifica um fator acessório (não essencial) da replicação viral (Sunter *et al.*, 1990; Pedersen e Hanley-Bowdoin, 1994); *AC4*, que codifica uma proteína também envolvida na supressão de silenciamento gênico (Vanitharani *et al.*,

2004); e *CP*, que codifica a proteína capsidial, essencial também para a transmissão do vírus pelo inseto vetor (Bridson *et al.*, 1990; Hofer *et al.*, 1997). O DNA-B contém dois genes: *NSP*, que codifica a proteína responsável pelo transporte do DNA através do envelope nuclear (Noueiry *et al.*, 1994; Sanderfoot e Lazarowitz, 1996), e *MP*, que codifica a proteína envolvida no movimento célula-a-célula do vírus por meio do aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas (Noueiry *et al.*, 1994).

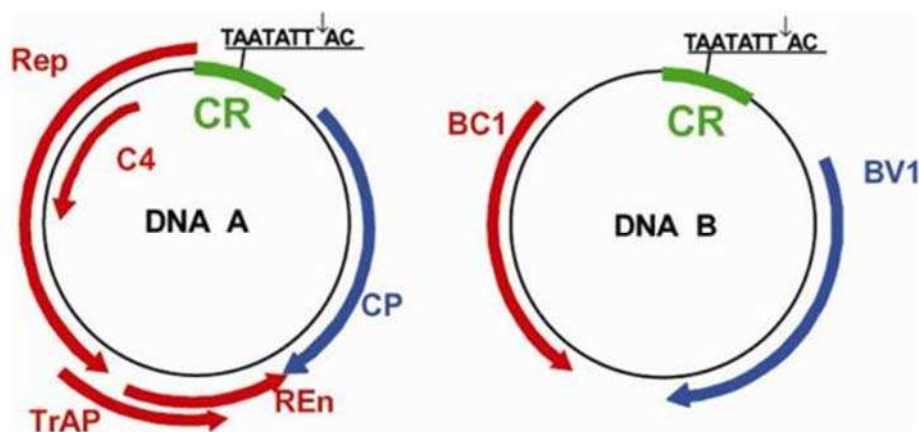


Figura 1. Representação esquemática do genoma do *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV), espécie-tipo do gênero *Begomovirus*. Os círculos representam o genoma viral, com dois componentes (DNA-A e DNA-B) de aproximadamente 2.600 nucleotídeos cada. Uma sequência de aproximadamente 200 nucleotídeos,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

2.3. DNAs satélites associados a begomovírus

A grande maioria das espécies de begomovírus monossegmentados do Velho Mundo está associada a moléculas de DNA fita simples com aproximadamente 1.300 nucleotídeos, denominadas DNAs satélites. Os DNAs satélites podem ser classificados como alfassatélites (anteriormente DNA-1) e betassatélites (anteriormente DNA- β) (Zhou, 2013). Essas moléculas são dependentes de um vírus auxiliar para movimento, encapsidação e transmissão pelo vetor, e no caso dos betassatélites também para a replicação. Alfassatélites e betassatélites têm organização genômica diferente dos begomovírus, porém ambos possuem a estrutura em forma de grampo fundamental para a replicação por círculo rolante (Briddon *et al.*, 2003; Briddon *et al.*, 2004; Zhou, 2013)

Os genomas dos betassatélites não compartilham homologia de sequência com os genomas dos begomovírus auxiliares, com exceção da sequência conservada do nanonucleotídeo TAATATTAC. O genoma contém uma região altamente conservada entre os betassatélites (*satellite conserved region*, SCR), em posição análoga à região comum dos begomovírus; uma região rica em adenina; e um único gene, *betaC1*, codificado no sentido complementar. Tanto a posição no genoma quanto a sequência do gene *betaC1* são conservadas entre os betassatélites (Briddon *et al.*, 2008). A proteína betaC1 é multifuncional e atua como determinante de patogenicidade (Cui *et al.*, 2004) e supressora de silenciamento gênico transcricional (Yang *et al.*, 2011) e pós-transcricional (Li *et al.*, 2014a).

A maioria dos betassatélites modulam a severidade dos sintomas causados pelo begomovírus auxiliar. Experimentos demonstraram que *Tomato yellow leaf curl China virus* (TYLCCNV), *Malvastrum yellow vein virus* (MYVV) e *Ageratum yellow vein China virus* (AYVCNV) são vírus totalmente dependentes da associação com betassatélites para a infecção e indução de sintomas no hospedeiro (Zhou, 2013). Os betassatélites também podem se associar com begomovírus bissegmentados, conforme relatado por Sivalingam e Varma

(2012) na Índia. Neste trabalho, o *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) foi encontrado em associação com o *Cotton leaf curl Multan betasatellite* (CLCuMuB) e *Luffa leaf distortion betasatellite* (LuLDB). Na presença de qualquer um dos betassatélites os sintomas em *Nicotiana benthamiana* e tomateiro foram mais intensos, e também ocorreu um aumento no acúmulo de DNA-A e DNA-B do ToLCNDV. O DNA-B e os betassatélites acumularam de maneira antagônica: o nível de DNA-B foi 16 vezes maior na presença do betassatélite, enquanto que o acúmulo do betassatélite foi reduzido em 60% na presença do DNA-B (Sivalingam e Varma, 2012). Além disso, esse trabalho foi o primeiro a demonstrar o papel de um betassatélite em aumentar a eficiência de transmissão de um begomovírus.

Até o presente, nenhum betassatélite foi relatado em associação com begomovírus bissegmentados no Novo Mundo.

Geralmente, alfassatélites são encontrados juntamente com betassatélites associados a begomovírus monossegmentados no Velho Mundo (Leke *et al.*, 2015). O genoma dos alfassatélites contém um único gene, *alpha-Rep*, que codifica uma proteína essencial à replicação, *alpha-Rep*, similar à *Rep* codificada pelo componente genômico DNA-R dos nanovírus (Zhou, 2013). Consequentemente são capazes de replicar no hospedeiro de forma independente, porém dependem do vírus auxiliar para movimento, encapsidação e transmissão pelo inseto vetor. Além do gene *alpha-Rep*, possuem também uma região rica em adenina e uma estrutura em forma de grampo similar à dos begomovírus. A região rica em adenina é a única característica que permite diferenciar alfassatélites do DNA-R de nanovírus (Zhou, 2013). A estrutura em forma de grampo contém o nanonucleotídeo TAGTATTAC, idêntico ao dos nanovírus e distinto do nanonucleotídeo TAATATTAC conservado entre os begomovírus (Zhou, 2013).

Apesar de terem sido descobertos há quase quinze anos, pouco se sabe sobre o efeito da presença dos alfassatélites na infecção por begomovírus (Zhou, 2013). No Paquistão, dois alfassatélites (*Gossypium darwinii symptomless alphasatellite*, GDarSLA, e *Gossypium*

mustelinium symptomless alphasatellite, GMusSLA) foram relatados junto ao complexo *Cotton leaf curl Rajasthan virus* (CLCuRaV), *Cotton leaf curl Burewala virus* (CLCuBuV) e *Cotton leaf curl Multan betasatellite* (CLCuMuB) em algodoeiro. Ensaios em plantas de *N. benthamiana* demonstraram que na presença dos alfassatélites GDarSLA e GMusSLA ocorre redução no acúmulo do CLCuMuB, e os sintomas iniciais da infecção são atenuados. Ensaios de duplo-híbrido em levedura revelaram que as proteínas alpha-Rep codificadas pelos alfassatélites GDarSLA e GMusSLA são capazes de interagir com as proteínas Rep e C4 do CLCuRaV. Além disso, alpha-Rep também foi capaz de atuar como supressora de silenciamento gênico pós-transcricional (Nawaz-Ul-Rehman *et al.*, 2010).

Recentemente, alfassatélites foram encontrados em associação a begomovírus bissegmentados no Novo Mundo, em plantas não-cultivadas no Brasil e em Cuba (Paprotka *et al.*, 2010; Jeske *et al.*, 2014), e em uma planta cultivada (meloeiro) na Venezuela (Romay *et al.*, 2010). Estes alfassatélites são considerados atípicos por possuírem apenas 47% de identidade de sequência de nucleotídeos com os demais alfassatélites típicos (DNA-1) já descritos (Saunders *et al.*, 2002; Zhou, 2013). Alfassatélites relacionados (originalmente denominados DNA-2, para diferenciar dos alfassatélites típicos, denominados DNA-1) foram relatados em Singapura, Omã, Índia e Paquistão (Saunders *et al.*, 2002; Idris *et al.*, 2011; Zaffalon *et al.*, 2012). A proteína alpha-Rep do alfassatélite isolado no Paquistão atua como supressora de silenciamento gênico pós-transcricional (Nawaz-Ul-Rehman *et al.*, 2010). No estudo realizado por Paprotka *et al.* (2010), os autores observaram que a presença do alfassatélite estava correlacionada com um aumento na severidade dos sintomas causados por uma estirpe do *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV), com enrolamento e distorção foliar mais intensos em plantas de *Euphorbia* spp. Esta foi a primeira (e, até o presente, a única) indicação de que alguns alfassatélites podem estar envolvidos no aumento da patogenicidade de geminivírus.

Na Índia foi relatada a associação de um mastrevírus, o *Wheat dwarf India virus* (WDIV), com DNAs satélites. Duas espécies de alfassatélites, *Cotton leaf curl Multan alphasatellite* (CLCuMA) e *Guar leaf curl alphasatellite* (GLCuA), foram detectadas em diferentes amostras de trigo naturalmente infectadas com o WDIV. Além dos alfassatélites, um betassatélite, *Ageratum yellow leaf curl betasatellite* (AYLCB), também foi identificado nas amostras de trigo (Kumar *et al.*, 2014).

