



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

**DIVERSIDADE DE BEGOMOVÍRUS MONO E BIPARTIDOS  
INFECTANDO TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum*) e  
BATATEIRA-DOCE (*Ipomoea batatas*) DO BRASIL**

**Leonardo Cunha de Albuquerque**

**Brasília – DF**

**2012**

Leonardo Cunha de Albuquerque

**DIVERSIDADE DE BEGOMOVÍRUS MONO E BIPARTIDOS  
INFECTANDO TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum*) e  
BATATEIRA-DOCE (*Ipomoea batatas*) DO BRASIL**

Tese apresentada à Universidade  
de Brasília como requisito  
parcial para a obtenção do título  
de Doutor em Fitopatologia  
pelo Programa de Pós-  
Graduação em Fitopatologia

**Orientadora**

Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata

**Co-orientador**

Dr. Jesús Navas-Castillo

**BRASÍLIA  
DISTRITO FEDERAL - BRASIL**

**2012**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Albuquerque, Leonardo Cunha de.

Diversidade de begomovírus mono e bipartidos infectando tomateiro (*Solanum lycopersicum*) e batateira-doce (*Ipomoea batatas*) do Brasil. / Leonardo Cunha de Albuquerque.

Brasília, 2012.

146 p.

Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília.

1. Diversidade – Begomovírus.

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Diversidade de begomovírus mono e bipartidos infectando tomateiro (*Solanum lycopersicum*) e batateira-doce (*Ipomoea batatas*) do Brasil

Aos meus pais Francisco Eudes e  
Francisca Fátima C. de Albuquerque  
e aos meus irmãos Gladson e Leila  
C. de Albuquerque, *dedico*.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço especialmente a minha orientadora Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata, pelos ensinamentos, orientação, profissionalismo, amizade, paciência, conselhos e incentivos durante a realização deste trabalho.

Muito obrigado Dr. Renato Resende pelo apoio e pela oportunidade de realizar o meu doutorado sanduíche na Espanha juntamente com o grupo de “La Mayora”.

Muito obrigado Dr. Jesús Navas-Castillo pela orientação, amizade, ensinamentos e apoio que a partir do meu período sanduíche foram fundamentais para minha formação.

À minha família de um modo geral, em especial aos meus pais Francisco Eudes de Albuquerque e Francisca Fátima C. de Albuquerque e meus irmãos Leila e Gladson C. de Albuquerque pelo amor, compreensão e confiança.

À minha namorada Greice Martins, pelo carinho, amor, paciência e apoio. A sua família Hilda Rosa e José Roberto pela amizade e carinho.

Aos meus amigos Cristiano Amorim, Juarez Junior e Wellington Zahn pela amizade e incentivo.

Aos companheiros da Embrapa Hortaliças, Lúcio Flávio Barbosa e Oneilson Medeiros de Aquino pela colaboração e alegria, fundamentais durante a condução de toda a tese.

As colegas de laboratório da Embrapa Hortaliças Fernanda Rausch Fernandes, Sarah da Silva Barreto, Mariana Hallwass e Bruna Pinheiro pela companhia e paciência.

Aos amigos do laboratório de virologia de “La Mayora” Anelise, Paco, Patrícia, Reme, Belén, Carmen, Diego, Elena, Isa, Juan, Maria Victoria, enfim, a todos pelos bons momentos vividos.

Obrigado Dr. Enrique Moriones pela atenção e exemplo de profissionalismo.

Aos professores, funcionários e colegas do curso de Pós-Graduação em Fitopatologia, pelos ensinamentos científicos.

Ao CNPq e Capes pelo auxílio financeiro concedido.

À Embrapa Hortaliças por oferecer a infraestrutura para a execução dos experimentos.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da **Dra. Alice Kazuko Inoue Nataga**, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e institucional da Embrapa Hortaliças (CNPH).

**DIVERSIDADE DE BEGOMOVÍRUS MONO E BIPARTIDOS INFECTANDO TOMATEIRO  
(*Solanum lycopersicum*) E BATATEIRA-DOCE (*Ipomoea batatas*) DO BRASIL**

**Leonardo Cunha de Albuquerque**

TESE APROVADA em \_\_/\_\_/\_\_\_\_ por:

---

Dr. Francisco Murilo Zerbini

Departamento de Fitopatologia da Universidade de Viçosa (Examinador Externo)

---

Dr. Francisco José Lima Aragão

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Examinador Externo)

---

Dra. Mirtes Freitas Lima

Embrapa CNPH (Examinador Externo)

---

Dra. Rita de Cássia Pereira Carvalho

Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília (Examinador Interno)

---

Dra. Alice Kazuko Inoue Nagata

Embrapa CNPH (Orientadora - Presidente)

---

Dr. Renato de Oliveira Resende

Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília (Suplente)

---

Dra. Fernanda Rausch Fernandes

Embrapa CNPH (Suplente)

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL

BRASIL

2012

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b>	i
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	ii
<b>RESUMO GERAL</b>	v
<b>GENERAL ABSTRACT</b>	vii
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	ix
<b>OBJETIVO GERAL</b>	xii
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	xii
<b>CAPÍTULO 1: Revisão de literatura</b>	1
1. Família <i>Geminiviridae</i>	2
2. Características moleculares do gênero <i>Begomovirus</i>	12
3. Replicação da família <i>Geminiviridae</i>	20
4. Variabilidade genética dos begomovírus	22
5. Transmissão de begomovírus pelo vetor mosca-branca ( <i>Bemisia tabaci</i> )	29
6. Begomovírus em tomateiro no Brasil	31
7. Begomovírus em batateira-doce no Brasil	34
8. Literatura citada	37
<b>CAPÍTULO 2: Caracterização molecular de begomovírus infectando tomateiro no Brasil</b>	60
1. Introdução	63
2. Material e Métodos	63
2.1. Seleção de amostras	63
2.2. Clonagem	64
2.3. Análise das sequências	64
3. Resultados e Discussão	65
4. Literatura citada	74
<b>CAPÍTULO 3: Nova espécie de begomovírus monopartido infectando batateira-doce no Brasil</b>	76
1. Introdução	79
2. Material e Métodos	79
2.1. Origem da amostra	79
2.2. Clonagem	80

2.3.	Análise das sequências	80
3.	Resultados e Discussão	80
4.	Literatura citada	87
<b>Capítulo 4: Diversidade genética e análise de recombinação de sweepovírus no Brasil</b>		90
1.	Introdução	93
2.	Material e Métodos	95
2.1.	Coleção de amostras e extração de DNA	95
2.2.	Estratégia para clonagem	95
2.3.	Diversidade genética	96
2.4.	Análise filogenética	96
2.5.	Análises de recombinação	96
3.	Resultados	97
3.1.	Análises das sequências completas dos genomas de sweepovírus	97
3.2.	Análise taxonômica e filogenética dos sweepovírus	98
3.3.	Análise de recombinação	100
4.	Discussão	101
5.	Conclusão	104
6.	Literatura citada	112
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b>		119
<b>ANEXO 1</b>		122
<b>ANEXO 2</b>		123
<b>ANEXO 3</b>		123
<b>ANEXO 4</b>		123
<b>ANEXO 5</b>		124
<b>ANEXO 6</b>		124
<b>ANEXO 7</b>		124
<b>ANEXO 8</b>		124
<b>ANEXO 9</b>		124



## LISTA DE TABELAS

<b>CAPÍTULO 2: Caracterização molecular de begomovírus infectando tomateiro no Brasil</b>	60
<b>Tabela 1</b> Lista dos isolados e clones dos vírus analisados	70
<b>CAPÍTULO 3: Nova espécie de begomovírus monopartido infectando batateira-doce no Brasil</b>	76
<b>Tabela 1</b> Porcentagens de identidade nucleotídica das sequências completas do genoma dos isolados SP71-BamHI e SP71-SacI descritos aqui e outros sweepovírus representativos	84
<b>CAPÍTULO 4: Diversidade genética e análise de recombinação de sweepovírus no Brasil</b>	90
<b>Tabela 1</b> Origem dos 34 isolados de sweepovírus usados neste estudo	106
<b>Tabela 2</b> Sequência dos sweepovírus usados neste estudo	107

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1: Revisão de literatura 1

**Figura 1** Microscopia crioeletrônica da partícula de *Maize streak virus* (MSV, esquerda). A barra representa 10nm. Partículas purificadas de MSV mostrando a morfologia geminada. A barra representa 50nm (direita). (Figura extraída de Brown *et al.*, 2011). 2

**Figura 2** Organização genômica típica de um mastrevírus. As ORFs no sentido viral (V1 e V2) e complementar (C1 e C2) e os genes correspondentes são indicados. A posição da estrutura em forma de “hairpin” contendo a sequência conservada TAATATT↓AC na LIR (“large intergenic region”) e a SIR (“small intergenic region”), na qual uma pequena molécula de DNA (seta) está associada ao ssDNA, são mostrados. Os íntrons (retângulos) ocorrem na ORF V2 e em sobreposição entre as ORFs C1 e C2. MP, proteína de movimento; CP, capa proteica; Rep, “replication-associated protein”. (Figura extraída de Brown *et al.* 2011). 4

**Figura 3** Organização genômica típica de três gêneros da família *Geminiviridae*: *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus*. As ORFs no sentido viral (V) e complementar (C) e os genes correspondentes são indicados. A posição da estrutura em forma de “hairpin” contendo a sequência conservada TAATATT↓AC localizada dentro da região intergênica (RI). Para os begomovírus bipartidos (DNA-A e DNA-B) a região comum (CRA e CRB), sequência dentro da RI compartilhada entre os componentes genômicos, é mostrada em cinza. CP, capa proteica; Rep, “replication-associated protein”; TrAP, “transcriptional activator protein”; REN, “replication enhancer”; MP, proteína de movimento; NSP, “nuclear shuttle protein” (Modificado de Brown *et al.*, 2011). 6

**Figura 4** Representação esquemática dos DNA satélites associados com begomovírus (alfasatélites, betasatélites e *Tomato leaf curl virus-satellite* - ToLCV-sat), incluindo suas principais características genômicas: ORFs, estrutura conservada em forma de “hairpin” (“stem loop”), SCR (“satellite conserved region”) e uma região rica em adenina (“A-rich region”). (Modificado de Fiallo-Olivé *et al.*, 2012). 11

**Figura 5** Replicação via ciclo rolante em geminivírus. ssDNA circular viral (em azul) é convertida em dsDNA pela DNA polimerase da hospedeira (passo 1). A Rep (em

vermelho) é expressa e se associa aos sítios de ligação na origem de replicação (passo 2). À medida que a replicação ocorre a fita de DNA mais antiga é liberada (passos 4 e 5). O genoma viral monomérico pode ser liberado (passo 6a) ou mais ciclos de replicação podem ocorrer (passo 6b e 7). Monômeros ou dímeros de ssDNA (passos 6a e 7) podem ser convertidos em dsDNA pela DNA polimerase do hospedeiro para que novos ciclos de replicação ocorram. O genoma viral produzido no passo 6a pode também ser encapsidado. Sucessivas gerações de ssDNA são coloridas em azul, amarelo e rosa. (Figura extraída de Martin *et al.*, 2011). 22

## **CAPÍTULO 2: Caracterização molecular de begomovírus infectando tomateiro no Brasil** 60

**Figura 1** Árvore filogenética ML (1000 repetições “bootstrap”) e matriz colorida da identidade nucleotídica (determinada com a exclusão dos gaps – MEGA4) das sequências selecionadas do DNA-A. 71

**Figura 2** Árvore filogenética ML (1000 repetições “bootstrap”) e matriz colorida da identidade nucleotídica (determinada com a exclusão dos gaps – MEGA4) das sequências selecionadas do DNA-B. 72

## **CAPÍTULO 3: Nova espécie de begomovírus monopartido infectando batateira-doce no Brasil** 76

**Figura 1** Árvore filogenética indicando a relação entre o genoma completo de Sweet potato leaf curl Sao Paulo virus-[BR:AlvM:09] (SPLCSPV-[BR:AlvM:09]) e Sweet potato leaf curl virus-Sao Paulo[BR:AlvM:09] (SPLCV-SP[BR:AlvM:09]) apresentados aqui (em negrito) e outros sweepovírus respresentativos. A árvore foi construída pelo método neighbour-joining com 1000 repetições usando MEGA4. 85

**Figura 2** Análise de recombinação ilustrando as posições dos pontos de recombinação. A representação esquemática do evento de recombinação detectado pelos programas RDP3 e SimPlot indica dois pontos de recombinação no genoma de SPLCV-SP[BR:AlvM:09], nucleotídeo 2059 e 2786 ( $P$ -value= $3.0 \times 10^{-40}$ ) gerando um fragmento de DNA de ~727 nucleotídeos. SPLCV-United States[BR:Ros1] (SPLCV-US[BR:Ros1]) é o maior parental e SPLCSPV[BR:AlvM:09] o menor parental. 86

## **CAPÍTULO 4: Diversidade genética e análise de recombinação de sweepovírus no Brasil**

90

**Figura 1** Árvore filogenética UPGMA (1000 repetições) baseada no alinhamento múltiplo de sequências completas de sweepovírus descritas neste trabalho (negrito) e aquelas disponíveis no banco de dados públicos.

108

**Figura 2** Representação esquemática dos eventos de recombinação (A) e detalhes dos pontos de recombinação (B) detectados em sweepovírus. A organização genômica típica dos sweepovírus é mostrada no topo da figura. Cada genoma é representado por um retângulo colorido de acordo com o isolado. Os números indicam os eventos de recombinação descritos em B. R,G,B,M,C,S e T indica a detecção pelos métodos RDP, GENCONV, BOOTSCAN, MAXCHI, CHIMAERA, SISCAN e 3SEQ, respectivamente, com o destacado em negrito sendo aquele que apresentou maior p-value.

110

**Figura 3** Evidência de eventos de recombinação nos sweepovírus brasileiros. (A) SPLCV-US[BR:RO:OPO:08], (B) SPLCV-Brazil[BR:BA:Uru:08] (SPLCV-BR[BR:BA:Uru:08], (C) Sweet potato leaf curl Spain virus-[BR:RO:Cac:08] (SPLCESV-[BR:RO:Cac:08]), (D) Sweet potato golden vein virus-Paraiba[BR:BA:CA:08] (SPGVV-PB[BR:BA:CA:08]), (E) SPGVV-Rondonia [BR:RO:Cac:08] (SPGVV-RO[BR:RO:Cac:08]) e (F) SPLCV-SP[BR:SP:PP:09]. Análises com SimPlot foram feitas com o alinhamento das sequências completas usando 200bp, Step 20bp, GapStrip no método Kimura (2-parameter). Os pontos de recombinação são mostrados pelas linhas verticais.

111

## RESUMO GERAL

Os begomovírus (família *Geminiviridae*, gênero *Begomovirus*) possuem genoma constituído por DNA circular de fita simples, apresentam um (monopartido) ou dois (bipartido, DNA-A e DNA-B) componentes genômicos e são transmitidos naturalmente a diversas espécies de dicotiledôneas por moscas-brancas (*Bemisia tabaci*). Este grupo de vírus é conhecido pelos danos que causa em diversas plantas de importância econômica, incluindo duas das principais culturas do Brasil, o tomateiro (*Solanum lycopersicum*) e a batateira-doce (*Ipomoea batatas*). O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo de diversidade genética de begomovírus que infectam o tomateiro e a batateira-doce. Neste estudo, o DNA viral de diversas amostras de tomateiro coletadas em 2003/04 foi analisado com o objetivo de caracterizar e estudar a diversidade genética desses begomovírus em três regiões do Brasil (Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste). Como resultado, foram descritas as sequências completas de três begomovírus: uma nova espécie, Tomato interveinal chlorosis virus (ToICV), e duas espécies anteriormente descritas, porém apenas com sequências parciais do DNA-A disponíveis, Tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV) e Tomato golden vein virus (TGVV). As sequências completas do DNA-B de TMoLCV e TGVV e do DNA-A de variantes de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) também são descritas. Como segunda parte do trabalho, em batateira-doce, o estudo foi realizado a partir de amostras coletadas do banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças e do campo de produção de quatro estados do Brasil (Rio Grande do Sul, São Paulo, Pernambuco e Paraíba). Um total de 36 sequências completas foram determinadas e comparadas com outras sequências obtidas de bancos de dados públicos (GenBank) afim de fornecer uma visão geral da diversidade genética de sweepovírus (nome proposto para os begomovírus que infectam plantas do gênero *Ipomoea*) do Brasil. Também foi proposta uma revisão na classificação e nomenclatura desses vírus de acordo com os critérios taxonômicos atuais para a família *Geminiviridae* adotados pelo Comitê Internacional

de Taxonomia de Vírus (ICTV). Do total de 36 sequências determinadas aqui, uma nova espécie foi identificada e nomeada Sweet potato leaf curl Sao Paulo virus (SPLCSPV) e os demais isolados foram classificados como novas estirpes ou variantes de *Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV), Sweet potato golden vein-associated virus (SPGVaV) e *Sweet potato leaf curl Spain virus* (SPLCESV). Além dos estudos de caracterização molecular e diversidade genética, as sequências dos isolados de tomateiro e batateira-doce foram analisadas para detectar possíveis eventos de recombinação e os resultados demonstraram que uma série de eventos de recombinação inter e intra-espécies ocorreu na região intergênica (RI) e na metade da ORF C1 (open reading frame C1). Estes resultados demonstram que algumas espécies de begomovírus que infectam tomateiro são predominantes em regiões específicas do país e que estes vírus estão evoluindo continuamente por meio de mecanismos de variabilidade genética, entre eles a recombinação, como mostrado neste estudo. Em batateira-doce, os resultados apresentados indicam que a diversidade genética de begomovírus é maior que a anteriormente descrita e que o acúmulo viral, favorecido pela propagação vegetativa da cultura, resulta em eventos de recombinação levando ao surgimento de novas espécies e estirpes.

## GENERAL ABSTRACT

Begomoviruses (family *Geminiviridae*, genus *Begomovirus*) have a circular, single strand DNA with one (monopartite) or two (bipartite, DNA-A and DNA-B) genomic components and are naturally transmitted by whiteflies (*Bemisia tabaci*) to several dicotyledonous species. This group of viruses is known to cause damage in several economically important crops, including two of the main crops in Brazil, tomato (*Solanum lycopersicum*) and sweet potato (*Ipomoea batatas*) plants. The aim of this work was to study genetic diversity of begomovirus infecting tomato and sweet potato plants. In this study, viral DNA of various tomato samples collected in 2003/04 was analyzed in order to characterize and study the genetic diversity of begomoviruses in three regions of Brazil (southeast, central-west and northeast). As a result, the full DNA-A sequences of three begomoviruses were described for the first time: a new tomato-infecting begomovirus, Tomato interveinal chlorosis virus (ToICV), and two previously described begomoviruses for which only partial DNA-A sequences were available, Tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV) and Tomato golden vein virus (TGVV). The complete sequences of the DNA-B components of TMoLCV e TGVV and the DNA-A components of a number of *Tomato severe rugose virus* variants are also presented. As the second part of the work, in sweet potato plants, the study was conducted from samples collected in the sweet potato germplasm bank of Embrapa Vegetables and in commercial fields across four Brazilian states (Rio Grande do Sul, São Paulo, Pernambuco and Paraíba). A total of 36 complete genome sequences was determined and compared with others from public nucleotide sequence databases (GenBank) to provide an overview of the sweepovirus (proposed name to the begomoviruses that infect plants of *Ipomoea* genus) genetic diversity in Brazil. Adittionally, it is proposed a review in the classification and nomenclature of these viruses in accordance with the study group on the taxonomy of geminiviruses of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV).

From the 36 complete genome sequences determined in this work, a novel species was identified and named Sweet potato leaf curl Sao Paulo virus (SPLCSPV) and the other isolates were classified as new strains or variants of *Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV), Sweet potato golden vein-associated virus (SPGVaV) and *Sweet potato leaf curl Spain virus* (SPLCESV). In addition to studies of molecular characterization and genetic diversity, the tomato and sweet potato-infecting sweepovirus sequences were analyzed to detect possible recombination events and it was demonstrated that most of the inter and intra-species recombination events occurred in the intergenic region (IR) and in the middle of C1 open reading frame (ORF). These results demonstrated that some tomato-infecting begomoviruses are prevalent in specific regions of Brazil and that these viruses are continually evolving through mechanism of genetic variability, including recombination, as showed in this study. In sweet potato, the results showed here indicate that the genetic diversity of begomoviruses is considerably greater than previously reported and that the accumulation of viruses, favored by vegetative propagation of culture, result in recombination events leading to the emergence of new species and strains.



## INTRODUÇÃO GERAL

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) e a batateira-doce (*Ipomoea batatas*) estão entre as principais culturas plantadas no Brasil. Ambas possuem grande importância alimentar devido às suas qualidades nutricionais, sendo fontes importantes de fibras, vitamina C, beta-caroteno, licopeno, entre outros. As doenças que incidem nestas culturas representam fatores limitantes para seus cultivos, especialmente as viroses, pela alta incidência e prejuízos causados.

O tomate (*Solanum lycopersicum*, família *Solanaceae*) é cultivado em regiões tropicais e subtropicais durante todo o ano. Essa hortaliça é uma das mais importantes do Brasil devido à extensão da área cultivada e sua grande importância sócio-econômica. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no ano de 2011 a produção superou 4,1 milhões de toneladas ocupando uma área de 66,2 mil hectares. No entanto, os tomaticultores enfrentam graves problemas para viabilizar a produção, seja em pequenas ou grandes áreas, sendo que a incidência de doenças, notadamente as begomovíroses, destacam-se pela sua alta incidência e prejuízos. Essa alta incidência de begomovírus em tomateiro no Brasil foi provavelmente desencadeada pela introdução de um novo biótipo do vetor mosca-branca, *Bemisia tabaci* biotipo B no país (França *et al.*, 1996). As características de polifagia, alta taxa de multiplicação e excelente adaptação às condições climáticas brasileiras podem ter favorecido a sua rápida expansão geográfica e com ela a emergência de diversas espécies de begomovírus.

A batata-doce (*Ipomoea batatas*, família *Convolvulaceae*) é propagada vegetativamente e, por isso, a degenerescência causada pelo acúmulo de patógenos, notadamente os vírus, pode ser o fato mais limitante para a sua produção. Reduções em campo de até 90% têm sido descritas associadas a infecções virais em algumas regiões do mundo (Milgram *et al.*, 1996). Muitas vezes, essas infecções são causadas por begomovírus monopartidos que infectam

espécies do gênero *Ipomoea* (Lozano *et al.*, 2009; Paprotka *et al.*, 2010a; Zhang & Ling, 2011). Filogeneticamente, estes vírus, no qual o nome sweepovírus tem sido proposto (Fauquet & Stanley, 2003; Briddon *et al.*, 2010), são agrupados monofileticamente e em separado dos demais begomovírus (Lozano *et al.*, 2009). Devido ao tipo de propagação da cultura, a acumulação viral pode resultar na coinfeção de múltiplos genomas virais em uma única planta (infecção mista). Esse fenômeno pode levar à ocorrência de eventos de recombinação gerando maior diversidade e contribuindo para a evolução viral (Padidam *et al.*, 1999; Sanz *et al.*, 2000).

Dentre as principais viroses que afetam essas culturas destacam-se aquelas causadas por vírus pertencentes à família *Geminiviridae*. Essa família é caracterizada estruturalmente pela morfologia geminada da partícula viral, e, geneticamente, por possuir uma (monopartidos) ou duas (bipartidos) moléculas de DNA circular de fita simples (ssDNA) (Lazarowitz, 1992). Os geminivírus são divididos em quatro gêneros, *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus* e *Topocuvirus*, de acordo com a organização genômica, círculo de hospedeiros e inseto vetor (Fauquet *et al.*, 2000). No Brasil são encontradas espécies pertencentes ao gênero *Begomovirus*, responsáveis por significativas perdas na agricultura, principalmente, em regiões subtropicais e tropicais do mundo (Morales & Anderson, 2001). Os begomovírus são monopartidos ou bipartidos e transmitidos a plantas dicotiledôneas pelo vetor mosca-branca (*Bemisia tabaci*). Em geral, o DNA-A viral apresenta duas ORFs (monopartidos; V1 e V2) ou apenas uma ORF (bipartidos, V1) no sentido viral e quatro ORFs (C1, C2, C3 e C4) no sentido complementar. Os begomovírus bipartidos apresentam um segundo componente genômico (DNA-B), responsável pela produção de proteínas relacionadas com o movimento viral dentro da planta hospedeira. Todos os componentes genômicos ainda apresentam uma região intergênica (RI) onde se encontra a origem de replicação (Rojas *et al.*, 2005; Stanley *et al.*, 2005). Os fenômenos de mutação, pseudo-recombinação e recombinação, de ocorrência

natural, contribuem fortemente para a geração de uma alta diversidade de espécies e estirpes dentro do gênero. A recombinação de DNA nos begomovírus pode ocorrer não somente entre isolados de um mesmo vírus, mas também entre espécies de gêneros distintos, o que resulta no rápido surgimento de novas espécies e estirpes virais (Seal *et al.*, 2006).

## **OBJETIVO GERAL**

Realizar um estudo de diversidade genética de begomovírus que infectam tomateiro (*Solanum lycopersicum*) e batateira-doce (*Ipomoea batatas*). Em tomateiro, realizar a identificação e a caracterização molecular de isolados de begomovírus em amostras coletadas entre os anos de 2003 e 2004. Em batateira-doce, apresentar um estudo da diversidade genética de sweepovírus entre isolados provenientes do banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças e de regiões produtoras no Brasil.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

### **Isolados de tomateiro:**

- Sequenciar parcialmente, a partir de produtos de PCR, o componente genômico DNA-A de begomovírus isolados de amostras coletadas em várias regiões do Brasil nos anos 2003 e 2004.
- Analisar a identidade nucleotídica entre os fragmentos de DNA sequenciados objetivando selecionar grupos de isolados que representem a diversidade genética.
- Sequenciar o genoma completo dos isolados selecionados.
- Calcular a identidade nucleotídica entre os isolados estudados e outros obtidos do banco de dados, assim como, as relações filogenéticas e eventos de recombinação.

### **Isolados de batateira-doce:**

- Clonar e sequenciar o genoma completo de isolados de sweepovírus de amostras coletadas no banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças e de campos de produção nos estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Paraíba e Pernambuco.

- Calcular a identidade nucleotídica entre as sequências determinadas nesse estudo e aquelas obtidas do banco de dados público.
- Classificar e nomear os isolados de acordo com os critérios taxonômicos atuais para o gênero *Begomovirus*.
- Comparar a diversidade genética dos sweepovírus que ocorrem no banco de germoplasma com aqueles presentes no campo.
- Estudar a recombinação em sweepovírus e seu envolvimento no surgimento de novas espécies e estirpes virais.

# CAPÍTULO 1

---

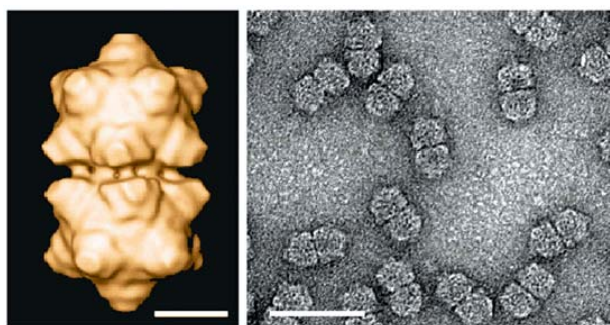
---

REVISÃO DE LITERATURA

## 1. Família *Geminiviridae*

A família *Geminiviridae* é caracterizada estruturalmente pela morfologia geminada da partícula viral, com 18-30 nm e geneticamente por possuir uma (monopartidos) ou duas (bipartidos) moléculas de DNA circular de fita simples (ssDNA). Cada uma das moléculas apresenta 2500-3000 nucleotídeos (nt) encapsidada por uma única proteína estrutural que se arranja na forma de 22 capsômeros formando dois icosaedros incompletos que confere o aspecto geminado das partículas virais (Figura 1), característico desta família de vírus de plantas (Brown *et al.*, 2011).

A família *Geminiviridae* é dividida em quatro gêneros, *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus* e *Topocuvirus*, de acordo com a organização genômica, círculo de hospedeiros e inseto vetor (Fauquet *et al.*, 2000). A replicação ocorre através de uma forma replicativa DNA fita dupla (dsDNA) utilizando o mecanismo ciclo rolante. A síntese de ssDNA viral é iniciada quando a proteína Rep (“replication-associated protein”) cliva o DNA na sequência TAATATT↓AC (nonanucleotídeo conservado entre os membros da família) localizada em uma estrutura em forma de “hairpin” dentro da região intergênica. Os geminivírus não codificam uma DNA polimerase e, conseqüentemente, são dependentes de fatores da hospedeira para sua replicação. Em todos os casos, a transcrição é bidirecional, no sentido viral e complementar. Dentre os geminivírus, apenas os vírus do gênero *Mastrevirus* utilizam o mecanismo de “splicing” para a expressão gênica.

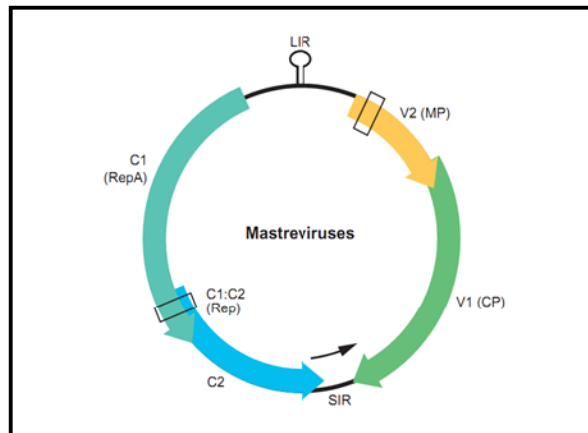


**Figura 1** Microscopia crioelétrica da partícula de *Maize streak virus* (MSV, esquerda). A barra representa 10nm. Partículas purificadas de MSV mostrando a morfologia geminada. A barra representa 50nm (direita). (Figura extraída de Brown *et al.*, 2011).

Os vírus pertencentes ao gênero *Mastrevirus* (espécie-tipo: *Maize streak virus*) são transmitidos por várias espécies de cigarrinhas do gênero *Cicadulina* (Hemiptera: Cicadellidae) de modo circulativo e possuem um único componente genômico (monopartido) de aproximadamente 2700 pares de bases. Membros do gênero *Mastrevirus* têm sido encontrados somente no Velho Mundo (Europa, África, Ásia e Austrália) infectando principalmente espécies monocotiledôneas, como milho (Varsani *et al.*, 2008b), cana-de-açúcar (Hughes *et al.*, 1993; Bigarre *et al.*, 1999; Shepherd *et al.*, 2008) e espécies pertencentes ao gênero *Panicum* (Varsani *et al.*, 2008a), embora alguns membros possam infectar espécies dicotiledôneas, como feijão e grão-de-bico (Liu *et al.*, 1997; Halley-Stott *et al.*, 2007; Nahid *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2010). O genoma dos mastrevírus codifica quatro diferentes genes: duas ORFs (“open reading frames”) no sentido viral, uma que codifica a capa proteica (CP, ORF V1) responsável por encapsidar o ssDNA e atuar como uma “nuclear shuttle protein” (NSP), e outra a proteína de movimento (MP, ORF V2), que atua no movimento célula-a-célula. As ORFs no sentido complementar codificam duas proteínas envolvidas na replicação, RepA (ORF C1 transcrita) e Rep (ORF C1:C2 transcrita). Este é o único gênero dentro da família, até agora conhecido, que processa o mRNA através do mecanismo de “splicing” e, portanto, suas sequências contêm íntrons. As proteínas traduzidas



a partir de mRNA processados por “splicing”, codificados pelas ORFs C1 e C2, estão envolvidas na replicação viral. Além disso, a regulação da expressão gênica no sentido viral ocorre pelo “splicing” de dois transcritos, V1 e V2. Nos mastrevírus, os genes nos sentidos viral e complementar são separados por duas regiões intergênicas, denominadas de LIR (“long intergenic region”) e SIR (“short intergenic region”) (Figura 2).



**Figura 2** Organização genômica típica de um mastrevírus. As ORFs no sentido viral (V1 e V2) e complementar (C1 e C2) e os genes correspondentes são indicados. A posição da estrutura em forma de “hairpin” contendo a sequência conservada TAATATT↓AC na LIR (“large intergenic region”) e a SIR (“small intergenic region”), na qual uma pequena molécula de DNA (seta) está associada ao ssDNA, são mostradas. Os íntrons (retângulos) ocorrem na ORF V2 e em sobreposição entre as ORFs C1 e C2. MP, proteína de movimento; CP, capa proteica; Rep, “replication-associated protein”. (Figura extraída de Brown *et al.* 2011).

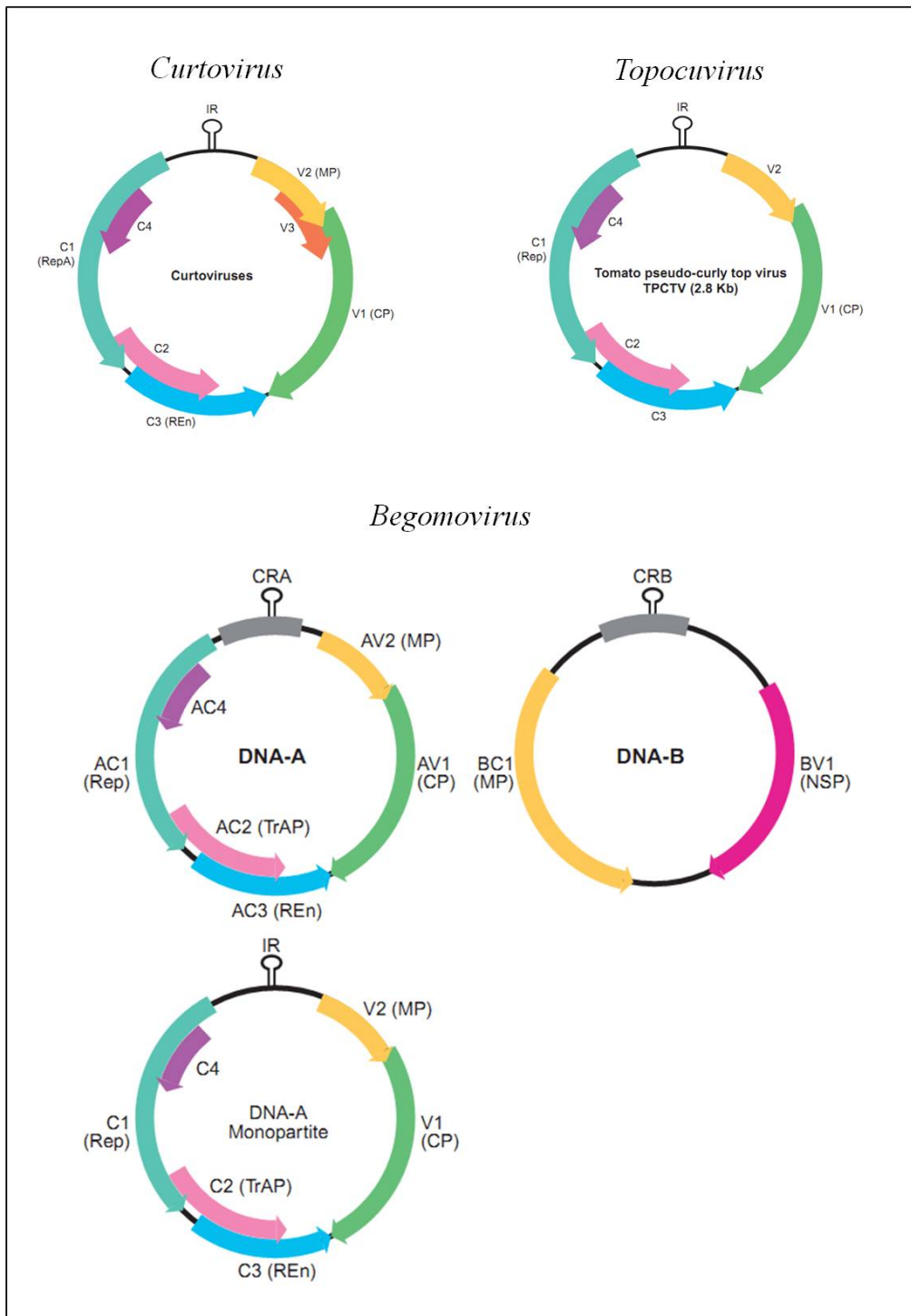
O gênero *Curtovirus* (espécie-tipo: *Beet curly top virus*), possui espécies com genoma monopartido e são transmitidas por cigarrinhas, *Circulifer tenellus* (Hemiptera: Cicadellidae), de modo circulativo. O genoma dos curtovírus codifica seis a sete proteínas. Três são codificadas no sentido viral (ORF V1, V2 e V3) e quatro no sentido complementar (ORF C1, C2, C3 e C4). No gênero *Curtovirus* são descritas sete espécies: *Beet curly top Iran virus* (BCTIRV), *Beet curly top virus* (BCTV), *Beet mild curly top virus* (BMCTV), *Beet severe curly top virus* (BSCTV), *Horseradish curly top virus* (HrCTV), *Pepper curly top virus* (PepCTV) e *Spinach curly top virus* (SCTV), sendo que todas causam o “curly top disease”

em plantas dicotiledôneas (Brown *et al.*, 2011). Os vírus pertencentes a este grupo podem ser encontrados tanto no Velho quanto no Novo Mundo.