Uma terceira classe de DNAs satélites associados a begomovírus bissegmentados foi descrita recentemente a partir de plantas não-cultivadas em Cuba (Fiallo-Olive *et al.*, 2012a). As moléculas apresentam tamanho aproximado de 700 nucleotídeos, possuem uma estrutura em forma de grampo com a sequência conservada TAATATTAC, sequências similares aos iterons de begomovírus, uma região rica em adenina e uma pequena região com alta identidade com a SCR de betassatélites (Fiallo-Olive *et al.*, 2012a). Recentemente foram encontrados DNAs satélites não codificadores semelhantes infectando batata-doce (*Ipomoea batatas*) e *Ipomoea indica* na Espanha e *Marremia dissecta* na Venezuela (Lozano *et al.*, 2016). Essas moléculas possuem tamanho aproximado de 700 nucleotídeos, região com uma identidade de sequência significativa com a região conservada de betassatélites, uma região com sequência rica em adenina, uma estrutura predita em forma de grampo contendo o nanonucleotídeo TAATATTAC e uma segunda estrutura predita em forma de grampo (Lozano *et al.*, 2016). O nome "deltassatélites" foi proposto para essa classe distinta de DNAs satélites associados a begomovírus (Lozano *et al.*, 2016). Os possíveis efeitos da presença dessas moléculas na infecção por begomovírus é desconhecido.

2.4. Aspectos gerais de begomovírus em *Euphorbia heterophylla*

Euphorbia heterophylla (família Euphorbiaceae) é uma planta herbácea, produtora de látex, de ciclo anual, com rápido crescimento e altamente competitiva. A espécie tem como centro de origem a região Brasil - Paraguai, e está distribuída na maioria das áreas tropicais e

subtropicais do mundo (Wilson, 1981; Kissmann e Groth, 1991). A ocorrência é comum nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil (Cronquist, 1981), onde é considerada uma invasora de grande importância nas culturas da soja e do amendoim (Bridges *et al.*, 1992; Willard e Griffin, 1993). *E. heterophylla* está presente em 74% das áreas produtoras de soja no planalto do Rio Grande do Sul, onde nos últimos anos vêm sendo observados genótipos resistentes a herbicidas (Vidal e Winkler, 2004; Christoffoleti, 2003). Em trabalho realizado para avaliar o comportamento de *B. tabaci* MEAM1 em diferentes espécies daninhas, *E. heterophylla* foi a planta mais atrativa, com média de 12.2 adultos/cm², e apresentou uma das maiores médias de oviposição (Sottoriva *et al.*, 2014).

Relatos de possíveis begomovírus infectando *Euphorbia* sp. no Brasil são encontrados na literatura desde a década de 1950 (Costa e Bennett, 1950). Em 2011, o EuYMV foi isolado de plantas de *E. heterophylla* com sintomas de mosaico amarelo coletadas em Goiás e no Distrito Federal entre 2002 e 2009 (Fernandes *et al.*, 2011). Até o presente, o EuYMV é o único begomovírus relatado naturalmente em *E. heterophylla* no Brasil.

O EuYMV possui características típicas de begomovírus do Novo Mundo, e é capaz de infectar (via inoculação artificial por biobalística) *Datura stramonium*, *Nicotiana benthamiana* e pimentão (*Capsicum annuum* 'Ikeda') (Fernandes *et al.*, 2011). Posteriormente, o vírus também foi encontrado infectando *Euphorbia* sp. e *Sida santaremnensis* em Minas Gerais (Rocha *et al.*, 2013; Tavares *et al.*, 2012) e *Macroptilium atropurpureus* em Pernambuco (Silva *et al.*, 2012). Barreto *et al.* (2013) relataram o EuYMV infectando *Crotalaria* spp. e demonstraram que *E. heterophylla* é hospedeira do *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) quando inoculada artificialmente, embora com baixo título viral. Análise filogenética demonstrou que o EuYMV se agrupa com vírus do México e outros países da América Central e do Sul, juntamente com *Sida yellow leaf curl virus* (SiYLCV), *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV) e *Abutilon Brazil virus* (AbBV) relatados no Brasil (Silva *et al.*, 2012).

Em Miranda, Mato Grosso do Sul, foi relatada a ocorrência de alfassatélite *Euphorbia yellow mosaic alphatellite* (EuYMA) associado a EuYMV em plantas de *E. heterophylla* (Paprotka *et al.*, 2010). O vírus foi capaz de infectar *Arabidopsis thaliana* Col-0 na presença e na ausência do EuYMA, embora na presença do alfassatélite os sintomas tenham sido mais severos (Paprotka *et al.*, 2010).

Na Venezuela, possíveis begomovírus infectando *E. heterophylla* foram descritos por Debrot e Centeno (1986). *E. heterophylla* está amplamente distribuída na Venezuela, frequentemente exibindo sintomas de mosaico amarelo. Em 2012 foi proposta a nova espécie *Euphorbia mosaic Venezuela virus* (EuMVV), encontrada infectando plantas de tomateiro e de *E. heterophylla*. O EuMVV possui organização genômica típica dos begomovírus do Novo Mundo e está filogeneticamente relacionado a isolados de *Euphorbia mosaic virus* (EuMV). O EuMVV também foi capaz de infectar pimentão por biobalística (Zambrano *et al.*, 2012). Também na América do Sul, a partir de amostras de *Euphorbia* sp. coletadas no Peru, uma nova espécie foi proposta com o nome *Euphorbia mosaic Peru virus* (EuMPV) (Shepherd *et al.*, 2008), porém análises posteriores indicaram tratar-se de um isolado de EuYMV (Fernandes *et al.*, 2011).

No México, o EuMV foi identificado infectando *E. heterophylla* na península de Yucatan. O vírus foi capaz de infectar, por biobalística, *D. stramonium*, feijoeiro, pimentão (cv. Anaheim) e tomateiro (cv. Humaya) (Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007). O EuMV também foi identificado em *E. heterophylla* por meio de comparações de sequências parciais do DNA-A em Belize (Mclaughlin *et al.*, 2008) e na Nicarágua (Ala-Poikela *et al.*, 2005). Também há relatos antigos de begomovírus, possivelmente EuMV, infectando *E. heterophylla* na Costa Rica (Kim e Flores, 1979) e na Flórida (Kim e Fulton, 1984). Em Cuba, o EuMV foi detectado ocorrendo naturalmente em *N. benthamiana* (Fiallo-Olivé *et al.*, 2010) e em *E. heterophylla* (Fiallo-Olive *et al.*, 2012b).

2.5. Transmissão de begomovírus e DNAs satélites por *Bemisia tabaci*

A mosca-branca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) é um inseto que causa enormes danos a plantios agrícolas e em culturas ornamentais, devido ao seu hábito alimentício polífago e pelo fato de ser transmissora de diversas espécies de vírus, incluindo os begomovírus (Stansly e Naranjo, 2010; Brown *et al.*, 2015; Ghanim e Czosnek, 2016). A espécie foi descrita em 1889 como uma praga do tabaco na Grécia, com o nome de *Aleyrodes tabaci* (Gennadius, 1889). Foi relatada pela primeira vez como uma praga que causava sérios níveis de perdas na década de 1920, no norte da Índia (Misra e Lamba, 1929). Em 1957 o nome foi modificado para *Bemisia tabaci* (Russell, 1957). Atualmente é distribuída globalmente, com exceção da Antártida (Martin *et al.*, 2000). Devido ao fato de se alimentarem de seiva, esses insetos reduzem o vigor e a produtividade de plantas adultas e podem causar a morte de plantas jovens (Ghanim e Czosnek, 2016).

Atualmente é reconhecido que *B. tabaci* constitui um complexo de pelo menos 24 espécies crípticas (De Barro *et al.*, 2011). A sequência do gene que codifica a citocromo oxidase I mitocondrial (*mtCOI*) é utilizada para definir a separação genética destes insetos (Dinsdale *et al.*, 2010). Esses autores identificaram um "vale" na frequência da distribuição das divergências par-a-par das sequências do gene *mtCOI* em 3,5%, e propuseram que este valor fosse adotado como limiar para a separação das populações em espécies. Com base nesse critério, o biótipo B de *B. tabaci* foi reclassificado como a espécie críptica *B. tabaci* Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1) (Dinsdale *et al.*, 2010). Apesar de MEAM1 predominar no Brasil, recentemente foram descobertas duas espécies nativas de *B. tabaci* em São Paulo e Mato Grosso, New World e New World 2, encontradas predominantemente em plantas não-cultivadas (Marubayashi *et al.*, 2013).

Embora *B. tabaci* seja reconhecida há muitos anos como vetor de vírus, só recentemente foram desenvolvidas ferramentas que permitiram analisar o genoma e o transcriptoma de *B. tabaci*, incluindo as suas bactérias endossimbiontes que são essenciais

para transmissão dos begomovírus. Essas ferramentas incluem a construção de bibliotecas de cDNA a partir de insetos adultos e a partir de diferentes estádios de desenvolvimento, o sequenciamento do transcriptoma e do proteoma, e o estudo da regulação e expressão gênica via silenciamento de RNA (Ghanim e Czosnek, 2016).

A emergência, prevalência e importância econômica das doenças causadas por begomovírus está intimamente relacionada com a distribuição e com o hábito alimentar altamente polífago de *B. tabaci* (Navas-Castillo *et al.*, 2011; Gilbertson *et al.*, 2015). Exemplos de emergência de importantes vírus transmitidos por *B. tabaci* são relatados por Navas-Castillo *et al.* (2011), tais como o TYLCV e o *African cassava mosaic virus* (ACMV). O papel fundamental do vetor é evidente quando se considera que, apesar dos geminivírus serem considerados vírus ancestrais (Rojas *et al.*, 2005), a emergência da maioria das espécies de begomovírus ocorreu ao longo dos últimos 30 anos, seguindo a dispersão global do vetor (Gilbertson *et al.*, 2015).