O gênero *Begomovirus* inclui os geminivírus que podem possuir genoma tanto monopartido (DNA-A) quanto bipartido (DNA-A e DNA-B), são transmitidos por moscas-brancas, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), e infectam um amplo ciclo de plantas dicotiledôneas no Velho e Novo Mundo (Rojas *et al.*, 2005). Entre os membros mais comumente estudados que apresentam genoma bipartido estão o *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV), espécie-tipo do gênero (Fauquet *et al.*, 2000), *African cassava mosaic virus* (ACMV), *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) e *Squash leaf curl virus* (SLCuV). Entre os monopartidos destaca-se a espécie *Tomato yellow leaf curl virus* (Gutierrez, 2000).

O último gênero a ser incluído dentro da família *Geminiviridae* foi o *Topocuvirus*, possuindo apenas um membro, *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV). Possui genoma monopartido e é transmitido a dicotiledôneas através de membracídeos, *Micrutalis malleifera* (Hemiptera: Membracidae). Análises do genoma de TPCTV revelam características pertencentes aos gêneros *Mastrevirus* e *Begomovirus*, indicando ser um recombinante natural (Bridson *et al.*, 1996).

O genoma dos curtovírus, begomovírus e topocuvírus apresenta características e organização similares. Baseado nas funções, as proteínas têm sido nomeadas de “pre-coat protein” (V2/AV2), “coat protein” (CP, V1/AV1), “replication enhancer protein” (REn, C3/AC3), “transcription activation protein” (TrAP, C2/AC2), “replication-associated protein” (Rep, C1/AC1) e uma proteína ainda não caracterizada, C4/AC4 (Stanley *et al.*, 2005). O componente DNA-B (encontrado apenas nos begomovírus bipartidos) codifica somente duas proteínas: proteína de movimento (MP, BC1) e “nuclear shuttle protein” (NSP, BV1) (Figura 3).



**Figura 3** Organização genômica típica de três gêneros da família *Geminiviridae*: *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus*. As ORFs no sentido viral (V) e complementar (C) e os genes correspondentes são indicados. A posição da estrutura em forma de “hairpin” contendo a sequência conservada TAATATT↓AC localizada dentro da região intergênica (RI). Para os begomovírus bipartidos (DNA-A e DNA-B) a região comum (CRA e CRB), sequência dentro da RI compartilhada entre os componentes genômicos, é mostrada em cinza. CP, capa proteica; Rep, “replication-associated protein”; TrAP, “transcriptional activator protein”; REEn, “replication enhancer”; MP, proteína de movimento; NSP, “nuclear shuttle protein”. (Modificado de Brown *et al.*, 2011).

Baseado na organização genômica, diversidade genética e distribuição geográfica, os begomovírus têm sido divididos em dois grupos: begomovírus do Velho Mundo (Europa, África, Ásia e Austrália) e do Novo Mundo (Américas). Os componentes genômicos DNA-A e DNA-B dos begomovírus bipartidos são essenciais para o sucesso da infecção sistêmica, responsáveis pelas funções de transcrição, replicação e encapsidação do genoma e pelas funções de movimento viral, respectivamente. Em alguns casos entre os begomovírus do Velho Mundo, apenas o DNA-A é suficiente para causar uma infecção sistêmica, enquanto que os begomovírus do Novo Mundo, em geral, são dependentes do DNA-B (Rojas *et al.*, 2005; Stanley *et al.*, 2005).

A maioria dos vírus de plantas possui genoma constituído de RNA, assim, os geminivírus representam um dos poucos exemplos de vírus de DNA que estabeleceram com sucesso o parasitismo em plantas. Evidências sugerem que os geminivírus evoluíram a partir de bacteriófagos, como  $\phi$ X174, ou de plasmídeos bacterianos com genoma composto de ssDNA (Koonin & Ilyina, 1992). Essa evolução pode ter ocorrido por meio de replicons extracromossomais de DNA, presente em procariontes ou eucariontes primitivos, descritos como ssDNA circular plasmidial que replica via mecanismo círculo rolante e envolve uma forma replicativa de dsDNA. Evidências que este ancestral surgiu inicialmente na evolução baseiam-se tanto na natureza conservada da proteína Rep, entre procariontes e replicons de DNA eucarióticos, quanto nas características procarióticas presentes nos geminivírus modernos, como promotor da proteína capsidial funcional em *E. coli*, mRNA policistrônico e a capacidade de replicar em células procarióticas (Frischmuth *et al.*, 1990; Selth *et al.*, 2002). Essa capacidade foi demonstrada em *Tomato leaf curl virus* (TLCV), onde observou-se a acumulação do DNA viral em *Agrobacterium tumefaciens* (Rigden *et al.*, 1994). Assim, os geminivírus primitivos podem ter surgido há milhões de anos, provavelmente, possuindo somente um ou dois genes responsáveis pela replicação do DNA. Durante a evolução das

células eucarióticas, estes replicons certamente co-evoluíram com as células hospedeiras adquirindo novos genes através de recombinações entre o DNA do hospedeiro ou entre outros replicons (Rojas *et al.*, 2005).

Análises filogenéticas sugerem que os geminivírus e os nanovírus evoluíram a partir de um ancestral comum ou de um evento evolutivo semelhante (Rybicki, 1994). O gênero *Nanovirus* possui genoma composto de ssDNA encapsidado em partículas isométricas e transmitidos por afídeos. Nos nanovírus poucas proteínas foram funcionalmente caracterizadas. A sequência N-terminal da proteína capsidial (CP) e proteínas envolvidas com a replicação e ciclo celular têm sido estudadas. Evidências de que nanovírus e geminivírus tenham um mesmo ancestral baseiam-se no fato de que, nos nanovírus, a replicação do genoma segue o mecanismo círculo rolante, muito similar aos bacteriófagos e aos geminivírus (Gronenborn, 2004). Além disso, o DNA apresenta uma estrutura conservada em forma de “hairpin” e a sequência TAGTATT↓AC, muito similar ao nonanucleotídeo TAATATT↓AC presente nos geminivírus (Timchenko *et al.*, 2000). Saunders & Stanley (1999) reforçam a idéia de um ancestral comum ao demonstrar a recombinação entre geminivírus e nanovírus produzindo um componente defectivo resultando em um complexo de vírus causando “yellow vein disease” em *Ageratum conyzoides*.

A partir da análise do processo de especiação ocorrido ao longo da evolução, em relação à estrutura genômica, tipo de vetor e hospedeiro, a família *Geminiviridae* foi dividida em quatro gêneros. Estudos indicam que os gêneros *Mastrevirus* e *Begomovirus* são muito divergentes e que possivelmente o geminivírus ancestral tinha um único componente genômico que era transmitido a plantas monocotiledôneas por cigarrinhas. Mais tarde mudanças nas ORFs desse ancestral deram origem aos geminivírus transmitidos por mosca-branca e com apenas um componente, sendo este de ocorrência no Velho Mundo. Sugere-se, então, que o segundo componente genômico tenha surgido depois na escala evolutiva. O

segundo componente que está presente em alguns begomovírus do Velho Mundo e em todos do Novo Mundo pode ter contribuído para aumentar o movimento do vírus dentro da planta e/ou na eficiência de transmissão pela mosca-branca (Padidam *et al.*, 1995a). A evolução do genoma bipartido provavelmente ocorreu antes da deriva continental, porque ocorre em várias regiões do mundo (Rojas *et al.*, 2005).

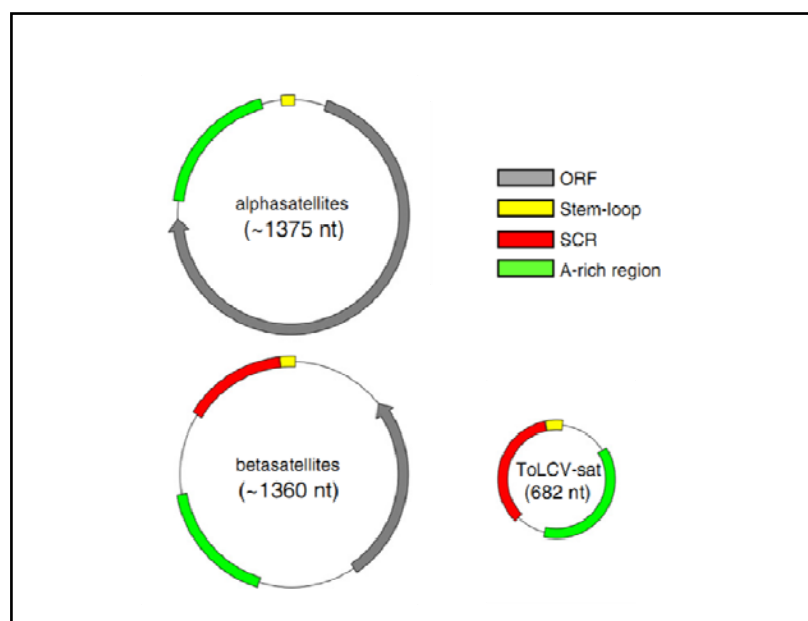
Segundo Padidam *et al.* (1999), os curtovírus possuem um genoma híbrido, sendo o gene da capa protéica similar aos mastrevírus e o restante do genoma similar aos begomovírus. Assim, é possível que os curtovírus tenham surgido após um vírus transmitido por mosca-branca (begomovírus) adquirir a sequência da capa protéica de um vírus transmitido por cigarrinha (mastrevírus) por recombinação. Esses vírus apresentam uma distribuição geográfica limitada e possuem menos espécies reconhecidas quando comparadas com os begomovírus, fato que pode ser o reflexo da limitada distribuição do inseto vetor.

Muitos begomovírus monopartidos infectam eficientemente certas plantas dicotiledôneas como, por exemplo, o tomate (*Solanum lycopersicum*). No entanto, limitações impostas pelo hospedeiro levaram estes a uma associação com outros tipos de moléculas ssDNA circular, as quais provavelmente tenham co-evoluído independentemente com as plantas. A aquisição dessas moléculas, denominadas de DNA satélite, podem em alguns casos resultar em função(s) essencial(s) para o vírus auxiliar, análogo à aquisição do DNA-B pelos begomovírus bipartidos (Rojas *et al.*, 2005). Dry *et al.* (1997) demonstraram, previamente, que o begomovírus *Tomato leaf curl virus* (ToLCV) estaria associado com uma molécula de ssDNA satélite e que esta não teria influência na replicação viral e nos sintomas causados por ToLCV. Com exceção da estrutura em forma de “hairpin” conservada em todos os membros da família *Geminiviridae*, tal DNA satélite (ToLCV-sat, Figura 4) com aproximadamente 682 nucleotídeos não possui sequência relacionada ao ToLCV e requer este para replicação, movimento na planta e transmissão pelo inseto vetor. Posteriormente, estas moléculas

satélites foram identificadas em outros begomovírus, incluindo *Tomato yellow leaf curl virus* e *African cassava mosaic virus* (Dry *et al.*, 1997). Atualmente, são descritos dois tipos de DNA satélites associados aos begomovírus: betasatélites e alfasatélites (Figura 4). Os betasatélites (também denominados de DNA- $\beta$ ) apresentam aproximadamente metade do tamanho do genoma do seu vírus auxiliar (~1360 nt) e, como o ToLCV-sat, não apresentam identidade nucleotídica parecida com os vírus auxiliares e precisam destes para sua replicação, movimento na planta e transmissão pelo inseto vetor (Briddon *et al.*, 2003). Estas moléculas encontram-se difundidas em todo o Velho Mundo, onde begomovírus monopartidos ocorrem. Análises de sequências têm revelado características altamente conservadas entre as moléculas de betasatélites, consistindo de uma região rica em adenina (“A-rich region”), uma região altamente conservada, denominada SCR (“satellite conserved region”) e uma única ORF no sentido complementar que codifica a proteína  $\beta$ C1 (Briddon *et al.*, 2003; Briddon *et al.*, 2008). O SCR contém uma estrutura em forma de “hairpin” apresentando a sequência TAA↓GTATTAC, similar à origem de replicação dos geminivírus e nanovírus (Briddon *et al.*, 2003). Diferente do ToLCV-sat, previamente descrito, os betasatélites afetam a replicação dos seus vírus auxiliares e alteram a indução de sintomas em algumas hospedeiras (Briddon *et al.*, 2001; Nawaz-Ul-Rehman & Fauquet, 2009; Patil & Fauquet, 2010), provavelmente devido a atividade supressora de silenciamento gênico apresentada pela proteína  $\beta$ C1 (Cui *et al.*, 2005; Saeed *et al.*, 2005).

Além dos betasatélites, outras moléculas de DNA satélites, originalmente chamadas de DNA-1, mas agora conhecidas como alfasatélites, estão associadas a begomovírus (Briddon *et al.*, 2004). Os alfasatélites são aproximadamente metade do tamanho dos componentes genômicos dos begomovírus (~1375 nt) e apresentam uma organização genômica consistindo de uma ORF, que codifica uma proteína Rep com similaridade a dos nanovírus (Mansoor *et al.*, 1999; Saunders & Stanley, 1999), uma região rica em adenina (“A-rich region”) e uma

estrutura em forma de “hairpin” apresentando a sequência TAGTATTAC (Briddon *et al.*, 2004). Consequentemente, ao contrário de outros DNA satélites, estas moléculas são capazes de se auto-replicarem na planta hospedeira, mas necessitam do begomovírus auxiliares para o movimento e transmissão pelo inseto vetor (Saunders & Stanley, 1999; Saunders *et al.*, 2000). Ao contrário dos betasatélites, estas moléculas não estão relacionadas a indução de sintomas e nem a infectividade do vírus auxiliar, assim sua função na patogenicidade permanece indefinida (Briddon *et al.*, 2008).



**Figura 4** Representação esquemática dos DNA satélites associados com begomovírus (alfasatélites, betasatélites e ToLCV-sat), incluindo suas principais características genômicas: ORFs, estrutura conservada em forma de “hairpin” (“stem loop”), SCR (“satellite conserved region”) e uma região rica em adenina (“A-rich region”). (Modificado de Fiallo-Olivé *et al.*, 2012).

Embora a maioria dos DNA satélites associados aos begomovírus identificados até o momento tenha origem no Velho Mundo, recentemente, alfasatélites têm sido encontrados associados a begomovírus do Novo Mundo. No Brasil, eles foram associados a dois begomovírus infectando plantas daninhas (classificados pelos autores como *Euphorbia mosaic virus* e *Cleome leaf crumple virus*), e em ambos os casos eles apresentaram estruturas



genômicas típicas de alfasatélites, incluindo o gene que codifica a proteína Rep, uma região rica em adenina e uma estrutura em forma de “hairpin” (Paprotka *et al.*, 2010b). Na Venezuela, uma molécula de DNA satélite foi associada ao begomovírus bipartido *Melon chlorotic mosaic virus* que, embora, apresente todas as características de um alfasatélite, sua sequência diverge daqueles alfasatélites típicos do Velho Mundo (Romay *et al.*, 2010). Mais recentemente, Fiallo-Olivé *et al.* (2012) descreveram o que parece ser um novo tipo de DNA satélite associado com begomovírus bipartidos do Novo Mundo infectando plantas da família *Malvaceae*.

## **2. Características moleculares do gênero *Begomovirus***

A maioria dos begomovírus possui genoma bipartido (DNA-A e DNA-B). O DNA-A codifica todas as proteínas necessárias para a transcrição, replicação e encapsidação de ambos os DNAs, enquanto o DNA-B contribui com as funções necessárias para o movimento do vírus na planta e desenvolvimento de sintomas (Rojas *et al.*, 2005). Assim, o componente DNA-A codifica a CP (capa proteica ou AV1) no sentido viral e quatro proteínas no sentido complementar: Rep (“replication-associated protein” ou AC1), TrAP (“transcriptional activator protein” ou AC2), REn (“replication enhancer protein” ou AC3) e AC4. O DNA-B codifica duas proteínas, uma no sentido viral, a NSP (“nuclear shuttle protein” ou BV1), e outra no sentido complementar, a MP (proteína de movimento ou BC1). Ambos os componentes genômicos possuem tamanho parecido não compartilhando identidade de sequência, exceto por uma região altamente conservada (>90% de identidade nucleotídica) com aproximadamente 200 nucleotídeos, denominada de região comum (RC) (Fontes *et al.*, 1994; Gutierrez, 2000) (Figura 3). Geralmente, ambos os componentes genômicos são necessários para a infecção sistêmica (Sunter & Bisaro, 1992), porém, Galvão *et al.* (2003) verificaram que em *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMV) o DNA-A, na ausência do DNA-B, foi capaz de infectar sistemicamente *Nicotiana benthamiana*. Em outro trabalho,

Fontenelle *et al.* (2007) demonstraram a capacidade desse mesmo vírus em infectar sistemicamente o tomateiro (*Solanum lycopersicum*) e outras hospedeiras, na ausência do DNA-B.

A CP é a proteína capsidial dos geminivírus, onde os monômeros são arranjados em capsômeros produzindo a morfologia geminada da partícula viral. Sua função está relacionada com a proteção do DNA viral durante a transmissão pelo inseto vetor ou transmissão mecânica e com a especificidade do inseto vetor (Unsel *et al.*, 2004). Experimentos demonstram que a troca do gene CP do *African cassava mosaic virus* (ACMV), um begomovírus transmitido por mosca-branca, pelo correspondente do *Beet curly top virus* (BCTV), um curtovírus transmitido por cigarrinha, resultou na alteração da especificidade do inseto vetor (Bridson *et al.*, 1990). Para *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), que infecta predominantemente solanáceas e é um dos mais bem estudados geminivírus bipartidos, experimentos demonstram que a CP não é necessária para a infecção sistêmica ou desenvolvimento de sintomas. Gardiner *et al.* (1988) demonstraram que mutantes av1 de TGMV foram capazes de infectar sistemicamente *N. benthamiana* e que a CP tem influência na patogenicidade em algumas hospedeiras, onde alguns mutantes produziram sintomas tardios ou atenuados quando comparados com TGMV não mutado. Embora esses mutantes tenham sido viáveis, análises de *Squash leaf curl virus* (SLCuV) têm mostrado que, em algumas condições, a CP pode ser necessária para infecção sistêmica. Em outro estudo, foi demonstrado que o movimento sistêmico do DNA-A de ToCMV, na ausência do DNA-B, é dependente da capa protéica (Fontenelle *et al.*, 2007). Assim, a capacidade de begomovírus bipartidos mutantes para o gene CP em produzir infecção sistêmica pode estar estritamente relacionada ao hospedeiro e as características genéticas do vírus (Pooma *et al.*, 1996), como resultado disso, alguns vírus requerem e outros dispensam a CP para infecção sistêmica.

A Rep (“replication-associated protein” ou AC1) é uma proteína com aproximadamente 40 kDa e absolutamente necessária para replicação do ssDNA viral no núcleo da célula hospedeira. Em todos os geminivírus testados até o momento, a Rep tem a capacidade de se ligar especificamente ao DNA, bem como, possuir atividade endonucleolítica, clivando o DNA em sequências específicas (Gutierrez, 2002). Muitas proteínas necessárias para a replicação viral são originadas da célula infectada, exceto a proteína Rep, uma vez que o genoma viral não codifica nenhuma DNA polimerase ou fatores acessórios. No entanto, estas proteínas não estão funcionais ou podem aparentemente estar ausentes em células diferenciadas. A replicação dos geminivírus não ocorre em tecidos meristemáticos, onde fatores de replicação são disponíveis, conseqüentemente assume-se que os geminivírus podem induzir a célula a um estágio favorável para sua replicação (Gutierrez, 2002). Evidências sugerem que a proteína Rep seja responsável pela reprogramação do ciclo celular. Estudos indicam que a infecção causada por geminivírus afeta diretamente a expressão gênica celular, com a Rep induzindo a expressão de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), uma proteína nuclear que possui um papel fundamental na iniciação da proliferação celular. Demonstrou-se que o PCNA ocorre em células diferenciadas infectadas por TGMV, ao passo que, em células não infectadas por TGMV o PCNA não foi detectado (Nagar *et al.*, 1995). Outra proteína com a qual a Rep também interage é o homólogo vegetal da proteína retinoblastoma (pRBR) que está envolvida na regulação negativa do ciclo celular (Rojas *et al.*, 2005), onde a transição da fase G1 para a fase S (período de replicação do DNA) do ciclo celular é regulada por essa proteína. Assim, a proteína Rep possui múltiplas funções, não apenas às relacionadas com a replicação, mas também as relacionadas com a expressão gênica, promovendo condições favoráveis para a síntese do DNA viral em células já diferenciadas.

A TrAP (“transcriptional activator protein” ou AC2) é uma proteína com aproximadamente 15 kDa, sendo necessária para ativar a expressão da CP e da BV1. Estudos indicam que o acúmulo da CP de TGMV requer a ORF AC2 intacta e que o produto do gene AC2 trans-ativa a expressão da capa protéica. No entanto, essas observações não afetam a capacidade de mutantes da TrAP em causar infecção, uma vez que a CP, em geral, não é necessária para obter infectividade. Entretanto a BV1, que é necessária para disseminação do vírus na planta, na ausência da TrAP pode acumular de forma insuficiente, resultando em uma infecção não sistêmica (Sunter & Bisaro, 1992). Outra possível função da TrAP seria a de interagir e inativar kinases, como ADK (“adenosine kinase”) e SNF1 (“sucrose non-fermenting 1”) que são enzimas envolvidas na defesa do hospedeiro. Wang *et al.* (2003) demonstraram que a atividade da ADK é reduzida em plantas transgênicas expressando a proteína viral TrAP e em plantas infectadas com geminivírus. Em contraste, a atividade da ADK é aumentada após a inoculação da planta com vírus de RNA (*Cucumber mosaic virus* e *Potato virus X*) ou com geminivírus mutantes com TrAP não funcional. Mostrou-se, previamente, que as proteínas TrAP de TGMV e TrAP de BCTV são determinantes de patogenicidade, causando aumento na suscetibilidade quando expressadas em plantas transgênicas (Sunter *et al.*, 2001).

REn (“replication enhancer protein”, ou AC3) é uma proteína de aproximadamente 16 kDa (Gutierrez, 1999), composta de apenas 134 aminoácidos. Esta proteína, assim como a Rep, é necessária para uma eficiente replicação do DNA viral. A Rep aparece sendo essencial para a replicação, enquanto a REn, uma proteína nuclear (Pedersen & Hanley-Bowdoin, 1994; Nagar *et al.*, 1995) que interage com a Rep (Settlage *et al.*, 1996), aumenta o acúmulo de DNA viral por meio de um mecanismo ainda desconhecido (Castillo *et al.*, 2003). Alguns experimentos sugerem que a REn pode aumentar a afinidade da Rep na origem de replicação. Outra possibilidade é que a REn direciona a Rep para o domínio de ligação Rep/DNA viral no

local de clivagem no início da replicação (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). Embora a proteína REn funcional não seja necessária para infectividade, estudos envolvendo mutações têm mostrado retardamento e atenuação de sintomas (Elmer *et al.*, 1988; Eteessami *et al.*, 1991). Acredita-se também que a REn regula a interação entre a Rep e a pRBR. Esta observação é consistente, uma vez que os mastrevírus não codificam uma proteína homóloga a REn e, nesses geminivírus, a Rep é responsável pela replicação, enquanto uma outra proteína, RepA, interage com pRBR (Settlage *et al.*, 2001).

A ORF AC4 presente em begomovírus bipartidos é homóloga a ORF C4 de begomovírus monopartidos como, por exemplo, ToLCV e TYLCV, onde tal ORF tem se mostrado importante na determinação da severidade dos sintomas e no movimento sistêmico do vírus na planta (Jupin *et al.*, 1994; Rigden *et al.*, 1994). No entanto, em alguns vírus bipartidos essa ORF mostrou-se insignificante no que diz respeito à infectividade. Fontenelle *et al.* (2007) demonstraram através de mutantes da ORF AC4 de ToCMoV que esta não está envolvida nem no desenvolvimento de sintomas nem no movimento sistêmico do vírus na planta, pois os mutantes de AC4 não distinguiram dos originais em relação a estes aspectos. Em contraste, resultados obtidos em ACMV e *Sri Lanka cassava mosaic virus* (SLCMV) demonstram que a ORF AC4 está envolvida na supressão do silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) em plantas (Vanitharani *et al.*, 2004; Gopal *et al.*, 2007).

Os vírus de plantas são frequentemente desafiados pela natureza celular das suas hospedeiras que apresentam uma importante barreira (plasmodesmos) que deve ser superada para que eles consigam passar de uma célula infectada para uma célula adjacente. Os plasmodesmos são canais responsáveis pela conexão citoplasmática entre células vizinhas, possibilitando a troca de macromoléculas (McLean *et al.*, 1995; Lucas & Lee, 2004). No entanto, esses canais são muito pequenos para permitir a passagem da partícula ou mesmo do genoma viral. Assim, os vírus de plantas codificam uma ou mais proteínas, chamadas de

proteínas de movimento (MPs), responsáveis essencialmente pelo movimento viral. As MPs aumentam o tamanho do limite de exclusão dos plasmodesmos (Tzfira *et al.*, 2000; Haywood *et al.*, 2002), interagem com o retículo endoplasmático e citoesqueleto (Heinlein *et al.*, 1995; Heinlein *et al.*, 1998) e também interagem ou modificam diversos fatores do hospedeiro aumentando o sucesso do movimento viral (Scholthof, 2005; Lucas, 2006). A maioria dos estudos sobre movimento viral é baseado em vírus de RNA, os quais se replicam no citoplasma e, conseqüentemente, próximos aos plasmodesmos. No entanto, os vírus de DNA replicam no núcleo e precisam atravessar o envelope nuclear para interagir com os plasmodesmos e, subseqüentemente, mover para a célula vizinha. No caso dos begomovírus bipartidos, essas proteínas de movimento são codificadas pelo componente genômico DNA-B que codifica duas proteínas, uma no sentido viral, a NSP (“nuclear shuttle protein” ou BV1), e outra no sentido complementar, a MP (“movement protein” ou BC1). A NSP é necessária para o tráfego intracelular do DNA viral do núcleo para o citoplasma e a MP é responsável pelo movimento célula-a-célula, via plasmodesmos. O DNA viral é replicado no núcleo e o seu transporte para o citoplasma é mediado pela NSP (Noueiry *et al.*, 1994). A NSP interage com a MP, interação que é necessária para transferir o DNA para o complexo MP que é, então, conduzido através dos plasmodesmos (Sanderfoot & Lazarowitz, 1996). Estas proteínas de movimento interagem diretamente com o DNA viral, reconhecendo-o de maneira específica com base na forma e no tamanho, refletindo o estado replicativo do vírus (dsDNA) e o tamanho do genoma (2,5 – 3,0 kb) (Noueiry *et al.*, 1994; Rojas *et al.*, 1998).

Algumas espécies de begomovírus apresentam genoma monopartido, o qual possui os genes necessários para desempenhar todas as funções essenciais do vírus, sejam aquelas relacionadas à replicação ou ao movimento viral célula-a-célula e a longa distância, e diferem em número de ORFs em relação ao DNA-A dos bipartidos. Estes vírus, por exemplo, ToLCV e ToYLCV, possuem duas ORFs (CP e AV2) no sentido viral, enquanto os bipartidos

apresentam apenas a CP (Padidam *et al.*, 1996). Em essência, o genoma dos begomovírus monopartidos é homólogo ao DNA-A de bipartidos. Os genes nos sentido complementar C1, C2 e C3 são homólogos dos AC1, AC2 e AC3, respectivamente.

Os begomovírus têm sido encontrados associados com moléculas satélites. Estas moléculas satélites podem ser divididas em duas classes de acordo com a origem da capa proteica usada para encapsidar o ácido nucleico: os vírus satélites, que codificam sua própria capa proteica, e os ácidos nucleicos satélites, que são encapsidados pela capa proteica do vírus auxiliar. Em ambos os casos são moléculas pequenas e que apresentam pouca ou nenhuma similaridade de sequência com o genoma do vírus auxiliar. A replicação dessas moléculas satélites interfere em algum grau na replicação do vírus auxiliar e em alguns casos afetam o desenvolvimento de sintomas da doença (Hull, 2002). Embora um grande número de RNA satélites associados a vírus de RNA de plantas seja conhecido, com o primeiro relato ocorrido em 1960 (Hu *et al.*, 2009), apenas em 1997 o primeiro DNA satélite foi descrito: ToLCV-sat, associado com o begomovírus ToLCV. Este satélite não é necessário para a infectividade do ToLCV e não tem efeito na indução de sintomas pelo vírus auxiliar, mas é dependente dele para sua replicação e encapsidação e, portanto, possui as características de DNA satélite (Dry *et al.*, 1997).

Em contraste com ToLCV, o begomovírus monopartido *Ageratum yellow vein virus* (AYVV) que infecta a planta daninha *Ageratum conyzoides* mostrou-se infectivo em plantas de *Nicotiana benthamiana* (Tan *et al.*, 1995), no entanto, quando o clone do componente genômico foi reintroduzido em *ageratum* produziu somente infecção assintomática (Saunders & Stanley, 1999; Saunders *et al.*, 2000), sugerindo que outro fator seria necessário para restaurar a patogenicidade em seu hospedeiro natural. Em pesquisas preliminares, componentes recombinantes circulares (sequência da região intergênica e a 5' terminal do gene *CI* de AYVV mais uma sequência não relacionada) com aproximadamente metade do

tamanho do genoma de AYVV, foram isolados de plantas de *ageratum* infectadas (Stanley *et al.*, 1997). Quando co-inoculados em *N. benthamiana* o recombinante comportou-se como um DNA defeutivo interferente (DNA de origem viral truncado que afeta a replicação do vírus auxiliar) ampliando os sintomas causados por AYVV e reduzindo a acumulação do vírus auxiliar. Recombinantes semelhantes também foram identificados em begomovírus associados ao “Cotton leaf curl disease” (CLCuD) (Liu *et al.*, 1998; Briddon *et al.*, 2000; Briddon *et al.*, 2001). CLCuD tem sido o maior limitante na produção de algodão no Paquistão a partir da década de 1990 (Briddon & Markham, 2000). A doença está associada a begomovírus monopartido e a recombinantes (Zhou *et al.*, 1998; Idris & Brown, 2002). Assim como observado em AYVV, clones de *Cotton leaf curl virus* não produziram sintomas típicos de CLCuD, sugerindo a presença de outros fatores (Briddon *et al.*, 2000). Pesquisas voltadas para o estudo de tais fatores resultaram no isolamento de pequenas moléculas de ssDNA circular, denominadas de DNA-1 (Mansoor *et al.*, 1999), representantes de uma nova classe de DNA satélites associados com monopartidos. O DNA-1 possui aproximadamente metade do tamanho do vírus auxiliar (~1370 nt) e codifica uma proteína Rep. Este pode ter uma replicação autônoma, embora dependa do vírus auxiliar para encapsidação e movimento. No entanto, não estão relacionados a indução de sintomas e nem a infectividade do vírus auxiliar (Briddon *et al.*, 2008). Por outro lado, DNA satélites também com aproximadamente metade do tamanho do vírus auxiliar (~1360 nt) têm sido isolados e mostraram-se necessários para uma infecção viral eficiente em algumas hospedeiras. Estes foram nomeados de DNA- $\beta$ , pois funcionalmente assemelham-se ao componente B de begomovírus bipartido. Evidências sugerem que a ORF  $\beta$ C1 é um determinante de patogenicidade, pois CLCuD apresentando DNA- $\beta$  mutante onde a ORF  $\beta$ C1 foi excluída foram replicadas pelo vírus auxiliar e moveram-se sistemicamente pela planta, mas foram incapazes de induzir sintomas típicos da doença (Briddon *et al.*, 2003). Já a região rica em adenina, apesar de conservada, não possui



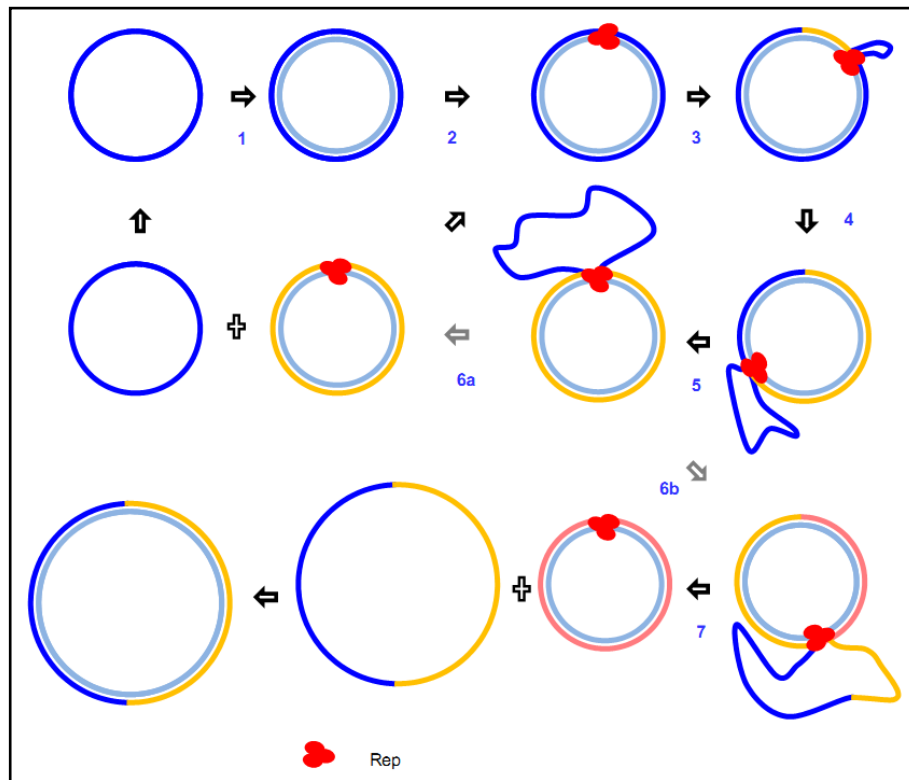
função bem definida. Estudos demonstraram que quando mutantes de DNA- $\beta$  com a região rica em adenina foi excluída, tais mutantes foram capazes de replicar, encapsidar e infectar sistemicamente as plantas, indicando que esta região não é primordial para tais funções (Tao & Zhou, 2004).

### **3. Replicação da família *Geminiviridae***

O primeiro estágio do ciclo infectivo envolve a entrada do ssDNA dentro da célula vegetal através do inseto vetor. Os vírus desta família replicam através de um intermediário dsDNA no núcleo da célula infectada. O movimento para o núcleo é dependente da CP e dos mecanismos de transporte do hospedeiro. Este mecanismo não é muito claro, pois não se sabe, ao certo, se o vírus inoculado pelo vetor move-se para o núcleo encapsidado ou se este é desencapsidado e move-se como um complexo nucleoproteico. Aparentemente, a CP está envolvida neste estágio de transporte, provavelmente através de interações com a cadeia de transporte do hospedeiro (Gafni & Epel, 2002). Evidência para essa hipótese de envolvimento da CP com o transporte do ssDNA para o núcleo foi demonstrada por meio de experimentos de microinjeções com ssDNA de MSV que, na ausência da CP, o DNA injetado não entra no núcleo. No entanto, quando injetado com a CP, o DNA foi rapidamente transportado para o interior do núcleo (Liu *et al.*, 1999).