Os begomovírus são transmitidos por *B. tabaci* de modo persistente circulativo (Ghanim *et al.*, 2007; Gilbertson *et al.*, 2015). As partículas virais são adquiridas via estilete durante o processo de alimentação em plantas infectadas, entram no esôfago e na câmara de filtro, e subsequentemente são transportadas através da parede do intestino para a hemolinfa, onde circulam até adentrarem na glândula salivar, a partir da qual são transmitidas para novas plantas durante a alimentação do inseto (Hunter *et al.*, 1998; Ghanim *et al.*, 2001; Czosnek *et al.*, 2002; Ghanim *et al.*, 2007).

A proteína capsidial (CP) é a única proteína viral essencial para a aquisição e transmissão pelo inseto vetor (Azzam *et al.*, 1994). Para determinar o papel da CP do *Bean golden mosaic virus* (BGMV) na infecção sistêmica e transmissão por vetor, mutações foram inseridas no gene CP do BGMV. Esses mutantes foram capazes de infectar plantas de feijoeiro sistemicamente, porém a CP não foi detectada nas plantas infectadas e o vírus não foi transmitido por *B. tabaci*, demonstrando que a CP é essencial para a transmissão (Azzam

et al., 1994). Hofer *et al.* (1997) demonstraram que uma quimera do begomovírus *Abutilon mosaic virus* (AbMV; não transmitido por mosca-branca) contendo a CP do *Sida golden mosaic virus* (SGMV) foi transmitida para múltiplos hospedeiros por *B. tabaci*, reforçando o papel essencial da CP na interação vírus-vetor. A CP também é responsável pela especificidade dos vírus a seus vetores. Isso foi demonstrado pela substituição do gene CP do begomovírus *African cassava mosaic virus* (ACMV), transmitido por *B. tabaci*, pelo gene CP do curtovírus *Beet curly top virus* (BCTV), transmitido por cigarrinhas. O vírus quimérico resultante foi transmitido pela cigarrinha vetora do BCTV (Bridson *et al.*, 1990).

Os DNAs satélites associados aos begomovírus dependem do vírus auxiliar para a transmissão pelo vetor (Zhou, 2013). Os betassatélites fornecem um benefício para o vírus auxiliar e para *B. tabaci* suprimindo a maquinaria de silenciamento de RNA da planta e reduzindo a expressão de genes envolvidos na resposta de defesa contra insetos, respectivamente (Zhou, 2013; Li *et al.*, 2014b; Gilbertson *et al.*, 2015). Em relação aos alfassatélites, pouco se sabe sobre o seu papel na infecção por begomovírus (Zhou, 2013), e não há estudos na literatura que relatem de forma mais detalhada a transmissão desses satélites por mosca-branca. A aquisição de DNAs satélites associados à begomovírus por outros vírus de ssDNA é facilitada pelo hábito alimentar polífago de *B. tabaci*, e pode resultar na emergência e dispersão de novos complexos de agentes de doenças (Zhou, 2013; Gilbertson *et al.*, 2015).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta, processamento e análise das amostras

Amostras de *E. heterophylla* apresentando sintomas de mosaico e distorção foliar e/ou infestação por *B. tabaci* foram coletadas nos estados do Amazonas, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul, Paraíba e Paraná entre 2009 e 2014. O conjunto de amostras é, portanto, composto de plantas sintomáticas de *E. heterophylla* obtidas ao longo de seis anos em diferentes locais.

Para cada amostra coletada foram registradas a data de coleta, coordenadas geográficas do local de coleta e sintomas (imagem digital da amostra no momento da coleta).

A clonagem e sequenciamento dos genomas virais bem como a identificação dos vírus e satélites encontrados e a construção dos clones infecciosos utilizados nos demais ensaios deste estudo foram realizadas por Mar *et al.* (2015).

Todos os clones utilizados foram inoculados em *E. heterophylla* por biobalística (Aragão *et al.*, 1996) para averiguação da sua capacidade infectiva.

3.2. Ensaio de supressão de silenciamento gênico

O ensaio de supressão de silenciamento foi realizado conforme descrito anteriormente (Llave *et al.*, 2000; Johansen e Carrington, 2001), por meio de co-infiltração, em folhas de *Nicotiana benthamiana*, de culturas de *Agrobacterium tumefaciens* carregando as construções pK7WG2:GFP (expressando a proteína repórter *green fluorescent protein*, GFP), pK7WG2:HC-Pro-PVY (expressando a proteína HC-Pro do *Potato virus Y*; (Anandalakshmi *et al.*, 1998) e pK7WG2:alpha-Rep (expressando a proteína candidata alpha-Rep do EuYMA). Os tratamentos foram: HC-Pro-PVY + GFP (controle positivo); alpha-Rep + GFP; GFP isoladamente (controle negativo). As plantas foram examinadas e fotografadas sob luz UV no

período de 2 a 10 dias após a infiltração (dai) para observar a expressão de GFP, por meio da emissão de fluorescência.

3.3. Ensaio de transmissão por *Bemisia tabaci*

Plantas de *Euphorbia heterophylla* (2-3 dias após germinação) foram inoculadas via biobalística (Aragão *et al.*, 1996): (i) somente com os componentes genômicos do EuYMV (DNA-A + DNA-B), e (ii) com os componentes genômicos do EuYMV mais o EuYMA (DNA-A + DNA-B + DNA-alfa). As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação até 14 dai, para posteriormente serem utilizadas como plantas-fonte para a aquisição pelo vetor. Oligonucleotídeos foram desenhados para amplificar fragmentos correspondentes aos genes *CP* e *MP* do EuYMV e *alpha-Rep* do EuYMA, com comprimentos de 641, 453 e 975 pares de base (bp) respectivamente. Isso foi necessário para confirmar a presença do DNA-A, DNA-B e DNA-alfa, respectivamente, nas plantas inoculadas.

A população inicial de *B. tabaci* MEAM1 foi obtida de colônias avirulíferas estabelecidas em 2008 no Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Viçosa. Os insetos foram mantidos em plantas de repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*), no interior de gaiolas à prova de insetos feitas de madeira e organza (60 cm x 60 cm x 60 cm) sob condições de casa-de-vegetação. Insetos adultos com 0-3 dias de idade foram capturados com auxílio de um aspirador manual, e posteriormente foram liberados dentro de gaiolas à prova de insetos contendo as plantas de *E. heterophylla* previamente infectadas por biobalística. Plantas infectadas com o EuYMV na presença e ausência do EuYMA foram acondicionadas separadamente.

Após um período-acesso de aquisição de 48h, as moscas-brancas sobreviventes foram capturadas e confinadas em plantas saudáveis de *E. heterophylla* com o primeiro par de folhas definitivas completamente expandido, individualizadas no interior de uma pequena gaiola feita de copo plástico, cuja abertura foi coberta por organza para evitar a fuga dos insetos e

permitir a ventilação. Coletaram-se 30 indivíduos para cada planta, uma densidade elevada de insetos, e utilizou-se 20 plantas sadias para cada tratamento (EuYMV na presença ou na ausência do EuYMA). Após um período-acesso de inoculação de 48h, os insetos foram eliminados manualmente. Foram realizadas duas repetições biológicas do ensaio. Como controle negativo, utilizou-se moscas-brancas provenientes diretamente da colônia avirulífera mantida em plantas de repolho, que foram confinadas com plantas sadias de *E. heterophylla* nas mesmas condições de desenvolvimento. Para este controle foram utilizadas três plantas sadias de *E. heterophylla*. Os períodos-acesso de aquisição e inoculação, bem como a idade dos insetos utilizados no experimento, estão em conformidade com os descritos por Polston e Capobianco (2013).

Coletou-se amostras de folhas jovens aos 14 e 28 dias após a inoculação pelo vetor. O DNA dessas amostras foi extraído conforme metodologia descrita por Doyle e Doyle (1987). A detecção do EuYMV e do EuYMA foi realizada via PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos específicos para os genes *CP*, *MP* e *alpha-Rep*.

As taxas de transmissão do vírus na presença e na ausência do alfassatélite foram comparadas e os resultados foram submetidos a análise estatística por meio de teste de independência utilizando-se o pacote *exact.test* do programa R, que realiza os cálculos por meio do teste incondicional de Barnard (Barnard, 1945; Mato e Andrés, 1997; Guo *et al.*, 2015). Comparou-se também, em ambas as datas de coleta (14 e 28 dai), os fenótipos apresentados pelas plantas em ambas as condições de infecção (EuYMV apenas e EuYMV + EuYMA).

4. RESULTADOS

4.1. Detecção, clonagem e caracterização viral a partir das amostras coletadas de *Euphorbia heterophylla*

O EuYMV foi o único vírus detectado nas amostras de *E. heterophylla*, em 126 plantas do total de 165 coletadas. Além disso, o alfassatélite EuYMA também foi detectado, porém em apenas seis amostras, cinco delas coletadas no Rio Grande do Sul e uma delas no Paraná (Mar *et al.*, 2015). Os clones infecciosos do EuYMV (DNA-A e DNA-B) e do EuYMA (DNA-alfa) utilizados neste trabalho foram desenvolvidos por Mar *et al.* (2015) e obtidos de uma mesma amostra do Rio Grande do Sul.

4.2. A presença do EuYMA provoca alterações no fenótipo da infecção pelo EuYMV

As plantas que foram infectadas somente com o vírus apresentaram o sintoma de mosaico amarelo típico e clorose internerval (Figura 2A), semelhante aos descritos na literatura. Porém, as plantas que estavam infectadas com o EuYMV em associação com o EuYMA apresentaram sintomas mais severos que se caracterizaram por mosaico bem mais intenso, com grande parte da área foliar apresentando aspecto branco-amarelado, além de encarquilhamento foliar e redução de crescimento acentuados (Figura 2B, C). Assim, a presença do alfassatélite EuYMA está relacionada com um aumento na severidade dos sintomas provocados pelo EuYMV em seu hospedeiro original, *E. heterophylla*. Essas avaliações fenotípicas foram realizadas aos 14 dias após a inoculação (dai).

Interessantemente, aos 28 dai, algumas plantas de ambas as condições de infecção (EuYMV apenas e EuYMV + EuYMA; nove e cinco plantas, respectivamente) e de ambas repetições, apresentaram uma aparente recuperação em relação aos sintomas. As plantas infectadas somente com o EuYMV passaram a exibir pequenas manchas amarelas (Figura

2D). Já dentre as que estavam infectadas também com o alfassatélite, duas situações foram observadas: algumas plantas passaram a exibir os sintomas de mosaico típico da infecção pelo EuYMV isoladamente, enquanto outras apresentaram somente pequenas manchas amarelas, idênticas àquelas apresentadas pelas plantas infectadas somente com o EuYMV aos 28 dai. De fato, o aumento na severidade dos sintomas observado na presença do alfassatélite parece estar mais evidente aos 14 dai.

Infecção pelo EuYMV isoladamente ou em associação com o alfassatélite foi confirmada via PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para os genes *CP*, *MP* e *alpha-Rep* (Figura 3).

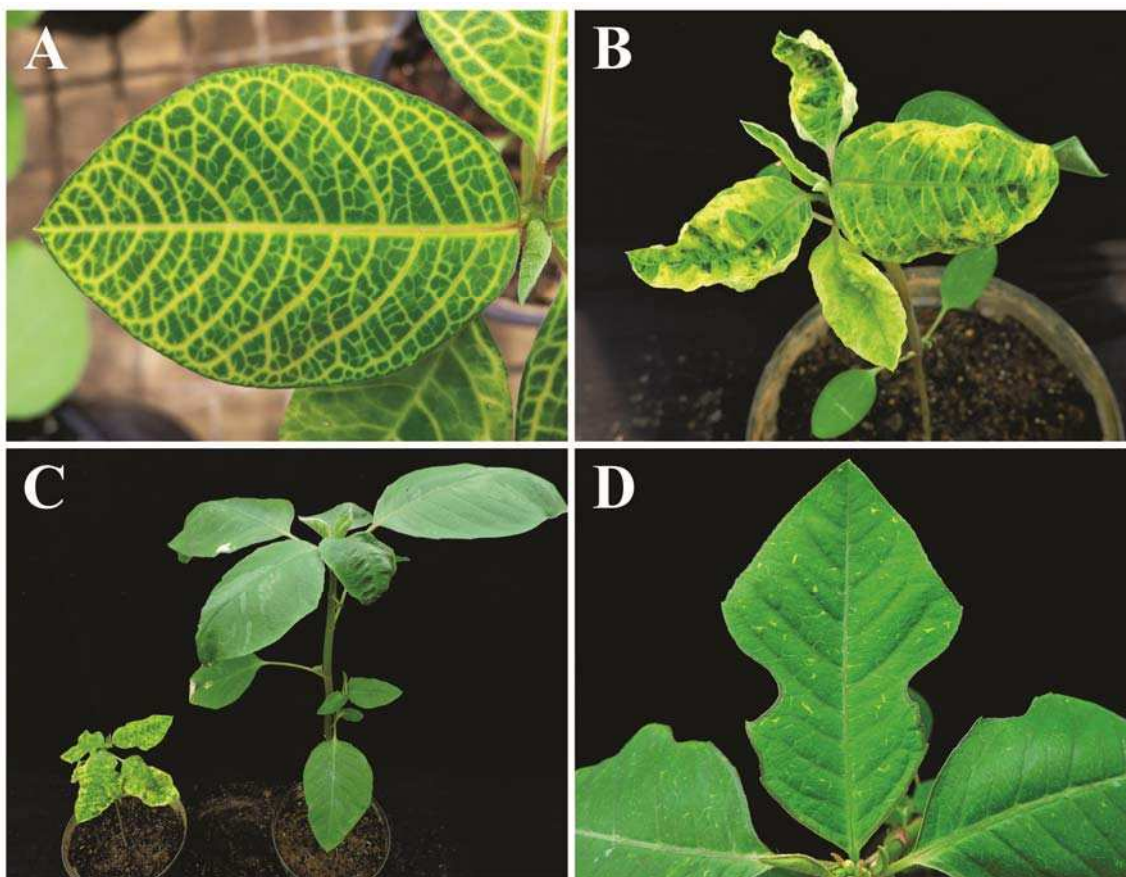


Figura 2. Sintomas induzidos pelo *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV) em *E. heterophylla* na ausência e na presença do *Euphorbia yellow mosaic alphsatellite* (EuYMA). **(A)** Mosaico e clorose internerval típicos da infecção pelo EuYMV isoladamente (14 dai). **(B)** Mosaico severo e encarquilhamento foliar na presença do EuYMA (14 dai). **(C)** Redução do crescimento na presença do EuYMA (14 dai). **(D)** Planta infectada com o EuYMV isoladamente aos 28 dai, apresentando recuperação dos sintomas, exibindo pequenas manchas amarelas; efeito semelhante ao observado em plantas que estavam infectadas com o EuYMV e o EuYMA aos 28 dai.

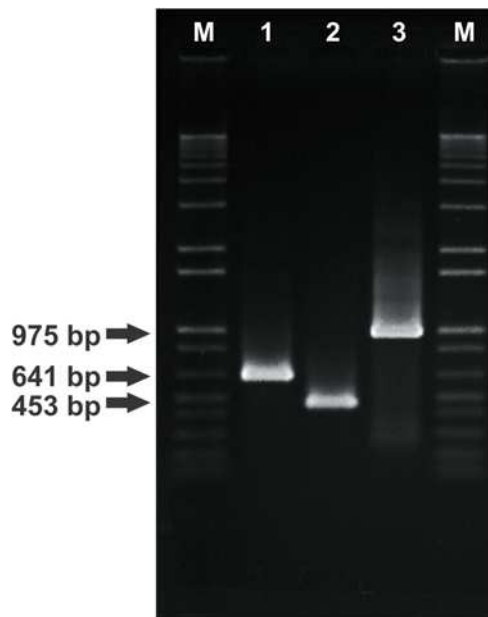


Figura 3. Amplificação de fragmentos dos genes *CP* (1) e *MP* (2) do EuYMV e *alpha-Rep* (3) do EuYMA. M: marcador de comprimento (1Kb Plus DNA Ladder).

4.3. Ensaio de supressão de silenciamento gênico

Uma possível explicação para o fenótipo de aumento na severidade dos sintomas provocados pelo EuYMV na presença do EuYMA, seria que a proteína *alpha-Rep* codificada pelo satélite poderia atuar como supressora de silenciamento gênico. Para testar essa hipótese foi conduzido um ensaio de supressão de silenciamento gênico. Na primeira avaliação [três dias após infiltração (dai)] pode-se observar a fluorescência da proteína GFP em todos os tratamentos. Porém, a emissão de fluorescência na presença da *alpha-Rep* tornou-se praticamente inexistente aos sete dai (Figura 4), acompanhando a emissão de fluorescência de GFP na ausência de qualquer outra proteína (controle negativo). Isso indica que houve silenciamento da expressão de GFP nessas plantas. Em contrapartida, a emissão de fluorescência na presença da proteína HC-Pro (controle positivo) continuou mesmo após 10 dai (Figura 4). Dessa forma, conclui-se que a proteína *alpha-Rep*, codificada pelo EuYMA, não apresenta atividade de supressão de silenciamento gênico local em folhas de *N. benthamiana*

4.4. Ensaio de transmissão por *Bemisia tabaci*

As moscas-brancas obtidas da colônia avirulífera estabelecida na UFV se mostraram capazes de transmitir o vírus e o alfassatélite. Em ambas as repetições biológicas realizadas, a transmissão do EuYMV foi afetada negativamente na presença do EuYMA: menos plantas foram infectadas após inoculação com o EuYMV e EuYMA em comparação com aquelas que foram inoculadas com o EuYMV isoladamente (Tabela 1). Na primeira repetição do ensaio, foi possível detectar o vírus em 17 plantas (dentre 20 inoculadas) após a inoculação a partir de plantas que continham somente os componentes genômicos do EuYMV (DNA-A e DNA-B). Porém, quando o EuYMA também estava presente nas plantas-fonte, o número de plantas infectadas foi de 15 em um total de 20. Na segunda repetição, o número de plantas infectadas foi 18 e 14 quando o EuYMA estava ausente ou presente nas plantas-fonte, respectivamente. O número de plantas infectadas foi o mesmo aos 14 e aos 28 dias para ambos os tratamentos, nas duas repetições biológicas. O controle negativo apresentou o resultado esperado, indicando que as moscas-brancas utilizadas nos ensaios não carregavam previamente partículas do EuYMV nem do EuYMA.

De acordo com a análise estatística realizada, a diferença encontrada entre os tratamentos é estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$), indicando que a presença do alfassatélite pode prejudicar a transmissão do vírus pelo vetor.

Interessantemente, em seis plantas (três inoculadas somente com o EuYMV e três inoculadas com o EuYMV e o EuYMA, considerando-se as duas repetições) foi possível detectar somente o DNA-A do EuYMV. Essas plantas não exibiam sintomas ou apresentavam um sintoma de mosaico amarelo atenuado (Figura 5B). Para fins de quantificação do número de plantas infectadas e análise estatística, essas plantas foram consideradas negativas em relação à infecção pelo vírus. Em um único caso, em uma das plantas que foi inoculada com o EuYMV apenas e na qual se detectou somente o DNA-A aos 14 dai, não foi possível detectar nenhum componente genômico aos 28 dai.