Uma vez dentro do núcleo, o ssDNA é convertido em um dsDNA intermediário que atua como molde tanto para a replicação como para a transcrição do genoma viral. Esta síntese de moléculas de dsDNA é realizada pela DNA polimerase do hospedeiro (Passo 1, Figura 5). Uma vez produzidas, estas moléculas de dsDNA são associadas com proteínas histonas, formando os chamados minicromossomos (Pilartz & Jeske, 1992, 2003). Acredita-se que os genes expressos no sentido complementar e que codificam as proteínas envolvidas na replicação e na transcrição (Rep, TrAP e REn) são expressos antes daqueles genes no sentido viral (CP e NSP). Após a expressão destes genes no sentido complementar, a replicação do

genoma viral ocorre via mecanismo ciclo rolante (“rolling circle replication” – RCR), que tem início quando a proteína Rep se liga e corta uma das fitas de DNA na origem de replicação (*v-ori*) (Heyraud-Nitschke *et al.*, 1995; Orozco & Hanley-Bowdoin, 1998; Castellano *et al.*, 1999) gerando um DNA na “forma replicativa” (RF) que serve como molde para sucessivas sínteses de ssDNA viral (Passo 3 na Figura 5). Como novas fitas de DNA são sintetizadas, as fitas de DNA antigas são progressivamente liberadas (Passo 4-7, Figura 5) até que, após um ou mais ciclos de replicação, elas são ligadas formando um monômero circular (Passo 6, Figura 5) ou multímeros (Passo 7, Figura 5) de ssDNA viral (Jeske *et al.*, 2001). As moléculas de ssDNA produzidas nesse processo podem ter dois destinos dependendo do estágio da infecção. No primeiro estágio, o ssDNA viral pode ser convertido, pela maquinaria do hospedeiro, em dsDNA e entrar no processo de transcrição e/ou replicação, amplificando o genoma viral dentro da célula. A segunda alternativa ocorre em um estágio tardio quando os produtos dos genes CP e NSP estão presentes e podem se ligar ao ssDNA para encapsidá-lo ou para transportá-lo para fora do núcleo (Jeske *et al.*, 2001). Uma vez no citoplasma, o vírus move-se para as células vizinhas mediado pela proteína MP através dos plasmodesmos e finalmente para o floema, onde é transportado a longa distância. Em geminivírus bipartido, as proteínas associadas com o movimento viral são codificadas pelo DNA-B. No caso do *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV), o movimento do ssDNA e dsDNA para fora do núcleo é mediado pela proteína NSP, enquanto o transporte intercelular do dsDNA é mediado pela proteína MP (Noueiry *et al.*, 1994; Pascal *et al.*, 1994; Sanderfoot & Lazarowitz, 1995, 1996). Os geminivírus monopartidos, como TYLCV, não codificam homólogos para NSP e MP e consequentemente, outra(s) proteína(s) virais (CP/V1 e Pré-CP/V2) realizam estas funções (Kunik *et al.*, 1998). O último estágio do ciclo corresponde à aquisição do vírus pelo vetor. Neste caso, experimentos sugerem que a CP e, provavelmente, a partícula viral são indispensáveis para a transmissão pelo inseto vetor.



**Figura 5** Replicação via ciclo rolante em geminivírus. ssDNA circular viral (em azul) é convertida em dsDNA pela DNA polimerase da hospedeira (passo 1). A Rep (em vermelho) é expressa e se associa aos sítios de ligação na origem de replicação (passo 2). À medida que a replicação ocorre a fita de DNA mais antiga é liberada (passos 4 e 5). O genoma viral monomérico pode ser liberado (passo 6a) ou mais ciclos de replicação podem ocorrer (passo 6b e 7). Monômeros ou dímeros de ssDNA (passos 6a e 7) podem ser convertidos em dsDNA pela DNA polimerase do hospedeiro para que novos ciclos de replicação ocorram. O genoma viral produzido no passo 6a pode também ser encapsidado. Sucessivas gerações de ssDNA são coloridas em azul, amarelo e rosa. (Figura extraída de Martin *et al.*, 2011).

#### 4. Variabilidade genética dos begomovírus

Espécies de geminivírus têm causado sérios problemas econômicos em vários sistemas agrícolas em várias regiões do mundo. Alguns fatores, incluindo o surgimento de novas formas virais, aparecimento de vetores mais eficientes, clima favorável, mudanças no sistema de produção, movimento de material infectado e introdução de variedades susceptíveis, têm

individualmente, ou em conjunto, contribuído para o aparecimento das geminivirose como um problema em todo o mundo (Varma & Malathi, 2003).

Os mecanismos que causam variabilidade gênica nos geminivírus podem ser mutação, recombinação e pseudo-recombinação. A maior parte das pesquisas relacionadas à evolução viral é focada em vírus de RNA, os quais apresentam relativamente altas taxas de mutação, uma vez que a RNA polimerase não possui a capacidade de corrigir erros de leitura durante a replicação (“proof-reading”). Vírus de RNA têm mostrado taxas de mutação entre  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  substituições por sítio por ano (subs/sítio/ano) (Schneider & Roossinck, 2000; Jenkins *et al.*, 2002; Malpica *et al.*, 2002). Consistente com a hipótese de que a fidelidade da polimerase influencia nas taxas de mutação, vírus com genoma constituído de dsDNA, como bacteriófagos, papilomavírus e polyomavírus apresentam taxas de  $10^{-9}$  subs/sítio/ano (Drake, 1991; Holmes, 2004). Interessantemente e contraditório com a premissa de que a fidelidade da polimerase é o maior determinante das taxas de mutação, estudos com dois vírus de ssDNA que infectam mamíferos pertencentes a família *Parvoviridae*, canine parvovirus e B19 erythrovirus, demonstraram taxas de  $10^{-4}$  subs/sítio/ano, similares aquelas encontradas em vírus de RNA (Shackelton *et al.*, 2005; Shackelton & Holmes, 2006). Para o geminivírus, estimativas das taxas de substituição indicam, assim como para outros vírus de ssDNA, uma rápida evolução. Duffy & Holmes (2008), utilizando o método bayesiano, analisaram sequências genômicas de *Tomato yellow leaf curl virus* obtidas do GenBank e isoladas de plantas infectadas entre os anos de 1988 e 2006. A taxa de mutação nestes genomas foi de  $10^{-4}$  subs/sítio/ano. Em condições experimentais, dois estudos que confirmam essa taxa podem ser citados. O primeiro, Ge *et al.* (2007) usando clones infectivos de *Tomato yellow leaf curl China virus* (TYLCCV) mantidos entre 60 e 120 dias em plantas de *N. benthamiana* e tomate, detectaram taxas de  $1.4 \times 10^{-3}$  e  $2.2 \times 10^{-3}$  subs/sítio/ano na região do gene *Rep* e região intergênica, respectivamente. Para o segundo, clones de MSV agroinoculados em plantas de

milho e depois passados através do inseto vetor para plantas de milho e cana-de-açúcar foram mantidos por até cinco anos e as taxas estimadas entre  $7.4 \times 10^{-4}$  e  $7.9 \times 10^{-4}$  (van der Walt *et al.*, 2008).

Outro mecanismo de variabilidade genética é a recombinação, que além de exercer um papel vital na manutenção e na reparação das moléculas de DNA (Cromie *et al.*, 2001), é evolutivamente importante, uma vez que defende o genoma do acúmulo de mutações deletérias (Keightley & Otto, 2006). Portanto, ao permitir o surgimento de novas combinações genéticas, a recombinação, mais do que reverter as consequências dessas mutações deletérias, também fornece ao organismo opções evolutivas que apenas através de mutações não seriam possíveis (Crameri *et al.*, 1998). Em virologia, a recombinação pode ser dividida em dois processos: recombinação e pseudo-recombinação, também chamada de rearranjo genômico. A recombinação envolve a troca de fragmentos de material genético entre genomas, enquanto que na pseudo-recombinação ocorre a troca de componentes genômicos intactos entre vírus multipartidos, gerando uma nova combinação de componentes.

Para os geminivírus, a recombinação é considerada o principal mecanismo de variabilidade genética, na qual resulta em maior capacidade evolutiva e adaptativa a novas hospedeiras (Zhou *et al.*, 1997; Padidam *et al.*, 1999) gerando uma alta diversidade genética. Essa diversidade genética é representada por mais de 200 espécies (Fauquet *et al.*, 2008). A importante contribuição da recombinação para a evolução dos geminivírus já é bem estabelecida (Umaharan *et al.*, 1998; Padidam *et al.*, 1999) e é provável que esse mecanismo esteja diretamente relacionado ao surgimento de algumas das espécies mais importantes para a agricultura mundial (Zhou *et al.*, 1997; Monci *et al.*, 2002; Garcia-Andres *et al.*, 2006). Embora a importância desse mecanismo seja reconhecida, ainda é um mistério como os eventos de recombinação podem aumentar a patogenicidade desses vírus, quais processos bioquímicos determinam o tipo de recombinação e quais processos evolutivos determinam se

um vírus permanecerá ou não na natureza. Contudo, alguns estudos têm mostrado três “hot-spots” de recombinação que estão localizados na ORF AC1, entre as ORFs AV1 e AC3 e na região intergênica (RI) (Ndunguru *et al.*, 2005; Garcia-Andres *et al.*, 2007; Lefeuvre *et al.*, 2007; Varsani *et al.*, 2008b; Lefeuvre *et al.*, 2009). No sul da Espanha, *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) e *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) coexistem nos campos e contribuem para o “Tomato yellow leaf curl disease” (TYLCD). Garcia-Andres *et al.* (2007) demonstraram, através de experimentos sob condições controladas, que vírus recombinantes que surgiam da infecção mista entre TYLCSV e TYLCV tinham um ponto de recombinação entre as ORFs AV1 e AC3 e outro na origem de replicação. Na África, genomas de isolados de begomovírus oriundos de infecções naturais foram analisados e os resultados indicam que pontos de recombinação não ocorrem aleatoriamente ao longo do genoma, mas que existem “hot spots” (C1, V1/C3 e RI) e “cold spots” (V2 e V1) (Lefeuvre *et al.*, 2007). Em outro estudo, foi demonstrada a ocorrência de recombinação natural envolvendo isolados de TYLCV e *Tomato leaf curl virus* (ToLCV). Os resultados sugerem que os isolados de TYLCV de Israel e Irã são híbridos entre ancestrais semelhantes a TYLCV e ToLCV, e que o fragmento recombinante encontra-se situado entre a metade da ORF C1 e metade da região intergênica (Navas-Castillo *et al.*, 2000). Estes resultados são coerentes com a idéia de que pontos de recombinação que ocorrem fora dos genes geralmente têm um custo evolutivo menor do que aqueles que ocorrem dentro deles (Lefeuvre *et al.*, 2007).

Três fatores podem contribuir significativamente para a ocorrência de eventos de recombinação. Primeiro, infecções mistas, um pré-requisito para que eventos de recombinação ocorram (Padidam *et al.*, 1995b; Umaharan *et al.*, 1998). Segundo, estes vírus replicam via “forma replicativa” dsDNA produzindo um grande número de cópias (Kanevski *et al.*, 1992; Accotto *et al.*, 1993). Terceiro, o biótipo B de *B. tabaci* apresenta um amplo

círculo de hospedeiros e um alto grau de adaptação e dispersão (Bedford *et al.*, 1994). Como resultados, têm-se recombinações virais e observação de novas hospedeiras sendo infectadas.

A existência de dois componentes genômicos na maioria dos begomovírus possibilita o mecanismo de pseudo-recombinação. A habilidade dos begomovírus em trocarem componentes foi demonstrada experimentalmente na década de 1980 (Stanley *et al.*, 1985). Alguns estudos tentaram elucidar os fatores que controlam o potencial de formação de pseudo-recombinantes entre dois vírus. Ramos *et al.* (2003) mostraram que *Tomato mottle Taino virus* (ToMoTV) pseudo-recombina com *Potato yellow mosaic virus* (PYMV), mas não com *Tomato mottle virus* (ToMoV), apesar deste último possuir alta similaridade com a Rep e com a REn. Neste caso, a identidade dos iterons foi um fator crítico para possibilitar a pseudo-recombinação, com os dez primeiros aminoácidos da Rep controlando alguns fatores-chaves da especificidade da replicação viral. Hou & Gilbertson (1996) por meio da formação de pseudo-recombinantes com o DNA-A do ToMoV e o DNA-B de *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV) demonstraram que, embora infecciosos, estes apresentavam acúmulo reduzido de DNA-B e sintomas atenuados em *N. benthamiana*. Entretanto, após três passagens mecânicas nesse hospedeiro, os sintomas tornaram-se idênticos aos produzidos pelo ToMoV e o nível do DNA-B tornou-se igual ao do DNA-A. A análise das regiões comuns de ambos os componentes do pseudo-recombinante comprovou a ocorrência de recombinação intermolecular na RC do DNA-B do BDMV, tornando-a idêntica à RC do ToMoV e permitindo que o DNA-B fosse eficientemente reconhecido pela proteína Rep do ToMoV. Este resultado evidencia a importância da pseudo-recombinação e da recombinação na evolução dos begomovírus e em sua adaptação a novos hospedeiros. Os vírus monopartidos também são capazes de adquirir permanentemente o DNA-B sob algumas condições de campo mudando para um vírus bipartido. Estes vírus têm sido denominados como mono-bipartidos (Saunders *et al.*, 2002).

No Brasil, Galvão *et al.* (2003) demonstraram que uma variante do *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), nomeado como ToCMV-[MG-Bt] é derivado de um evento de recombinação entre espécies. Assim, esse vírus possui um genoma híbrido, onde a AC1 e a origem de replicação provavelmente são originadas do ToCMV-[BA-Se1] e o restante da sequência parece ter origem de um isolado de *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV). Embora tenha sido reportado que o DNA-A de ToCMV-[MG-Bt] não infecta tomateiro (Galvão *et al.*, 2003), resultados posteriores demonstram claramente que o DNA-A viral move-se sistemicamente através da planta de tomate, induz sintomas e acumula DNA viral na ausência do DNA-B. Isto sugere que esse recombinante natural seja mais patogênico e possua uma maior vantagem seletiva quando comparado aos genótipos parentais (Fontenelle *et al.*, 2007).

Andrade *et al.* (2006) descreveram a espécie *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) originalmente isolado de tomate, mas filogeneticamente próximo aos vírus isolados de *Sida* sp. Apesar disso, o ToYSV foi capaz de formar pseudo-recombinantes com vírus de tomate. Pseudo-recombinantes infectivos formados entre o DNA-A de ToYSV e o DNA-B de *Tomato crinkle leaf yellows virus* (TCrLYV) induziram sintomas severos em *N. benthamiana*. Esse potencial para formar pseudo-recombinantes foi, em parte, atribuído ao fato de que a origem de replicação de ambos os componentes possui a sequência do sítio de ligação da Rep idêntica. Contudo, esse não foi o caso para outro pseudo-recombinante viável formado entre o DNA-A de *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) e o DNA-B de ToYSV, os quais possuem a sequência do sítio de ligação da Rep diferente. Estes resultados reforçam a idéia que a formação de pseudo-recombinantes viáveis não se baseia apenas nas relações filogenéticas e nas sequências conservadas dos iterons.

Outro mecanismo que demonstra a flexibilidade genética dos begomovírus é o sinergismo. Os mecanismos que atuam em uma interação sinérgica ainda não são bem



compreendidos. Acredita-se que algumas proteínas supressoras de silenciamento gênico podem desempenhar um papel importante nesse processo, contudo, a ação supressora pode variar de vírus para vírus e ser desempenhada por diferentes proteínas (TrAP ou AC4) (Vanitharani *et al.*, 2004). Alves-Junior *et al.* (2009) demonstraram que essas interações são processos complexos que podem incluir desde uma interação negativa entre os vírus envolvidos, até uma interação sinérgica. Um exemplo de sinergismo ocorre entre duas espécies de begomovírus, *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) e *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV), economicamente importantes para a produção de pimentão e tomate no México e Estados Unidos. Alguns trabalhos têm demonstrado que infecções mistas com PHYVV e PepGMV são comuns nestas culturas e, em alguns casos, são predominantes (Stenger *et al.*, 1990; Torres-Pacheco *et al.*, 1996; Méndez-Lozano *et al.*, 2003). Recentemente, foi apresentado um estudo sobre o tema envolvendo PHYVV e PepGMV infectando plantas de pimenta (Renteria-Canett *et al.*, 2011). Os resultados demonstram que infecções mistas com PHYVV e PepGMV causam sintomas mais severos do que aqueles causados por infecções simples e que em infecções simples há uma tendência de diminuição dos níveis de DNA viral e, conseqüentemente, diminuição dos sintomas, enquanto que em infecções mistas as plantas não apresentam diminuição de sintomas e a concentração dos DNAs virais aumenta drasticamente. Neste mesmo estudo, na tentativa de entender os aspectos relacionados com essa interação sinérgica, experimentos com três componentes genômicos PHYVV (A+B) + PepGMV (A) foram conduzidos e o resultado foi um sinergismo similar ao observado quando ambos os vírus completos foram inoculados. Por outro lado, PepGMV (A+B) + PHYVV (A) não produziram uma interação de sinergismo. Assim, mutantes para cada gene individual foram testados e apenas o mutante para o gene TrAP de PepGMV não produziu sinergismo, indicando que o componente DNA-A de PepGMV é importante para que ocorra o sinergismo durante infecções mistas entre PHYVV e PepGMV.