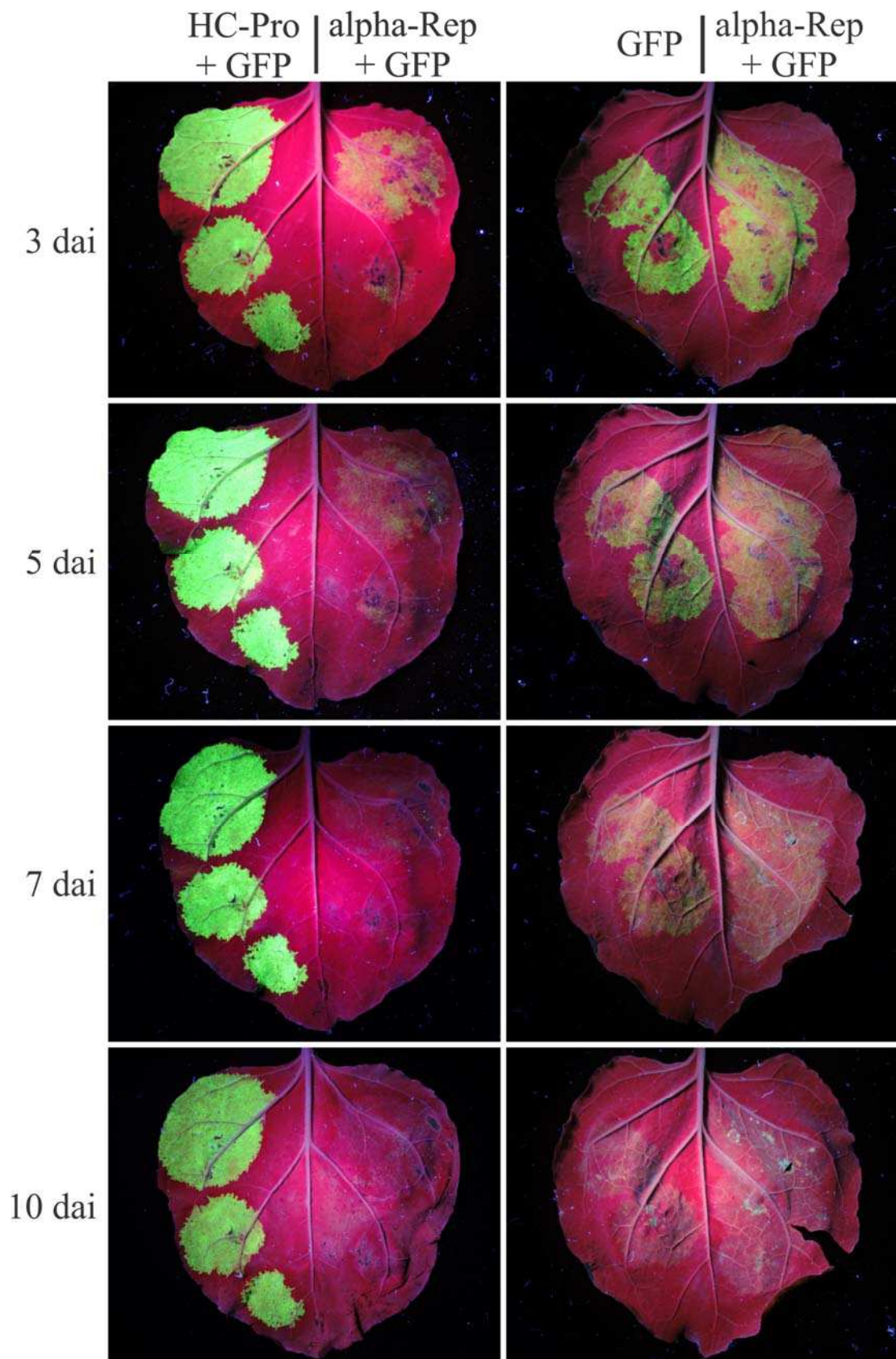


Figura 4. Ensaio de supressão de silenciamento de RNA em folhas de *N. benthamiana*. As folhas foram infiltradas com misturas de culturas de *Agrobacterium tumefaciens* carregando os vetores binários para expressão transitente de GFP, HC-Pro do *Potato virus Y* (PVY) e a alpha-Rep do *Euphorbia yellow mosaic alphasatellite* (EuYMA). Os tratamentos foram: HC-Pro-PVY + GFP (controle positivo); alpha-Rep + GFP; GFP isoladamente (controle negativo) A fluorescência de GFP nos três tratamentos foi monitorada sob luz UV e as folhas foram fotografadas aos 3, 5, 7 e 10 dias após infiltração (dai).

Tabela 1. Número de plantas de *Euphorbia heterophylla* infectadas por meio de inoculação com *Bemisia tabaci* Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1), utilizando como fonte de inóculo plantas com *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV) isoladamente ou EuYMV e *Euphorbia yellow mosaic alphasatellite* (EuYMA).

Repetição	Nº de plantas infectadas / Nº de plantas inoculadas		
	EuYMV ^a	EuYMV e EuYMA ^b	Controle negativo ^c
1	17/20	15/20*	0/3
2	18/20	14/20*	0/3

^aPlantas inoculadas com o EuYMV isoladamente, nas quais foram detectados DNA-A e DNA-B do EuYMV/Número total de plantas inoculadas;

^bPlantas inoculadas com o EuYMV e EuYMA, nas quais foram detectados DNA-A e DNA-B do EuYMV e o DNA genômico do EuYMA/Número total de plantas inoculadas;

^cPlantas das quais se alimentaram moscas-brancas advindas diretamente da colônia avirulífera, nas quais foram detectados DNA-A e/ou DNA-B do EuYMV e/ou o DNA genômico do EuYMA/número total de plantas

*Estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Barnard.

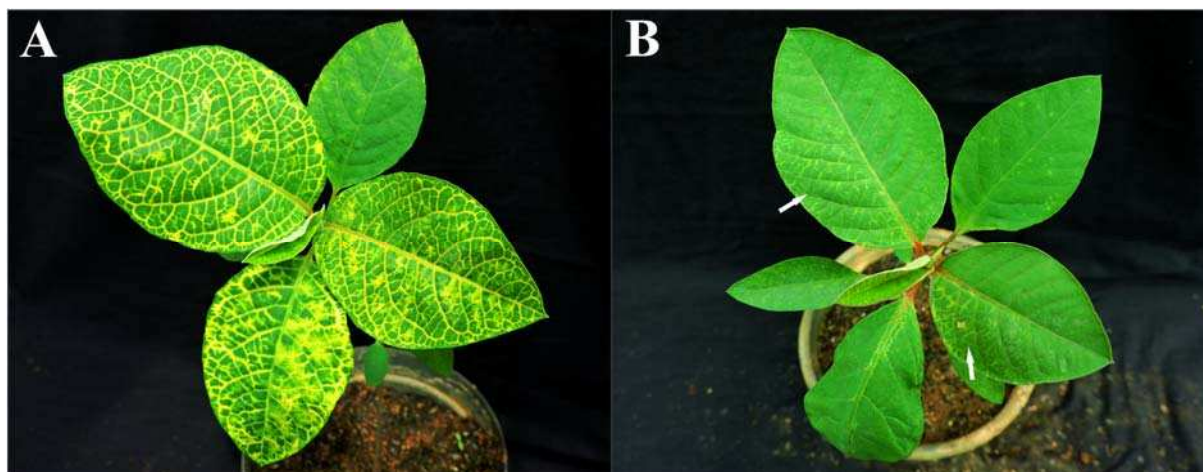


Figura 5. Sintomas exibidos por plantas de *E. heterophylla* quando infectadas com (A) ambos os componentes genômicos (DNA-A e DNA-B) ou (B) somente com o DNA-A do EuYMV. As setas apontam para o sintoma de mosaico atenuado nas plantas infectadas somente com o DNA-A.

5. DISCUSSÃO

A presença do alfassatélite EuYMA promove um aumento na severidade dos sintomas causados pelo begomovírus EuYMV em plantas de *E. heterophylla*. Os sintomas, na presença do satélite, caracterizam-se por mosaico amarelo acentuado, com grande parte da área foliar apresentando um aspecto branco-amarelo, além de encarquilhamento foliar e redução de crescimento. Esses resultados são compatíveis com os descritos por Paprotka *et al.* (2010). Até o presente, o patossistema *E. heterophylla*/EuYMV/EuYMA é o único no qual a presença do alfassatélite aumenta a severidade dos sintomas causados pelo begomovírus. Estudos adicionais devem ser realizados para esclarecer o papel do alfassatélite na infecção.

As plantas de *E. heterophylla*, independentemente da presença do satélite, apresentaram uma recuperação dos sintomas, o que pode ser devido à ativação de respostas de defesa contra vírus, por exemplo, o silenciamento de RNA (Baulcombe, 2004). O fenômeno de recuperação dos sintomas foi observado inicialmente por Wingard (1928), que relatou que plantas de tabaco infectadas pelo *Tobacco ringspot virus* apresentavam recuperação dos sintomas causados pelo vírus nas folhas superiores (mais jovens), que se apresentavam imunes a infecções secundárias. O autor ainda não sabia, mas essa recuperação era devido à maquinaria de silenciamento gênico da planta, que só foi melhor elucidada em 1997 em estudos com o *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) (Covey *et al.*, 1997; Baulcombe, 2004).

As proteínas alpha-Rep codificadas por dois alfassatélites descritos no Paquistão, o *Gossypium darwinii symptomless alphasatellite* (GDarSLA) e o *Gossypium mustelinum symptomless alphasatellite* (GMusSLA), foram capazes de atuar como supressoras de silenciamento gênico (Nawaz-UI-Rehman *et al.*, 2010). Como o EuYMA está relacionado filogeneticamente com o GDarSLA, foi realizado um ensaio de supressão de silenciamento para avaliar se a alpha-Rep codificada pelo EuYMA possui capacidade de suprimir esse mecanismo de defesa, um dos fatores que poderia explicar o aumento da severidade dos

sintomas. Porém, os resultados mostram que a alpha-Rep do EuYMA não exibe atividade supressora de silenciamento gênico local em folhas de *N. benthamiana*. Portanto, o alfassatélite age de alguma outra forma para modular os sintomas causados pelo vírus em *E. heterophylla*.

O mecanismo pelo qual os alfassatélites atuam durante a infecção por begomovírus permanece desconhecido (Zhou, 2013). Tudo o que se sabe até o momento é que a maioria dos alfassatélites atenuam os sintomas causados por begomovírus, reduzindo os níveis de DNA viral na planta (Briddon *et al.*, 2004; Sattar, 2012). Além disso, os alfassatélites também podem reduzir o acúmulo de betassatélites, o que leva à atenuação dos sintomas devido à menor expressão da proteína betaC1, codificada por betassatélites, que atua como supressora de silenciamento gênico (Idris *et al.*, 2011; Sattar, 2012).

Neste estudo, foi demonstrado que a presença do EuYMA interfere negativamente na transmissão do EuYMV por *B. tabaci* MEAM1. Este é o primeiro estudo que tenta esclarecer o papel de um alfassatélite na transmissão de um begomovírus pelo vetor. Isso pode ter acontecido pois, como o alfassatélite não codifica uma proteína capsidial e depende do vírus auxiliar para movimento e transmissão pelo vetor (Zhou, 2013), ele pode competir com o begomovírus pela encapsidação do genoma. Dessa forma, dependendo do acúmulo relativo do alfassatélite e do begomovírus, muitas partículas podem conter o genoma do alfassatélite em detrimento da encapsidação do genoma viral, o que pode reduzir as chances de aquisição e transmissão de partículas contendo o genoma viral pelo vetor. Estudos de quantificação do título viral e do alfassatélite em plantas de *E. heterophylla* são necessários para comprovar essa hipótese. A densidade de insetos utilizada (trinta por planta) foi alta, visto que uma única mosca-branca pode transmitir o vírus e o número de plantas infectadas cresce de forma eficaz à medida que o número de insetos aumenta (Guo *et al.*, 2015). Assim, nesse experimento, a transmissão foi muito favorecida. Apesar de fornecer um resultado considerado estatisticamente significativo, que indica que a diferença obtida no número de plantas

infectadas em cada tratamento é devido à presença do EuYMA, estudos que utilizem densidades menores e gradativas de moscas-brancas por planta, bem como um número maior de plantas, podem fornecer diferenças ainda maiores, permitindo resultados ainda mais conclusivos.

A transmissão do EuYMA foi eficiente, uma vez que em todas as plantas nas quais foi possível detectar o EuYMV (DNA-A + DNA-B), detectou-se também o alfassatélite. Assim, o motivo pelo qual o EuYMA não está amplamente disseminado no campo provavelmente não é devido à baixa eficiência na transmissão pelo vetor. A encapsidação do DNA-alfa na partícula viral provavelmente não altera as propriedades estruturais da CP, que é única proteína essencial para transmissão, e dessa forma, também não prejudica a sua interação com as proteínas GroEL produzidas pelos endossimbiontes presentes no intestino do vetor, que são indispensáveis para a estabilidade das partículas durante sua passagem por esse local (Azzam *et al.*, 1994; Hofer *et al.*, 1997; Morin *et al.*, 1999; Morin *et al.*, 2000). Novamente, deve-se ressaltar que nesse experimento a transmissão foi altamente favorecida, e que estudos que utilizem números menores e gradativos de insetos podem corroborar essa hipótese.

Em algumas plantas de *E. heterophylla* inoculadas, somente o DNA-A do EuYMV foi detectado. Essas plantas não exibiram sintomas ou apresentaram um sintoma de mosaico muito atenuado, praticamente imperceptível. Relatos anteriores indicam que, em casos excepcionais, o DNA-A de begomovírus é capaz de infectar e se movimentar na planta independentemente do DNA-B (Klinkenberg e Stanley, 1990; Evans e Jeske, 1993; Galvão *et al.*, 2003; Weigel *et al.*, 2015). Weigel *et al.* (2015) demonstraram que o DNA-A de begomovírus pode, independentemente do DNA-B, adentrar no núcleo celular de folhas superiores da planta e inclusive replicar nesse local. Mas este é primeiro relato de que o DNA-A sozinho pode provocar, em alguns casos, sintomas na planta infectada. A ausência de sintoma ou a presença de um sintoma bem fraco reforça o papel do DNA-B na infecção por begomovírus.

Nossos resultados sugerem que um alfassatélite, além de provocar aumento na severidade dos sintomas causados por begomovírus, por meio de um mecanismo ainda não elucidado, pode prejudicar a transmissão pelo vetor, o que acaba afetando negativamente a dispersão do vírus. Entender a dinâmica da interação entre begomovírus e os DNAs satélites em plantas não cultivadas, como *E. heterophylla*, se faz importante visto que podem ser transferidos para plantas cultivadas, dado hábito polífago de *B. tabaci*.

6. REFERÊNCIAS

- ALA-POIKELA, M.; SVENSSON, E.; ROJAS, A.; HORKO, T.; PAULIN, L.; VALKONEN, J.P.T.; KVARNHEDEN, A. Genetic diversity and mixed infections of begomoviruses infecting tomato, pepper and cucurbit crops in Nicaragua. **Plant Pathology**, v. 54, p. 448-459, 2005.
- ANANDALAKSHMI, R.; PRUSS, G.J.; GE, X.; MARATHE, R.; MALLORY, A.C.; SMITH, T.H.; VANCE, V.B. A viral suppressor of gene silencing in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 95, p. 13079-13084, 1998.
- ARAGÃO, F.J.L.; BARROS, L.M.G.; BRASILEIRO, A.C.M.; RIBEIRO, S.G.; SMITH, F.D.; SANFORD, J.C.; FARIA, J.C.; RECH, E.L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 93, p. 142-150, 1996.
- 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. Genetic diversity of begomoviruses in invasive species of Northeastern Brazil (in Portuguese). **Planta Daninha**, v. 24, p. 239-244, 2006.
- AZZAM, O.; FRAZER, J.; DE LA ROSA, D.; BEAVER, J.S.; AHLQUIST, P.G.; MAXWELL, D.P. Whitefly transmission and efficient ssDNA accumulation of bean golden mosaic geminivirus require functional coat protein. **Virology**, v. 204, p. 289-296, 1994.
- BARNARD, G. A new test for 2×2 tables. **Nature**, v. 156, p. 177, 1945.
- BARRETO, S.S.; HALLWASS, M.; AQUINO, O.M.; INOUE-NAGATA, A.K. A study of weeds as potential inoculum sources for a tomato-infecting begomovirus in central Brazil. **Phytopathology**, v. 103, p. 436-444, 2013.
- BAULCOMBE, D. RNA silencing in plants. **Nature**, v. 431, p. 356-363, 2004.
- BRIDDON, R.W. Cotton leaf curl disease, a multicomponent begomovirus complex. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, p. 427-434, 2003.
- BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; MORIONES, E.; STANLEY, J.; ZERBINI, F.M.; ZHOU, X.; FAUQUET, C.M. Recommendations for the classification and nomenclature of the DNA-beta satellites of begomoviruses. **Archives of Virology**, v. 153, p. 763-781, 2008.
- 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.; BULL, S.E.; AMIN, I.; MANSOOR, S.; BEDFORD, I.D.; RISHI, N.; SIWATCH, S.S.; ZAFAR, Y.; ABDEL-SALAM, A.M.; MARKHAM, P.G. Diversity of DNA 1: a satellite-like molecule associated with monopartite begomovirus–DNA β complexes. **Virology**, v. 324, p. 462-474, 2004.
- 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, 2010.
- 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.
- BRIDGES, D.C.; BRECKE, B.J.; BARBOUR, J.C. Wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) interference with peanut (*Arachis hypogaea*). **Weed Science**, v. 40, p. 37-42, 1992.
- 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. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London, UK: Elsevier Academic Press, 2012. p. 351-373.