## 5. Transmissão de begomovírus pelo vetor mosca-branca (*Bemisia tabaci*)

Os begomovírus não são transmitidos por sementes e nem por contato direto entre plantas infectadas e sadias. Sua dispersão ou introdução no campo dá-se pela ação da mosca-branca (*Bemisia tabaci*) a partir de fontes de vírus em áreas próximas, podendo ser de cultivos antigos como também de fontes alternativas no campo. A introdução do biótipo B de *B. tabaci* ocorreu entre 1986 e 1991 tornando-se praga importante em diversos países (Lourencão & Nagai, 1994). No Brasil, o biótipo A de *B. tabaci* era predominante até o início da década de 1990, quando foi relatada a introdução do biótipo B, provavelmente via plantas ornamentais importadas dos EUA (França *et al.*, 1996). Este biótipo, quando comparado ao biótipo A, apresenta um círculo mais amplo de hospedeiros, incluindo o tomateiro e outras solanáceas, e um grau de adaptação e dispersão muito maior (Bedford *et al.*, 1994).

A relação entre o vetor mosca-branca (*B. tabaci*) e o begomovírus é do tipo persistente-circulativo (Brown & Czosnek, 2002). As partículas virais são ingeridas juntamente com a seiva da planta infectada através do estilete e atingem a câmara de filtro e intestino médio via esôfago. Essas partículas são subsequentemente transportadas do intestino médio através da parede do intestino para a hemocele (hemolinfa) alcançando as glândulas salivares. O vírus é, então, translocado dentro do ducto salivar e finalmente eliminado juntamente com a saliva durante a alimentação (Ghanim *et al.*, 2001). A maior barreira na transmissão parece ser a passagem do vírus do intestino médio para a hemolinfa do inseto. O begomovírus *Squash leaf curl virus*, por exemplo, pode ser detectado na saliva e hemolinfa do seu vetor *B. tabaci*, biótipo B, mas não na saliva e hemolinfa da mosca-branca *Trialeurodes vaporariorum* (não-vetora), embora ambos os vetores consigam ingerir as partículas virais (Rosell *et al.*, 1999b). Fatores do hospedeiro parecem exercer um importante papel no processo de transmissão viral. Assim, a GroEl, homólogos de proteínas chaperonas, produzida pelo endossimbionte *Buchnera* em *B. tabaci*, a qual se liga a capa proteica (CP) de TYLCV (Morin *et al.*, 2000;

Akad *et al.*, 2007), é necessária para a passagem do vírus até a hemolinfa e eficiente transmissão. A CP é considerada essencial na transmissão e na especificidade do inseto vetor. A troca do gene CP de *African cassava mosaic virus*, transmitido por mosca-branca, pelo gene CP de *Beet curly top virus*, transmitido por cigarrinhas, altera a especificidade do inseto vetor de mosca-branca para cigarrinha (Briddon *et al.*, 1990). A CP do begomovírus não transmissível por mosca-branca *Abutilon mosaic virus* (AbMV) foi substituída pela CP de *Sida golden mosaic virus* (SiGMV), transmissível por mosca-branca, que resultou na quimera AbMV-SiGMV transmissível (Hofer *et al.*, 1997). Outros estudos revelaram que a substituição de apenas dois aminoácidos nas posições 124 e 149 da CP de AbMV é suficiente para tornar o vírus transmissível (Hohnle *et al.*, 2001).

A relação entre os begomovírus e a mosca-branca, incluindo diversas características de transmissão do vírus pelo vetor, tais como período de acesso de aquisição (PAA), período de acesso de inoculação (PAI), período de latência (PL), período de retenção, passagem transovariana, entre outros, foram estudadas em alguns países, envolvendo begomovírus de cucurbitáceas, como *Squash leaf curl virus* (SLCuV), onde a transmissão foi determinada por PCR a partir de extratos de *B. tabaci*, saliva e hemolinfa. SLCuV foi detectado em extratos do inseto após 30 minutos de PAA em abóbora infectada, após 2 horas na hemolinfa e na saliva após 8 horas (Rosell *et al.*, 1999a). Em tomate, principalmente o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), o DNA viral, por meio de técnicas de PCR, foi detectado na cabeça da mosca-branca 5 minutos após o PAA em plantas de tomate infectado, no tórax após 10 minutos e no abdômen após 25 minutos (Atzmon *et al.*, 1998). Outros vírus também foram alvos de estudos, como o *Cotton leaf curl virus* (CLCuV) em algodão (*Gossypium hirsutum*) (Nateshan *et al.*, 1996). Os resultados obtidos nesses estudos mencionados foram variáveis e relacionados à estirpe viral envolvida, à região geográfica e às condições de cada pesquisa. Nenhuma dessas espécies foi relatada no Brasil.

No Brasil, Santos *et al.* (2003) estudaram a interação de um begomovírus isolado de tomateiro, taxonomicamente relacionado ao *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), com o vetor *B. tabaci* biótipo B e analisaram os parâmetros PAA, PAI, PL, sua retenção e sua transmissão à progênie. Constatou-se um PAA mínimo de 15 minutos com o qual 6% dos tomateiros foram infectados. Este percentual aumentou para 65% quando o PAA foi estendido para 24 horas. O PAI mínimo foi de 30 minutos registrando-se 18% de infecção, o qual foi elevado para 67% com 24 horas de PAI. Observou-se o término do PL de 16 horas após o vetor adquirir o vírus. Na detecção do vírus via PCR o mesmo foi observado em ninfas desenvolvidas em tomateiro infectado, em adultos com diferentes PAAs, mas não em ovos de fêmeas avirulíferas ovopositados em plantas infectadas. Evidenciou-se a transmissão à progênie pela detecção do vírus em ovos, ninfas e adultos provenientes de fêmeas virulíferas, contudo, a transmissão do vírus pelos adultos não foi observada. Estes resultados indicam que a interação vírus-vetor é estabelecida desde a fase inicial do desenvolvimento do inseto e podem ser considerados relevantes para estudos epidemiológicos, além de reforçarem a importância da *B. tabaci* biótipo B na rápida disseminação do vírus no campo.

## **6. Begomovírus em tomateiro no Brasil**

O tomate (*Solanum lycopersicum*, família *Solanaceae*) é cultivado em regiões tropicais e subtropicais durante todo o ano. No Brasil, o tomate é a principal hortaliça em volume de produção. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no ano de 2011 a produção superou 4,1 milhões de toneladas ocupando uma área de 66,2 mil hectares. No entanto, os tomaticultores enfrentam graves problemas para viabilizar a produção, seja em pequenas ou grandes áreas, sendo que a incidência de doenças, notadamente as begomovíroses, destacam-se pela sua alta incidência e prejuízos. Os primeiros relatos de begomovírus no Brasil datam da década de 60 (Flores *et al.*, 1960). Plantas de tomateiro apresentando sintomas de deformação foliar, encrespamento e clorose internerval difusa

foram relatadas. Esse vírus pode ser transmitido por enxertia e por mosca-branca e induzir em plantas de *Sida rhombifolia* sintomas típicos de clorose infecciosa das malváceas. Com este trabalho, verificou-se que o provável agente causador desta doença em tomateiro poderia ser um begomovírus. Trabalhos posteriores confirmaram que o agente causal, denominado *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), apresentava partícula geminada típica dos geminivírus (Maytis *et al.*, 1975) e que era mecanicamente transmissível (Costa *et al.*, 1975). Costa (1974) descreveu três doenças transmitidas por moscas-brancas em tomateiro no Brasil: chita (mosaico dourado do tomateiro, de ocorrência ocasional em SP), encarquilhamento da folha (de importância econômica em SP, MG, PR) e engrujo (apenas em PE). Estas doenças apresentavam sintomas distintos e não se sabe se foram causadas por um isolado de TGMV ou por outra espécie. O TGMV foi a única espécie de begomovírus de tomateiro do Brasil caracterizada durante esta época e a sequência de nucleotídeos do genoma completo foi determinada e publicada em 1984 (Hamilton *et al.*, 1984). Até a década de 90, os relatos de possíveis begomovírus em tomateiro ficaram restritos a poucas publicações, o que pode indicar que foram ocorrências importantes, mas provavelmente esporádicas. Entretanto, a partir de 1994 foi iniciada uma série de relatos de ocorrências de begomovírus em tomateiros no Brasil, primeiramente na região do Distrito Federal (Ribeiro *et al.*, 1994) e, em seguida, em vários estados brasileiros, como MG (Rezende *et al.*, 1996; Zerbini *et al.*, 1996; Fernandes, 2002), BA (Ribeiro *et al.*, 1996), PE (Bezerra *et al.*, 1997) e CE (Lima *et al.*, 2000). Em 1996, a segunda espécie de begomovírus de tomateiro do Brasil foi proposta como *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) por Faria *et al.* (1997). Este isolado foi coletado em SP e foi considerado o vírus causador da doença do mosaico deformante da batata (Ribeiro *et al.*, 2006; Albuquerque *et al.*, 2010). Este súbito aumento na incidência de begomovírus em tomateiro provavelmente foi desencadeado pela introdução do novo biótipo (biótipo B) de mosca-branca, *B. tabaci*, no Brasil (França *et al.*, 1996). Não havia informação

sobre quais as espécies de begomovírus estavam envolvidas nestes surtos epidêmicos além de isolados de ToYVSV. Aparentemente estas espécies diferiam dos isolados relacionados ao TGMV, pois apresentavam uma difícil transmissão mecânica. Ribeiro *et al.* (1998) relataram a ocorrência de, pelo menos, seis espécies novas em plantas de tomateiro em amostras exibindo sintomas de mosaico amarelo, severa deformação foliar e epinastia. A análise de sequência de nucleotídeos de um segmento do genoma de isolados coletados entre 1994 e 1999 demonstrou a existência de possíveis sete novas espécies no Brasil (Ribeiro *et al.*, 2003). Estes isolados foram coletados nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste e isso indicou a existência de uma grande diversidade de espécies no País. Fernandes *et al.* (2008) mostraram que em estudo de determinação da sequência genômica parcial realizado com 295 isolados de begomovírus coletados em diferentes regiões do Brasil houve a predominância de três espécies, *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato golden vein virus* (TGVV) e *Tomato mottle leaf curl virus* (TMoLCV), e que duas destas espécies não constavam no grupo de espécies descrito anteriormente (Ribeiro *et al.*, 2003).

Espécies encontradas em tomateiro no Brasil formam um agrupamento distante de quaisquer begomovírus relatado nos demais países do Mundo. Isso pode indicar que provavelmente estes vírus evoluíram independente e isoladamente no Brasil. A hipótese mais aceita no momento pelos begomovirologistas brasileiros é de que a mosca-branca, *B. tabaci* biótipo B, de comportamento polífago, serviu de vetor para a transmissão e adaptação de begomovírus de plantas silvestres ou daninhas para o tomateiro. Atualmente são descritas 10 espécies de begomovírus isolados de tomateiro do Brasil: *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV), *Tomato leaf distortion virus* (ToLDV), *Tomato mottle leaf curl virus* (TMoLCV), *Tomato mild mosaic virus* (ToMIMV) e *Tomato yellow*

spot virus (ToYSV) (Hamilton *et al.*, 1984; Fernandes *et al.*, 2006; Calegario *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008; Albuquerque *et al.*, 2010).

## 7. Begomovírus em batateira-doce no Brasil

A batata-doce (*Ipomoea batatas*, família *Convolvulaceae*) é uma planta com o centro de origem na América do Sul (O'Brien, 1972). Atualmente, é cultivada na maioria das regiões tropical, subtropical e temperada do mundo. A batata-doce é rica em carboidratos, vitaminas do complexo B, minerais e apresenta baixo teor de gorduras. Além de nutritiva, é de cultivo relativamente fácil, com ampla adaptação, alta tolerância à seca e baixo custo de produção, o que a torna um importante alimento de subsistência, especialmente para as populações mais carentes. É uma planta que pode ser utilizada de várias formas: alimentação humana (*in natura* ou processada), alimentação animal (rama, raiz, raspa) ou ainda como matéria prima para indústria (produção de etanol). No Brasil, a batata-doce é uma das principais hortaliças, sendo a sexta em volume de produção. Segundo o IBGE, no ano de 2011 a produção chegou a 500.000 toneladas, com as regiões Sul e Nordeste representando as duas maiores produtoras do país. No entanto, devido a sua propagação vegetativa, a degenerescência causada pelo acúmulo de patógenos, notadamente os vírus, pode o fator mais limitante para a produção. Reduções em campo de até 90% têm sido descritas associadas a infecções virais em algumas regiões do mundo (Milgram *et al.*, 1996). Mais de 30 espécies de vírus são conhecidas infectando a cultura, dentre elas destacam-se: *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV, família *Closteroviridae*, gênero *Crinivirus*), *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV, família *Potyviriidae*, gênero *Potyvirus*), *Sweet potato mild mottle virus* (SPMMV, família *Potyviriidae*, gênero *Ipomovirus*) e *Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV, Família *Geminiviridae*, gênero *Begomovirus*) (Valverde *et al.*, 2007).

Os begomovírus que infectam plantas do gênero *Ipomoea* são monopartidos (Lozano *et al.*, 2009; Paprotka *et al.*, 2010a; Zhang & Ling, 2011) e, filogeneticamente, estes vírus, para

o qual o nome “sweepovírus” foi proposto (Fauquet *et al.*, 2003), são agrupados monofileticamente e em separado dos demais begomovírus (Lozano *et al.*, 2009). As primeiras espécies de begomovírus infectando plantas de batata-doce caracterizadas molecularmente foram SPLCV e *Sweet potato leaf Georgia virus* (SPLCGV) isoladas em Louisiana, Estados Unidos, em 1999 (Lotrakul & Valverde, 1999; Lotrakul *et al.*, 2003). Posteriormente, begomovírus infectando a batateira-doce foram descritos em outras localidades, incluindo Peru (Fuentes & Salazar, 2003), Espanha (Lozano *et al.*, 2009), China (Luan *et al.*, 2007), Itália (Briddon *et al.*, 2006), Uganda (Wasswa *et al.*, 2011) e Estados Unidos (Zhang & Ling, 2011). No Brasil, o conhecimento sobre a diversidade genética desses vírus é limitado, sendo que o primeiro estudo sobre caracterização molecular e diversidade genética de begomovírus infectando essa cultura foi realizado por Paprotka *et al.* (2010a). Neste estudo, amostras foliares foram coletadas de plantas dos acessos do banco de germoplasma de batata-doce da Embrapa Hortaliças. Amostras foliares de 55 acessos apresentando sintomas de mosaico, clorose internerval, amarelecimento e deformação foliar foram analisados e três espécies de begomovírus foram identificadas: SPLCV, Sweet potato golden vein-associated virus (SPGVaV) e Sweet potato mosaic-associated virus (SPMaV), sendo os dois últimos descritos como novas espécies do gênero. Devido ao tipo de propagação da cultura, a acumulação viral pode resultar na coinfeção de múltiplos vírus em uma única planta (infecção mista). Esse fenômeno pode levar à ocorrência de eventos de recombinação gerando maior diversidade e contribuindo para a evolução viral (Padidam *et al.*, 1999; Sanz *et al.*, 2000). Eventos de recombinação têm sido estudados nos últimos anos e são considerados os maiores responsáveis pela alta diversidade genética dos sweepovírus. Lozano *et al.* (2009) estudando a diversidade genética de begomovírus infectando plantas de batata-doce e *I. indica* no sul da Espanha, identificaram três novas espécies, *Sweet potato leaf curl Canary virus* (SPLCCaV), *Sweet potato leaf curl Lanzarote virus* (SPLCLaV) e *Sweet potato*



*leaf curl Spain virus* (SPLCESV). Estes autores demonstraram ainda que em populações de sweepovírus há uma frequente troca de material genético entre isolados, o que pode explicar a complexidade desse grupo de vírus. No Brasil, das duas espécies descritas (SPGVaV e SPMaV) apenas SPGVaV parece ser um recombinante. Quando isolados de SPGVaV foram analisados três pontos de recombinação foram identificados no genoma, sendo isolados de SPLCV e SPLCGV os prováveis parentais (Paprotka *et al.*, 2010a). Recentemente, Zang & Ling (2011) estudaram a diversidade genética de sweepovírus nos Estados Unidos a partir de amostras coletadas em dois estados, Mississippi e Carolina do Sul. Neste estudo, três espécies foram identificadas (SPLCV, SPGVaV e Sweet potato leaf curl South Carolina virus – SPLCSCV), sendo que SPLCSCV, de acordo com os critérios taxonômicos atuais (<89% de identidade nucleotídica), é considerada uma nova espécie do gênero e o isolado americano de SPGVaV um recombinante entre SPLCV e SPLCGV.

Mais recentemente, Trenado *et al.* (2011) conseguiram cumprir pela primeira vez os postulados de Koch utilizando um clone infectivo de uma espécie de sweepovírus. O clone obtido consiste de um dímero do genoma de um isolado da espécie *Sweet potato leaf curl Lanzarote virus* (SPLCLaV) ligado a um vetor binário. A infecção por agroinoculação em várias espécies de *Ipomoea* (incluindo plantas de batata-doce) e *Nicotiana benthamiana* foi confirmada por PCR, hibridização por “dot blot” e “Southern blot” e os sintomas observados nas plantas infectadas consistiram de enrolamento foliar, amarelecimento, redução do crescimento e amarelecimento de nervura. O vírus presente nas plantas agroinoculadas foi transmitido por *B. tabaci* a plantas de *I. setosa*. A progene viral presente nas plantas de *I. setosa* e batata-doce agroinoculadas foi isolada e identificada como o isolado original através de sequenciamento.

## **8. Referências Bibliográficas**

ACCOTTO, G.P.; MULLINEAUX, P.M.; BROWN, S.C. & MARIE, D. 1993. Digitaria streak geminivirus replicative forms are abundant in S-phase nuclei of infected cells. *Virology* 195:257-259.

AKAD, F.; EYBISHTZ, A.; EDELBAUM, D.; GOROVITS, R.; DAR-ISSA, O.; IRAKI, N. & CZOSNEK, H. 2007. Making a friend from a foe: Expressing a GroEL gene from the whitefly *Bemisia tabaci* in the phloem of tomato plants confers resistance to tomato yellow leaf curl virus. *Archives of Virology* 152:1323.

ALBUQUERQUE, L.C.; MARTIN, D.P.; AVILA, A.C. & INOUE-NAGATA, A.K. 2010. Characterization of tomato yellow vein streak virus, a begomovirus from Brazil. *Virus Genes* 40:140-147.