- BROWN, J.K.; ZERBINI, F.M.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E.; RAMOS-SOBRINHO, R.; SILVA, J.C.; FIALLO-OLIVE, E.; BRIDDON, R.W.; HERNANDEZ-ZEPEDA, C.; IDRIS, A.; MALATHI, V.G.; MARTIN, D.P.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.; UEDA, S.; VARSANI, A. Revision of *Begomovirus* taxonomy based on pairwise sequence comparisons. **Archives of Virology**, v. 160, p. 1593-1619, 2015.
- 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.
- CHRISTOFFOLETI, P.; LÓPEZ-OVEJERO, R.; CARVALHO, J. **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. Londrina: Associação Brasileira de Ação a Resistência de Plantas Daninhas aos Herbicidas, 2003.
- COSTA, A.S.; BENNETT, C.W. Whitefly transmitted mosaic of *Euphorbia prunifolia*. **Phytopathology**, v. 40, p. 266-283, 1950.
- COVEY, S.N.; AL-KAFF, N.S.; LANGARA, A.; TURNER, D.S. Plants combat infection by gene silencing. **Nature**, v. 385, p. 781-782, 1997.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.
- 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.
- CZOSNEK, H.; GHANIM, M.; GHANIM, M. The circulative pathway of begomoviruses in the whitefly vector *Bemisia tabaci*-insights from studies with *Tomato yellow leaf curl virus*. **Annals of Applied Biology**, v. 140, p. 215-232, 2002.
- DE BARRO, P.J.; LIU, S.S.; BOYKIN, L.M.; DINSDALE, A.B. *Bemisia tabaci*: A statement of species status. **Annual Review of Entomology**, v. 56, p. 1-19, 2011.
- DEBROT, E.; CENTENO, F. Ocurrencia del virus mosaico de las euforbiáceas infectando a *Euphorbia heterophylla* L. en Venezuela. **Agronomía Tropical**, v. 35, p. 5-12, 1986.
- DINSDALE, A.; COOK, L.; RIGINOS, C.; BUCKLEY, Y.M.; DE BARRO, P. Refined global analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) mitochondrial cytochrome oxidase 1 to identify species level genetic boundaries. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 103, p. 196-208, 2010.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.
- DUFFY, S.; HOLMES, E.C. Multiple introductions of the old world Begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus* into the new world. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 7114-7117, 2007.
- EVANS, D.; JESKE, H. DNA B facilitates, but is not essential for, the spread of *Abutilon mosaic virus* in agroinoculated *Nicotiana benthamiana*. **Virology**, v. 194, p. 752-757, 1993.
- FARIA, J.C.; MAXWELL, D.P. Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. **Phytopathology**, v. 89, p. 262-268, 1999.
- FAUQUET, C.M.; 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.
- 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.

- FIALLO-OLIVE, E.; MARTINEZ-ZUBIAUR, Y.; MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J. A novel class of DNA satellites associated with New World begomoviruses. **Virology**, v. 426, p. 1-6, 2012a.
- FIALLO-OLIVE, E.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E.; MARTINEZ-ZUBIAUR, Y. Begomoviruses infecting weeds in Cuba: Increased host range and a novel virus infecting *Sida rhombifolia*. **Archives of Virology**, v. 157, p. 141-146, 2012b.
- FIALLO-OLIVÉ, E.; ZERBINI, F.M.; NAVAS-CASTILLO, J. Complete nucleotide sequences of two new begomoviruses infecting the wild malvaceous plant *Melochia* sp. in Brazil. **Archives of Virology**, v. 160, p. 3161-3164, 2015.
- FIALLO-OLIVÉ, E.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.; MARTÍNEZ-ZUBIAUR, Y. First report of tobacco as a natural host of *Euphorbia mosaic virus* in Cuba. **Plant Pathology**, v. 59, p. 795-795, 2010.
- 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.
- 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.
- GENNADIUS, P. Disease of tobacco plantations in the Trikonía. The aleurodid of tobacco. **Ellenike Georgia**, v. 5, p. 1-3, 1889.
- GHANIM, M.; CZOSNEK, H. **Interactions between the whitefly *Bemisia tabaci* and begomoviruses: Biological and genomic perspectives**. In: CZOSNEK, H.; GHANIM, M. (Ed.). *Management of Insect Pests to Agriculture*. Amsterdam: Springer International Publishing, 2016. p. 181-200.
- GHANIM, M.; MORIN, S.; CZOSNEK, H. Rate of *Tomato yellow leaf curl virus* translocation in the circulative transmission pathway of its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. **Phytopathology**, v. 91, p. 188-196, 2001.
- GHANIM, M.; SOBOL, I.; GHANIM, M.; CZOSNEK, H. Horizontal transmission of begomoviruses between *Bemisia tabaci* biotypes. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 1, p. 195-204, 2007.
- GILBERTSON, R.L.; BATUMAN, O.; WEBSTER, C.G.; ADKINS, S. Role of the insect super-vectors *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis* in the emergence and global spread of plant viruses. **Annual Review of Virology**, v. 2, p. 67-93, 2015.
- GUO, T.; GUO, Q.; CUI, X.-Y.; LIU, Y.-Q.; HU, J.; LIU, S.-S. Comparison of transmission of *Papaya leaf curl China virus* among four cryptic species of the whitefly *Bemisia tabaci* complex. **Scientific Reports**, v. 5, 2015.
- 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.
- HERNANDEZ-ZEPEDA, C.; IDRIS, A.M.; CARNEVALI, G.; BROWN, J.K.; MORENO-VALENZUELA, O.A. Molecular characterization and experimental host range of *Euphorbia mosaic virus-Yucatan Peninsula*, a begomovirus species in the *Squash leaf curl virus* clade. **Plant Pathology**, v. 56, p. 763-770, 2007.
- 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, 1997.
- HUNTER, W.B.; HIEBERT, E.; WEBB, S.E.; TSAI, J.H.; POLSTON, J.E. Location of geminiviruses in the whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera : Aleyrodidae). **Plant Disease**, v. 82, p. 1147-1151, 1998.

- IDRIS, A.M.; SHAHID, M.S.; BRIDDON, R.W.; KHAN, A.J.; ZHU, J.K.; BROWN, J.K. An unusual alphasatellite associated with monopartite begomoviruses attenuates symptoms and reduces betasatellite accumulation. **Journal of General Virology**, v. 92, p. 706-717, 2011.
- JESKE, H.; KOBER, S.; SCHÄFER, B.; STROHMEIER, S. Circomics of Cuban geminiviruses reveals the first alpha-satellite DNA in the Caribbean. **Virus Genes**, v. 49, p. 312-324, 2014.
- JOHANSEN, L.K.; CARRINGTON, J.C. Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the Agrobacterium-mediated transient expression system. **Plant Physiology**, v. 126, p. 930-938, 2001.
- KIM, K.; FLORES, E. Nuclear changes associated with *Euphorbia mosaic virus* transmitted by the whitefly. **Phytopathology**, v. 69, p. 980-984, 1979.
- KIM, K.S.; FULTON, R.W. Ultrastructure of *Datura stramonium* infected with an euphorbia virus suggestive of a whitefly-transmitted geminivirus. **Phytopathology**, v. 74, p. 236-241, 1984.
- KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. Basf Brasileira, 1991.
- KLINKENBERG, F.A.; STANLEY, J. Encapsidation and spread of *African cassava mosaic virus* DNA-A in the absence of DNA-B when agroinoculated to *Nicotiana benthamiana*. **Journal General Virology**, v. 71, p. 1409-1412, 1990.
- KUMAR, J.; KUMAR, J.; SINGH, S.P.; TULI, R. Association of satellites with a mastrevirus in natural infection: complexity of *Wheat dwarf India virus* disease. **Journal of Virology**, v. 88, p. 7093-7104, 2014.
- LEGG, J.; FAUQUET, C. Cassava mosaic geminiviruses in Africa. **Plant Molecular Biology**, v. 56, p. 585-599, 2004.
- LEKE, W.N.; MIGNOUNA, D.B.; BROWN, J.K.; KVARNHEDEN, A. Begomovirus disease complex: emerging threat to vegetable production systems of West and Central Africa. **Agriculture & Food Security**, v. 4, p. 1, 2015.
- LI, F.; HUANG, C.; LI, Z.; ZHOU, X. Suppression of RNA silencing by a plant DNA virus satellite requires a host calmodulin-like protein to repress *RDR6* expression. **PLoS Pathogens**, v. 10, p. e1003921, 2014a.
- LI, R.; WELDEGERGIS, B.T.; LI, J.; JUNG, C.; QU, J.; SUN, Y.; QIAN, H.; TEE, C.; VAN LOON, J.J.; DICKE, M. Virulence factors of geminivirus interact with MYC2 to subvert plant resistance and promote vector performance. **The Plant Cell**, v. 26, p. 4991-5008, 2014b.
- LLAVE, C.; KASSCHAU, K.D.; CARRINGTON, J.C. Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 97, p. 13401-13406, 2000.
- LOZANO, G.; TRENADO, H.P.; FIALLO-OLIVÉ, E.; CHIRINOS, D.; GERAUD-POUEY, F.; BRIDDON, R.W.; NAVAS-CASTILLO, J. Characterization of NON-Coding DNA satellites associated with sweepviruses (genus *Begomovirus*, *Geminiviridae*) - Definition of a distinct class of begomovirus-associated satellites. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.
- MANSOOR, S.; BRIDDON, R.W.; ZAFAR, Y.; STANLEY, J. Geminivirus disease complexes: An emerging threat. **Trends in Plant Science**, v. 8, p. 128-134, 2003.
- MAR, T.B.; ALVES, M.S.; BARBOSA, L.R.; AMARAL, J.G.; PEREIRA, H.M.B.; MENDES, I.R.; FIALLO-OLIVE, E.; NAVAS-CASTILLO, J.; LAU, D.; ZERBINI, F.M. Host range of *Euphorbia yellow mosaic virus* and its associated alphasatellite. **Virus Reviews and Research**, v. 20 Supplement 1, p. 198-198, 2015.
- MARTIN, D.P.; SHEPHERD, D.N. The epidemiology, economic impact and control of maize streak disease. **Food Security**, v. 1, p. 305-315, 2009.
- MARTIN, J.; MIFSUD, D.; RAPISARDA, C. The whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) of Europe and the Mediterranean basin. **Bulletin of Entomological Research**, v. 90, p. 407-448, 2000.

- MARTIN, S.; ELENA, S.F. Application of game theory to the interaction between plant viruses during mixed infections. **Journal of General Virology**, v. 90, p. 2815-2820, 2009.
- MARUBAYASHI, J.M.; YUKI, V.A.; ROCHA, K.C.G.; MITUTI, T.; PELEGRINOTTI, F.M.; FERREIRA, F.Z.; MOURA, M.F.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E.; PAVAN, M.A.; KRAUSE-SAKATE, R. At least two indigenous species of the *Bemisia tabaci* complex are present in Brazil. **Journal of Applied Entomology**, v. 137, p. 113-121, 2013.
- MATO, A.S.; ANDRÉS, A.M. Simplifying the calculation of the P-value for Barnard's test and its derivatives. **Statistics and Computing**, v. 7, p. 137-143, 1997.
- MCLAUGHLIN, P.D.; MCLAUGHLIN, W.A.; MAXWELL, D.P.; ROYE, M.E. Identification of begomoviruses infecting crops and weeds in Belize. **Plant Viruses**, v. 2, p. 58, 2008.
- 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.
- MISRA, C.S.; LAMBA, K.S. **The cotton white-fly (*Bemisia gossypiperda*, n. sp.)**. Government of India Central Publication Branch, 1929.
- 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.; ANDERSON, P.K. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. **Archives of Virology**, v. 146, p. 415-441, 2001.
- MORIN, S.; GHANIM, M.; SOBOL, I.; CZOSNEK, H. The GroEL protein of the whitefly *Bemisia tabaci* interacts with the coat protein of transmissible and nontransmissible begomoviruses in the yeast two-hybrid system. **Virology**, v. 276, p. 404-416., 2000.
- MORIN, S.; GHANIM, M.; ZEIDAN, M.; CZOSNEK, H.; VERBEEK, M.; VAN DEN HEUVEL, J.F. A GroEL homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl virus. **Virology**, v. 256, p. 75-84, 1999.
- NAHKLA, M.K.; MAXWELL, M.D.; HIDAYAT, S.H.; LANGE, D.R.; LONIELLO, A.O.; ROJAS, M.R.; MAXWELL, D.P.; KITAJIMA, E.W.; ROJAS, A.; ANDERSON, P.; GILBERTSON, R.L. Two geminiviruses associated with tomatoes in Central America. **Phytopathology**, v. 84, p. 467, 1994.
- NAVAS-CASTILLO, J.; FIALLO-OLIVÉ, E.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, p. 219-248, 2011.
- NAWAZ-UL-REHMAN, M.S.; NAHID, N.; MANSOOR, S.; BRIDDON, R.W.; FAUQUET, C.M. Post-transcriptional gene silencing suppressor activity of two non-pathogenic alphasatellites associated with a begomovirus. **Virology**, v. 405, p. 300-308, 2010.
- 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.
- OROZCO, B.M.; MILLER, A.B.; SETTLAGE, S.B.; HANLEY-BOWDOIN, L. Functional domains of a geminivirus replication protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 9840-9846, 1997.
- PADIDAM, M.; SAWYER, S.; FAUQUET, C.M. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. **Virology**, v. 265, p. 218-224, 1999.
- 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, 2010.
- PAXIMADIS, M.; IDRIS, A.M.; TORRES-JEREZ, I.; VILLARREAL, A.; REY, M.E.C.; BROWN, J.K. Characterization of tobacco geminiviruses in the Old and New world. **Archives of Virology**, v. 144, p. 703-717, 1999.

- PEDERSEN, T.J.; HANLEY-BOWDOIN. Molecular characterization of the AL3 protein encoded by a bipartite geminivirus. **Virology**, v. 202, p. 1070-1075, 1994.
- PINTO, V.B.; SILVA, J.P.; FIALLO-OLIVÉ, E.; NAVAS-CASTILLO, J.; ZERBINI, F.M. Novel begomoviruses recovered from *Pavonia* sp. in Brazil. **Archives of Virology**, v. 161, p. 735-739, 2016.
- POLSTON, J.E.; CAPOBIANCO, H. Transmitting plant viruses using whiteflies. **Journal of Visualized Experiments**, 2013.
- RIZVI, I.; CHOUDHURY, N.R.; TUTEJA, N. Insights into the functional characteristics of geminivirus rolling-circle replication initiator protein and its interaction with host factors affecting viral DNA replication. **Archives of Virology**, v. 160, p. 375-387, 2015.
- ROCHA, C.S.; CASTILLO-URQUIZA, G.P.; LIMA, A.T.M.; SILVA, F.N.; XAVIER, C.A.D.; HORA-JUNIOR, B.T.; BESERRA-JUNIOR, J.E.A.; MALTA, A.W.O.; MARTIN, D.P.; VARSANI, A.; ALFENAS-ZERBINI, P.; MIZUBUTI, E.S.G.; ZERBINI, F.M. Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly evolving, and segregated based on geographical location. **Journal of Virology**, v. 87, p. 5784-5799, 2013.
- ROJAS, M.R.; HAGEN, C.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 361-394, 2005.
- ROMAY, G.; CHIRINOS, D.; GERAUD-POUEY, F.; DESBIEZ, C. Association of an atypical alphasatellite with a bipartite New World begomovirus. **Archives of Virology**, v. 155, p. 1843-1847, 2010.
- RUSSELL, L., M. Synonyms of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae). **Bulletin of the Brooklyn Entomological Society**, v. 52, p. 122-123, 1957.
- RYBICKI, E.P. A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of *Geminiviridae*. **Archives of Virology**, v. 139, p. 49-77, 1994.
- SANCHEZ-CAMPOS, S.; MARTINEZ-AYALA, A.; MARQUEZ-MARTIN, B.; ARAGON-CABALLERO, L.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E. Fulfilling Koch's postulates confirms the monopartite nature of tomato leaf deformation virus: A begomovirus native to the New World. **Virus Research**, v. 173, p. 286-293, 2013.
- SANDERFOOT, A.A.; LAZAROWITZ, S.G. Getting it together in plant virus movement: Cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. **Trends in Cell Biology**, v. 6, p. 353-358, 1996.
- SATTAR, M.N. **Diversity and interactions of begomoviruses and their associated DNA-satellites**. Ph.D. Thesis (Plant Virology). Department of Plant Biology and Forest Genetics, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala. 74 p., 2012.
- 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. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 907-913, 2002.
- SHEPHERD, D.N.; MARTIN, D.P.; LEFEUVRE, P.; MONJANE, A.L.; OWOR, B.E.; RYBICKI, E.P.; VARSANI, A. A protocol for the rapid isolation of full geminivirus genomes from dried plant tissue. **Journal of Virological Methods**, v. 149, p. 97-102, 2008.
- 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.
- SIVALINGAM, P.N.; VARMA, A. Role of betasatellite in the pathogenesis of a bipartite begomovirus affecting tomato in India. **Archives of Virology**, v. 157, p. 1081-1092, 2012.

- SOTTORIVA, L.D.M.; LOURENÇÃO, A.L.; COLOMBO, C.A. Performance of *Bemisia tabaci* (Genn.) biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) on weeds. **Neotropical Entomology**, v. 43, p. 574-581, 2014.
- STANSLY, P.A.; NARANJO, S.E. ***Bemisia: Bionomics and management of a global pest.*** Amsterdam: Springer, 2010.
- 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.
- 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.; GONZALEZ-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.
- VANITHARANI, R.; CHELLAPPAN, P.; PITA, J.S.; FAUQUET, C.M. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. **Journal of Virology**, v. 78, p. 9487-9498, 2004.
- VARSANI, A.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E.; HERNÁNDEZ-ZEPEDA, C.; IDRIS, A.; BROWN, J.K.; ZERBINI, F.M.; MARTIN, D.P. Establishment of three new genera in the family *Geminiviridae*: *Becurtovirus*, *Eragrovirus* and *Turncurtovirus*. **Archives of Virology**, v. 159, p. 2193-2203, 2014.
- VIDAL, R.A.; MEROTTO JR, A. Resistência de amendoim-bravo aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase. **Planta Daninha**, v. 17, p. 367-373, 1999.
- VIDAL, R.A.; WINKLER, L.M. *Euphorbia heterophylla* L. resistant to herbicide inhibitors of acetolactate synthase: II - Geographic distribution and genetic characterization of biotypes from Rio Grande do Sul plains. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 10, p. 461-465, 2004.
- 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.
- 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.
- WEIGEL, K.; POHL, J.O.; WEGE, C.; JESKE, H. A population genetics perspective on geminivirus infection. **Journal of Virology**, v. 89, p. 11926-11934, 2015.
- WERE, H.K.; WINTER, S.; MAISS, E. Viruses infecting cassava in Kenya. **Plant Disease**, v. 88, p. 17-22, 2004.
- WILLARD, T.S.; GRIFFIN, J.L. Soybean (*Glycine max*) yield and quality responses associated with wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) control programs. **Weed Technology**, v. 7, p. 118-122, 1993.
- WILSON, A.K. *Euphorbia heterophylla*: A review of distribution, importance and control. **Tropical Pest Management**, v. 27, p. 32-38, 1981.
- WINGARD, S.A. Hosts and symptoms of ring spot, a virus disease of plants. **Journal of Agricultural Research**, v. 37, p. 127, 1928.
- WU, P.J.; ZHOU, X.P. Interaction between a nanovirus-like component and the Tobacco curly shoot virus/satellite complex. **Acta Biochimica Et Biophysica Sinica**, v. 37, p. 25-31, 2005.
- YANG, X.L.; XIE, Y.; RAJA, P.; LI, S.Z.; WOLF, J.N.; SHEN, Q.T.; BISARO, D.M.; ZHOU, X.P. Suppression of methylation-mediated transcriptional gene silencing by betaC1-SAHH protein interaction during geminivirus-beta-satellite infection. **PLoS Pathogens**, v. 7, 2011.

- ZAFFALON, V.; MUKHERJEE, S.K.; REDDY, V.S.; THOMPSON, J.R.; TEPFER, M. A survey of geminiviruses and associated satellite DNAs in the cotton-growing areas of northwestern India. **Archives of Virology**, v. 157, p. 483-495, 2012.
- 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.
- ZHOU, X. Advances in understanding begomovirus satellites. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, p. 357-381, 2013.