ALVES-JUNIOR, M.; ALFENAS-ZERBINI, P.; ANDRADE, E.C.; ESPOSITO, D.A.; SILVA, F.N.; AC, F.D.C.; VENTRELLA, M.C.; OTONI, W.C. & ZERBINI, F.M. 2009. Synergism and negative interference during co-infection of tomato and *Nicotiana benthamiana* with two bipartite begomoviruses. *Virology* 387:257-266.

ANDRADE, E.C.; MANHANI, G.G.; ALFENAS, P.F.; CALEGARIO, R.F.; FONTES, E.P. & ZERBINI, F.M. 2006. Tomato yellow spot virus, a tomato-infecting begomovirus from Brazil with a closer relationship to viruses from *Sida* sp., forms pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from *Sida*. *Journal of General Virology* 87:3687-3696.

ATZMON, G.; VAN-OSS, H. & CZOSNEK, H. 1998. PCR-amplification of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) DNA from squashes of plants and whitefly vectors: Application to the study of TYLCV acquisition and transmission. *European Journal of Plant Pathology* 104:189-194.

BEDFORD, I.D.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; ROSELL, R.C. & MARKHAM, P.G. 1994. Geminivirus transmission and biological characterisation of *Bemisia tabaci*

(Gennadius) biotypes from different geographic regions. *Annals of Applied Biology* 125:311-325.

BEZERRA, I.C.; RIBEIRO, S.G.; GIORDANO, L.B.; ZERBINI, F.M. & DE ÁVILA, A.C. 1997. Occurrence of geminivirus in tomato producing areas in Submédio São Francisco. *Fitopatologia Brasileira* 22:331.

BIGARRE, L.; SALAH, M.; GRANIER, M.; FRUTOS, R.; THOUVENEL, J.C. & PETERSCHMITT, M. 1999. Nucleotide sequence evidence for three distinct sugarcane streak mastreviruses. *Archives of Virology* 144:2331-2344.

BRIDDON, R.; PATIL, B.; BAGEWADI, B.; NAWAZ-UL-REHMAN, M. & FAUQUET, C. 2010. Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. *BMC Evolutionary Biology* 10:97.

BRIDDON, R.W.; BEDFORD, I.D.; TSAI, J.H. & MARKHAM, P.G. 1996. Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, *Tomato pseudo-curly top virus*, suggests a recombinant origin. *Virology* 219:387-394.

BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; MORIONES, E.; STANLEY, J.; ZERBINI, M.; ZHOU, X. & FAUQUET, C.M. 2008. Recommendations for the classification and nomenclature of the DNA-beta satellites of begomoviruses. *Archives of Virology* 153:763-781.

BRIDDON, R.W.; BULL-SIMON, 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. 2003. Diversity of DNA beta, a satellite molecule associated with some monopartite begomoviruses. *Virology* 312:106-121.

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. 2004.

Diversity of DNA 1: a satellite-like molecule associated with monopartite begomovirus-DNA beta complexes. *Virology* 324:462-474.

BRIDDON, R.W.; BULL, S.E. & BEDFORD, I.D. 2006. Occurrence of *Sweet potato leaf curl virus* in Sicily. *Plant Pathology* 55:286-286.

BRIDDON, R.W.; MANSOOR, S.; BEDFORD, I.D.; PINNER, M.S. & MARKHAM, P.G. 2000. Clones of cotton leaf curl geminivirus induce symptoms atypical of cotton leaf curl disease. *Virus Genes* 20:19-26.

BRIDDON, R.W.; MANSOOR, S.; BEDFORD, I.D.; PINNER, M.S.; SAUNDERS, K.; STANLEY, J.; ZAFAR, Y.; MALIK, K.A. & MARKHAM, P.G. 2001. Identification of DNA components required for induction of cotton leaf curl disease. *Virology* 285:234-243.

BRIDDON, R.W. & MARKHAM, P.G. 2000. Cotton leaf curl virus disease. *Virus Research* 71:151-159.

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

BROWN, J.K. & CZOSNEK, H. 2002. Whitefly transmission of plant viruses. *Advances in Botanical Research* 36:65-100.

BROWN, J.K.; FAUQUET, C.M.; BRIDDON, R.W.; ZERBINI, M.; MORIONES, E. & NAVAS-CASTILLO, J. 2011. Family Geminiviridae. In: Andrew M.Q.K.; Elliot L.; Michael J.A.; Eric B.C. (eds) *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, San Diego, pp 351-373.

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

CASTELLANO, M.M.; SANZ BURGOS, A.P. & GUTIERREZ, C. 1999. Initiation of DNA replication in a eukaryotic rolling-circle replicon: identification of multiple DNA-protein complexes at the geminivirus origin. *Journal of Molecular Biology* 290:639-652.

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

CASTILLO, A.G.; COLLINET, D.; DERET, S.; KASHOGGI, A. & BEJARANO, E.R. 2003. Dual interaction of plant PCNA with geminivirus replication accessory protein (REn) and viral replication protein (Rep). *Virology* 312:381-394.

COSTA, A.S. 1974. Moléstias do tomateiro transmitidos por mosca branca *Bemisia tabaci*. *Fitopatologia (Lima)* 9:47.

COSTA, A.S.; OLIVEIRA, A.R. & SILVA, D.M. 1975. Transmissão mecânica do mosaico dourado do tomateiro. *Fitopatologia Brasileira* 6:147.

CRAMERI, A.; RAILLARD, S.A.; BERMUDEZ, E. & STEMMER, W.P.C. 1998. DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature* 391:288-291.

CROMIE, G.A.; CONNELLY, J.C. & LEACH, D.R.F. 2001. Recombination at double-strand breaks and DNA ends: Conserved mechanisms from phage to humans. *Molecular Cell* 8:1163-1174.

CUI, X.; LI, G.; WANG, D.; HU, D. & ZHOU, X. 2005. A begomovirus DNA- $\beta$ -encoded protein binds DNA, functions as a supressor of RNA silencing, and targets the cell nucleus *Journal of Virology* 79:10764-10775.

DRAKE, J.W. 1991. A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88:7160-7164.

DRY, I.B.; KRAKE, L.R.; RIGDEN, J.E. & REZAIAN, A. 1997. A novel subviral agent associated with a geminivirus: The first report of a DNA satellite. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94:7088-7093.

DUFFY, S. & HOLMES, E.C. 2008. Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus tomato yellow leaf curl virus. Journal of Virology 82:957-965.

ELMER, J.S.; SUNTER, G.; GARDINER, W.E.; BRAND, L.; BROWNING, C.K.; BISARO, D.M. & ROGERS, S.G. 1988. Agrobacterium mediated inoculation of plants with tomato golden mosaic virus dna. Plant Molecular Biology 10:225-234.

ETESSAMI, P.; SAUNDERS, K.; WATTS, J. & STANLEY, J. 1991. Mutational analysis of complementary-sense genes of *African cassava mosaic virus* DNA-A. Journal of General Virology 72:1005-1012.

FARIA, J.C.; SOUZA DIAS, J.A.C. & SLACK, S.A. 1997. A new geminivirus associated with tomato in the state of São Paulo, Brazil. Plant Disease 81:423.

FAUQUET, C.M.; BISARO, D.M.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; HARRISON, B.D.; RYBICKI, E.P.; STENGER, D.C. & STANLEY, J. 2003. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family *Geminiviridae*, and an updated list of begomovirus species. Archives of Virology 148:405-421.

FAUQUET, C.M.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; MORIONES, E.; STANLEY, J.; ZERBINI, M. & ZHOU, X. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. Archives of Virology 153:783-821.

FAUQUET, C.M.; MAXWELL, D.P.; GRONENBORN, B. & STANLEY, J. 2000. Revised proposal for naming geminiviruses. *Archives of Virology* 145:1743-1761.

FAUQUET, C.M. & STANLEY, J. 2003. Geminivirus classification and nomenclature: progress and problems. *Annals of Applied Biology* 142:165-189.

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

FERNANDES, J.J. 2002. Identificação e Caracterização Biológica e Molecular de Begomovirus Infectando Tomateiro na Região de Triangulo Mineiro, MG. UFV, Viçosa, p 147

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

FIALLO-OLIVE, E.; MARTINEZ-ZUBIAUR, Y.; MORIONES, E. & NAVAS-CASTILLO, J. 2012. A novel class of DNA satellites associated with New World begomoviruses. *Virology* 426:1-6.

FLORES, E.; SILBERSCHMIDT, K. & KRAMER, M. 1960. Observações de "clorose infecciosa" das malváceas em tomateiros do campo. *O Biológico* 26:65-69.

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

FONTES, E.P.B.; GLADFELTER, H.J.; SCHAFFER, R.L.; PETTY, I.T.D. & HANLEY-BOWDOIN, L. 1994. Geminivirus replication origins have a modular organization. *Plant Cell* 6:405-416.

FRANÇA, F.H.; VILAS-BOAS, G.L. & CASTELO-BRANCO, M. 1996. Occurrence of *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (*Homoptera: Aleyrodidae*) in the Federal District. *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil* 25:369-372.

FRISCHMUTH, T.; ZIMMAT, G. & JESKE, H. 1990. The nucleotide sequence of *Abutilon mosaic virus* reveals prokaryotic as well as eukaryotic features. *Virology* 178:461-468.

FUENTES, S. & SALAZAR, L.F. 2003. First report of *Sweet potato leaf curl virus* in Peru. *Plant Disease* 87:98-98.

GAFNI, Y. & EPEL, B.L. 2002. The role of host and viral proteins in intra- and inter-cellular trafficking of geminiviruses. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 60:231-241.

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. 2003. 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* 84:715-726.

GARCIA-ANDRES, S.; MONCI, F.; NAVAS-CASTILLO, J. & MORIONES, E. 2006. Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: Evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature. *Virology* 350:433-442.

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

GARDINER, W.E.; SUNTER, G.; BRAND, L.; ELMER, J.S.; ROGERS, S.G. & BISARO, D.M. 1988. Genetic analysis of *Tomato golden mosaic virus* the coat protein is not required for systemic spread or symptom development. *EMBO Journal* 7:899-904.



GE, L.M.; ZHANG, J.T.; ZHOU, X.P. & LI, H.Y. 2007. Genetic structure and population variability of tomato yellow leaf curl China virus. *Journal of Virology* 81:5902-5907.

GHANIM, M.; MORIN, S. & CZOSNEK, H. 2001. Rate of *Tomato yellow leaf curl virus* translocation in the circulative transmission pathway of its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Phytopathology* 91:188-196.

GOPAL, P.; KUMAR, P.P.; SINILAL, B.; JOSE, J.; YADUNANDAM, A.K. & USHA, R. 2007. Differential roles of C4 and beta C1 in mediating suppression of post-transcriptional gene silencing: Evidence for transactivation by the C2 of Bendi yellow vein mosaic virus, a monopartite begomovirus. *Virus Research* 123:9-18.

GRONENBORN, B. 2004. Nanoviruses: Genome organisation and protein function. *Veterinary Microbiology* 2004; 98:103-109.

GUTIERREZ, C. 1999. Geminivirus DNA replication. *Cellular and Molecular Life Sciences* 56:313-329.

GUTIERREZ, C. 2000. Geminiviruses and the plant cell cycle. *Plant Molecular Biology* 43:763-772.

GUTIERREZ, C. 2002. Strategies for geminivirus DNA replication and cell cycle interference. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 60:219-230.

HALLEY-STOTT, R.P.; TANZER, F.; MARTIN, D.P. & RYBICKI, E.P. 2007. The complete nucleotide sequence of a mild strain of Bean yellow dwarf virus. *Archives of Virology* 152:1237-1240.

HAMILTON, W.D.O.; STEIN, V.E.; COUTTS, R.H.A. & BUCK, K.W. 1984. Complete nucleotide-sequence of the infectious cloned DNA components of Tomato golden mosaic virus - potential coding regions and regulatory sequences. *EMBO Journal* 3:2197-2205.

HANLEY-BOWDOIN, L.; SETTLAGE, S.B.; OROZCO, B.M.; NAGAR, S. & ROBERTSON, D. 1999. Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18:71-106.

HAYWOOD, V.; KRAGLER, F. & LUCAS, W.J. 2002. Plasmodesmata: Pathways for protein and ribonucleoprotein signaling. *Plant Cell* 14:S303-S325.

HEINLEIN, M.; EPEL, B.L.; PADGETT, H.S. & BEACHY, R.N. 1995. Interaction of tobamovirus movement proteins with the plant cytoskeleton. *Science* 270:1983-1985.

HEINLEIN, M.; PADGETT, H.S.; GENS, J.S.; PICKARD, B.G.; CASPER, S.J.; EPEL, B.L. & BEACHY, R.N. 1998. Changing patterns of localization of the tobacco mosaic virus movement protein and replicase to the endoplasmic reticulum and microtubules during infection. *Plant Cell* 10:1107-1120.

HEYRAUD-NITSCHKE, F.; SCHUMACHER, S.; LAUFS, J.; SCHAEFER, S.; SCHELL, J. & GRONENBORN, B. 1995. Determination of the origin cleavage and joining domain of geminivirus Rep proteins. *Nucleic Acids Research* 23:910-916.

HOFER, P.; BEDFORD, I.D.; MARKHAM, P.G.; JESKE, H. & FRISCHUTH, T. 1997. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. *Virology* 236:288-295.

HOHNLE, M.; HOFER, P.; BEDFORD, I.D.; BRIDDON, R.W.; MARKHAM, P.G. & FRISCHMUTH, T. 2001. Exchange of three amino acids in the coat protein results in efficient whitefly transmission of a nontransmissible Abutilon mosaic virus isolate. *Virology* 290:164-171.

HOLMES, E.C. 2004. The phylogeography of human viruses. *Molecular Ecology* 13:745-756.

HOU, Y.M. & GILBERTSON, R.L. 1996. Increased pathogenicity in a pseudorecombinant bipartite geminivirus correlates with intermolecular recombination. *Journal of Virology* 70:5430-5436.

HU, C.-C.; HSU, Y.-H. & LIN, N.-S. 2009. Satellite RNAs and Satellite Viruses of Plants. *Viruses* 1:1325-1350.

HUGHES, F.L.; RYBICKI, E.P. & KIRBY, R. 1993. Complete nucleotide sequence of sugarcane streak Monogeminivirus. *Archives of Virology* 132:171-182.

HULL, R. 2002. *Matthews' Plant Virology (Fourth Edition)*. Academic Press, London, p 1001.

IDRIS, A., M. & BROWN, J., K. 2002. Molecular analysis of cotton leaf curl virus-Sudan reveals an evolutionary history of recombination. *Virus Genes* 24:249-256.

JENKINS, G.M.; RAMBAUT, A.; PYBUS, O.G. & HOLMES, E.C. 2002. Rates of molecular evolution in RNA viruses: A quantitative phylogenetic analysis. *Journal of Molecular Evolution* 54:156-165.

JESKE, H.; LUETGEMEIER, M. & PREISS, W. 2001. DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of *Abutilon mosaic virus*. *EMBO Journal* 20:6158-6167.

JUPIN, I.; DE KOUCHKOVSKY, F.; JOUANNEAU, F. & GRONENBORN, B. 1994. Movement of tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV): Involvement of the protein encoded by ORF C4. *Virology* 204:82-90.

KANEVSKI, I.F.; THAKUR, S.; COSOWSKY, L.; SUNTER, G.; BROUGH, C.; BISARO, D. & MALIGA, P. 1992. Tobacco lines with high copy number of replicating recombinant geminivirus vectors after biolistic DNA delivery. *The Plant Journal* 2:457-463.

KEIGHTLEY, P.D. & OTTO, S.P. 2006. Interference among deleterious mutations favours sex and recombination in finite populations. *Nature* 443:89-92.

KOONIN, E.V. & ILYINA, T.V. 1992. Geminivirus replication proteins are related to prokaryotic plasmid rolling circle DNA replication initiator proteins. *Journal of General Virology* 73:2763-2766.

KUNIK, T.; PALANICHELAM, K.; CZOSNEK, H.; CITOVSKEY, V. & GAFNI, Y. 1998. Nuclear import of the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in plant and insect cells. *Plant Journal* Feb 13:393-399.

LAZAROWITZ, S.G. 1992. Geminiviruses: genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences* 11:327-349.

LEFEUVRE, P.; LETT, J.M.; VARSANI, A. & MARTIN, D.P. 2009. Widely conserved recombination patterns among single-stranded DNA viruses. *Journal of Virology* 83:2697-2707.

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

LIMA, J.A.A.; GONCALVES, M.F.B.; OLIVEIRA, V.B.; TORRES FILHO, J. & MIRANDA, A.C.M.M. 2000. Serological and PCR detection of a Begomovirus infecting tomato fields in Ibiapaba Mountain, Ceara. *Fitopatologia Brasileira* 2000; 25:104-108.

LIU, H.; BOULTON, M.I.; THOMAS, C.L.; PRIOR, D.A.M.; OPARKA, K.J. & DAVIES, J.W. 1999. Maize streak virus coat protein is karyophilic and facilitates nuclear transport of viral DNA. *Molecular Plant Microbe Interactions* 12:894-900.

LIU, L.; VAN, T., TERTIA; PIETERSEN, G.; DAVIES, J., W. & STANLEY, J. 1997. Molecular characterization of a subgroup I geminivirus from a legume in South Africa. *Journal of General Virology* 78:2113-2117.

LIU, Y.; ROBINSON, D., J. & HARRISON, B., D. 1998. Defective forms of cotton leaf curl virus DNA-A that have different combinations of sequence deletion, duplication, inversion and rearrangement. *Journal of General Virology* 79:1501-1508.

LOTRAKUL, P. & VALVERDE, R.A. 1999. Cloning of a DNA-A-like genomic component of sweet potato leaf curl virus: nucleotide sequence and phylogenetic relationships. *Molecular Plant Pathology*

Online: <http://www.bspp.org.uk/mppol/1999/0422lotrakul/index.htm>

LOTRAKUL, P.; VALVERDE, R.A.; CLARK, C.A. & FAUQUET, C.M. 2003. Properties of a begomovirus isolated from sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) infected with *Sweet potato leaf curl virus*. *Revista Mexicana de Fitopatologia* 21:128-136.

LOURENCÃO, A.L. & NAGAI, H. 1994. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no estado de São Paulo. *Bragantia* 53:53-59.

LOZANO, G.; TRENADO, H.P.; VALVERDE, R.A. & NAVAS-CASTILLO, J. 2009. Novel begomovirus species of recombinant nature in sweet potato (*Ipomoea batatas*) and *Ipomoea indica*: taxonomic and phylogenetic implications. *Journal of General Virology* 90:2550-2562.

LUAN, Y.S.; ZHANG, J.; LIU, D.M. & LI, W.L. 2007. Molecular characterization of sweet potato leaf curl virus isolate from China (SPLCV-CN) and its phylogenetic relationship with other members of the *Geminiviridae*. *Virus Genes* 35:379-385.

LUCAS, W.J. 2006. Plant viral movement proteins: Agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology* 344:169-184.

LUCAS, W.J. & LEE, J.Y. 2004. Plant cell biology - Plasmodesmata as a supracellular control network in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5:712-726.

MALPICA, J.M.; FRAILE, A.; MORENO, I.; OBIES, C.I.; DRAKE, J.W. & GARCIA-ARENAL, F. 2002. The rate and character of spontaneous mutation in an RNA virus. *Genetics* 162:1505-1511.

MANSOOR, S.; KHAN, S.H.; BASHIR, A.; SAEED, M.; ZAFAR, Y.; MALIK, K.A.; BRIDDON, R.W.; STANLEY, J. & MARKHAM, P.G. 1999. Identification of a novel circular single-stranded DNA associated with cotton leaf curl disease in Pakistan. *Virology* 259:190-199.

MARTIN, D.P.; BIAGINI, P.; LEFEUVRE, P.; GOLDEN, M.; ROUMAGNAC, P. & VARSANI, A. 2011. Recombination in Eukaryotic Single Stranded DNA Viruses. *Viruses* 3:1699-1738.

MAYTIS, J.C.; SILVA, D.M.; OLIVEIRA, A.R. & COSTA, A.S. 1975. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. *Summa Phytopathologica* 1: 267-275.

MCLEAN, B.G.; ZUPAN, J. & ZAMBRYSKI, P.C. 1995. Tobacco Mosaic Virus Movement Protein Associates with the Cytoskeleton in Tobacco Cells. *The Plant Cell Online* 7:2101-2114.

MÉNDEZ-LOZANO, J.; TORRES-PACHECO, I.; FAUQUET, C.M. & RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. 2003. Interactions Between Geminiviruses in a Naturally Occurring Mixture: Pepper huasteco virus and Pepper golden mosaic virus. *Phytopathology* 93:270-277.

MILGRAM, M.; COHEN, J. & LOEBENSTEIN, G. 1996. Effects of sweet potato feathery mottle virus and sweet potato sunken vein virus on sweet potato yields and rates of reinfection of virus-free planting material in Israel. *Phytoparasitica* 24:189-193.

MONCI, F.; SANCHEZ-CAMPOS, S.; NAVAS-CASTILLO, J. & MORIONES, E. 2002. 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* 303:317-326.

MORALES, F.J. & ANDERSON, P.K. 2001. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology* 146:415-441.

MORIN, S.; GHANIM, M.; SOBOL, I. & CZOSNEK, H. 2000. 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* [print] October 25, 2000; 276:404-416.

NAGAR, S.; PEDERSEN, T.J.; CARRICK, K.M.; HANLEY BOWDOIN, L. & ROBERTSON, D. 1995. A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. *Plant Cell* 7:705-719.

NAHID, N.; AMIN, I.; MANSOOR, S.; RYBICKI, E.P.; VAN DER WALT, E. & BRIDDON, R.W. 2008. Two dicot-infecting mastreviruses (family Geminiviridae) occur in Pakistan. *Archives of Virology* 153:1441-1451.

NATESHAN, H.M.; MUNIYAPPA, V.; SWANSON, M.M. & HARRISON, B.D. 1996. Host range, vector relations and serological relationships of cotton leaf curl virus from southern India. *Annals of Applied Biology* 128:233-244.

NAVAS-CASTILLO, J.; SANCHEZ-CAMPOS, S.; NORIS, E.; LOURO, D.; ACCOTTO, G.P. & MORIONES, E. 2000. Natural recombination between Tomato yellow leaf curl virus-Is and Tomato leaf curl virus. *Journal of General Virology* 81:2797-2801.

NAWAZ-UL-REHMAN, M.S. & FAUQUET, C.M. 2009. Evolution of geminiviruses and their satellites. *FEBS Letters* 583:1825-1832.

NDUNGURU, J.; LEGG, J.P.; AVELING, T.A.S.; THOMPSON, G. & FAUQUET, C.M. 2005. Molecular biodiversity of cassava begomoviruses in Tanzania: evolution of cassava geminiviruses in Africa and evidence for East Africa being a center of diversity of cassava geminiviruses. *Virology Journal* 2:21.

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

O'BRIEN, P.J. 1972. The Sweet Potato: Its Origin and Dispersal. *American Anthropologist* 74:342-365.

OROZCO, B.M. & HANLEY-BOWDOIN, L. 1998. Conserved sequence and structural motifs contribute to the DNA binding and cleavage activities of a geminivirus replication protein. *Journal of Biological Chemistry* 273:24448-24456.

PADIDAM, M.; BEACHY, R.N. & FAUQUET, C.M. 1995a. Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. *Journal of General Virology* 76:249-263.

PADIDAM, M.; BEACHY, R.N. & FAUQUET, C.M. 1996. The role of AV2 ("Precoat") and coat protein in viral replication and movement in tomato leaf curl geminivirus. *Virology* 224:390-404.

PADIDAM, M.; BEACHY ROGER, N. & FAUQUET CLAUDE, M. 1995b. Tomato leaf curl geminivirus from India has a bipartite genome and coat protein is not essential for infectivity. *Journal of General Virology* 76:25-35.

PADIDAM, M.; SAWYER, S. & FAUQUET, C.M. 1999. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265:218-225.

PAPROTKA, T.; BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N.; RESENDE, R.O.; JESKE, H.; FARIA, J.C. & RIBEIRO, S.G. 2010a. Genomic diversity of sweet potato geminiviruses in a Brazilian germplasm bank. *Virus Research* 149:224-233.

PAPROTKA, T.; METZLER, V. & JESKE, H. 2010b. The first DNA 1-like alpha satellites in association with New World begomoviruses in natural infections. *Virology* 404:148-157.



PASCAL, E.; SANDERFOOT ANTON, A.; WARD BRIAN, M.; MEDVILLE, R.; TURGEON, R. & LAZAROWITZ SONDRRA, G. 1994. The geminivirus BR1 movement protein binds single-stranded DNA and localizes to the cell nucleus. *Plant Cell* 6:995-1006.

PATIL, B.L. & FAUQUET, C.M. 2010. Differential interaction between cassava mosaic geminiviruses and geminivirus satellites. *Journal of General Virology* 91:1871-1882.

PEDERSEN, T., J. & HANLEY-BOWDOIN, L. 1994. Molecular characterization of the AL3 protein encoded by a bipartite geminivirus. *Virology* 202:1070-1075.

PILARTZ, M. & JESKE, H. 1992. Abutilon mosaic geminivirus double-stranded dna is packed into minichromosomes. *Virology* 189:800-802.

PILARTZ, M. & JESKE, H. 2003. Mapping of Abutilon mosaic geminivirus minichromosomes. *Journal of Virology* 77:10808-10818.

POOMA, W.; GILLETTE WILLIAM, K.; JEFFREY JERRY, L. & PETTY IAN, T.D. 1996. Host and viral factors determine the dispensability of coat protein for bipartite geminivirus systemic movement. *Virology* 218:264-268.

RAMOS, P.L.; GUEVARA-GONZALEZ, R.G.; PERAL, R.; ASCENCIO-IBANEZ, J.T.; POLSTON, J.E.; ARGUELLO-ASTORGA, G.R.; VEGA-ARREGUIN, J.C. & RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. 2003. *Tomato mottle Taino virus* pseudorecombines with PYMV but not with ToMoV: implications for the delimitation of *cis*- and *trans*-acting replication specificity determinants. *Archives of Virology* 148:1697-1712.

RENTERIA-CANETT, I.; XOCONOSTLE-CAZARES, B.; RUIZ-MEDRANO, R. & RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. 2011. Geminivirus mixed infection on pepper plants: synergistic interaction between PHYVV and PepGMV. *Virol J* 8:104.

REZENDE, E.A.; FILGUEIRA, F.A.R.; ZERBINI, F.M.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; FERNANDES, J.J. & GILBERTSON, R.L. 1996. Tomato infected with geminivirus in greenhose conditions at Uberlandia-MG, Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 21:424.

RIBEIRO, S.G.; AMBROZEVÍCIUS, L.P.; DE AVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; CALEGARIO, R.F.; FERNANDES, J.J.; LIMA, M.F.; MELLO, R.N.; ROCHA, H. & ZERBINI, F.M. 2003. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting geminiviruses in Brazil. *Archives of Virology* 148:281-295.

RIBEIRO, S.G.; BEZERRA, I.C.; LIMA, M.F.; DE ÁVILA, A.C. & GIORDANO, L.B. 1996. Occurrence of geminivirus in tomato plants in Bahia. 8º Encontro Nacional de Virologia, São Lourenço, MG, p 290

RIBEIRO, S.G.; DE AVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; FERNANDES, J.J.; FARIA, J.C.; LIMA, M.F.; GILBERTSON, R.L.; MACIEL ZAMBOLIM, E. & ZERBINI, F.M. 1998. Widespread occurrence of tomato geminiviruses in Brazil, associated with the new biotype of the whitefly vector. *Plant Disease* 82:830.

RIBEIRO, S.G.; INOUE-NAGATA, A.K.; DANIELS, J. & DE AVILA, A.C. 2006. Potato deforming mosaic disease is caused by an isolate of Tomato yellow vein streak virus. *Plant Pathology* 55:569.

RIBEIRO, S.G.; MARTIN, D.P.; LACORTE, C.; SIMÕES, I.C.; ORLANDINI, D.R.S. & INOUE-NAGATA, A.K. 2007. Molecular and biological characterization of *Tomato chlorotic mottle virus* suggests that recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses. *Phytopathology* 97:702-711.

RIBEIRO, S.G.; MELLO, L.V.; BOITEUX, L.S.; KITAJIMA, E.W. & FARIA, J.C. 1994. Tomato infection by a geminivirus in the Federal District. *Fitopatologia Brasileira* 19:330.

RIGDEN, J.E.; KRAKE, L.R.; REZAIAN, M.A. & DRY, I.B. 1994. ORF C4 of Tomato Leaf Curl Geminivirus Is a Determinant of Symptom Severity. *Virology* 204:847-850.

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

ROJAS, M.R.; NOUEIRY, A.O.; LUCAS, W.J. & GILBERTSON, R.L. 1998. Bean dwarf mosaic geminivirus movement proteins recognize DNA in a form- and size-specific manner. *Cell* 95:105-113.

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

ROSELL, R.C.; TORRES-JEREZ, I. & BROWN, J.K. 1999a. Tracing the geminivirus-whitefly transmission pathway by polymerase chain reaction in whitefly extracts, saliva, haemolymph, and honeydew. *Phytopathology* 89:239-246.

ROSELL, R.C.; TORRES-JEREZ, I. & BROWN, J.K. 1999b. Tracing the geminivirus-whitefly transmission pathway by polymerase chain reaction in whitefly extracts, saliva, hemolymph, and honeydew. *Phytopathology* 89:239-246.

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

SAEED, M.; BEHJATNIA, S.A.A.; MANSOOR, S.; ZAFAR, Y.; HASNAIN, S. & REZAIAN, M.A. 2005. A single complementary-sense transcript of a geminiviral DNA beta satellite is determinant of pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18:7-14.

SANDERFOOT, A.A. & LAZAROWITZ, S.G. 1995. Cooperation in viral movement: The geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus of the cell periphery. *Plant Cell* 7:1185-1194.

SANDERFOOT, A.A. & LAZAROWITZ, S.G. 1996. Getting it together in plant virus movement cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. Trends in Cell Biology 6:353-358.

SANTOS, C.D.G.; ÁVILA, A.C.D. & RESENDE, R.D.O. 2003. Estudo da interação de um begomovírus isolado de tomateiro com a mosca branca. Fitopatologia Brasileira 28:664-673.

SANZ, A.I.; FRAILE, A.; GARCIA-ARENAL, F.; ZHOU, X.; ROBINSON, D.J.; KHALID, S.; BUTT, T. & HARRISON, B.D. 2000. Multiple infection, recombination and genome relationships among begomovirus isolates found in cotton and other plants in Pakistan. Journal of General Virology 81:1839-1849.

SAUNDERS, K.; BEDFORD, I.D.; BRIDDON, R.W.; MARKHAM, P.G.; WONG, S. & STANLEY, J. 2000. A unique virus complex causes *Ageratum* yellow vein disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97:6890-6895.

SAUNDERS, K.; SALIM, N.; MALI, V.R.; MALATHI, V.G.; BRIDDON, R.; MARKHAM, P.G. & STANLEY, J. 2002. Characterisation of *Sri Lankan cassava mosaic virus* and *Indian cassava mosaic virus*: Evidence for acquisition of a DNA B component by a monopartite begomovirus. Virology 293:63-74.

SAUNDERS, K. & STANLEY, J. 1999. A nanovirus-like DNA component associated with yellow vein disease of *Ageratum conyzoides*: Evidence for interfamilial recombination between plant DNA viruses. Virology 264:142-152.

SCHNEIDER, W.L. & ROOSSINCK, M.J. 2000. Evolutionarily related Sindbis-like plant viruses maintain different levels of population diversity in a common host. Journal of Virology 74:3130-3134.

SCHOLTHOF, H.B. 2005. Plant virus transport: motions of functional equivalence. *Trends in Plant Science* 10:376-382.

SEAL, S.E.; VANDENBOSCH, F. & JEGER, M.J. 2006. Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: Implications for sustainable control. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25:23-46.

SELTH, L.A.; RANGLES, J.W. & REZAIAN, M.A. 2002. *Agrobacterium tumefaciens* supports DNA replication of diverse geminivirus types. *FEBS Letters* 516:179-182.

SETTLAGE, S.B.; MILLER, A.B.; GRUISSEM, W. & HANLEY BOWDOIN, L. 2001. Dual interaction of a geminivirus replication accessory factor with a viral replication protein and a plant cell cycle regulator. *Virology* 279:570-576.

SETTLAGE, S.B.; MILLER, A.B. & HANLEY BOWDOIN, L. 1996. Interactions between geminivirus replication proteins. *Journal of Virology* 70:6790-6795.

SHACKELTON, L.A. & HOLMES, E.C. 2006. Phylogenetic evidence for the rapid evolution of human B19 erythrovirus. *Journal of Virology* 80:3666-3669.

SHACKELTON, L.A.; PARRISH, C.R.; TRUYEN, U. & HOLMES, E.C. 2005. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:379-384.

SHEPHERD, D.N.; VARSANI, A.; WINDRAM, O.P.; LEFEUVRE, P.; MONJANE, A.L.; OWOR, B.E. & MARTIN, D.P. 2008. Novel sugarcane streak and Sugarcane streak Reunion mastreviruses from southern Africa and La Reunion. *Archives of Virology* 153:605-609.

STANLEY, J.; BISARO, D.M.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; FAUQUET, C.M.; HARRISON, B.D.; RYBICKI, E.P. & STENGER, D.C. 2005. Family *Geminiviridae*. In: Fauquet C.M.; Mayo M.A.; Maniloff J.; Desselberger U.; Ball L.A. (eds) *Virus Taxonomy*

Classification and Nomenclature of Viruses Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp 301-326.

STANLEY, J.; SAUNDERS, K.; PINNER, M.S. & WONG, S.M. 1997. Novel defective interfering DNAs associated with ageratum yellow vein geminivirus infection by *Ageratum conyzoides*. *Virology* 239:87-96.

STANLEY, J.; TOWNSEND, R. & CURSON, S.J. 1985. Pseudorecombinants between Cloned DNAs of Two Isolates of Cassava Latent Virus. *Journal of General Virology* 66:1055-1061.

STENGER, D.C.; DUFFUS, J.E. & VILLALON, B. 1990. Biological and genomic properties of a geminivirus isolated from pepper. *Phytopathology* 80:704-709.

SUNTER, G. & BISARO, D.M. 1992. Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. *Plant Cell* 4:1321-1331.

SUNTER, G.; SUNTER, J.L. & BISARO, D.M. 2001. Plants expressing Tomato golden mosaic virus AL2 or beet curly top virus L2 transgenes show enhanced susceptibility to infection by DNA and RNA viruses. *Virology* 285:59-70.

TAN, P.H.N.; WONG, S.M.; WU, M.; BEDFORD, I.D.; SAUNDERS, K. & STANLEY, J. 1995. Genome organization of ageratum yellow vein virus, a monopartite whitefly-transmitted geminivirus isolated from a common weed. *Journal of General Virology* 76:2915-2922.

TAO, X. & ZHOU, X. 2004. A modified viral satellite DNA that suppresses gene expression in plants. *Plant Journal* 38:850-860.

THOMAS, J.; PARRY, J.; SCHWINGHAMER, M. & DANN, E. 2010. Two novel mastreviruses from chickpea (*Cicer arietinum*) in Australia. *Archives of Virology* 155:1777-1788.

TIMCHENKO, T.; KATUL, L.; SANO, Y.; DE KOUCHKOVSKY, F.; VETTEN, H.J. & GRONENBORN, B. 2000. The Master Rep Concept in Nanovirus Replication: Identification of Missing Genome Components and Potential for Natural Genetic Reassortment. *Virology* 274:189-195.

TORRES-PACHECO, I.; GARZON-TIZNADO, J.A.; BROWN, J.K.; BECERRA, F.A. & RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. 1996. Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the southern United States. *Phytopathology* 86:1186-1192.

TRENADO, H.P.; ORÍLIO, A.F.; MÁRQUEZ-MARTÍN, B.; MORIONES, E. & NAVAS-CASTILLO, J. 2011. Sweepviruses cause disease in sweet potato and related *Ipomoea* spp.: fulfilling Koch's postulates for a divergent group in the genus *Begomovirus*. *PLoS One* 6:e27329.

TZFIRA, T.; RHEE, Y.; CHEN, M.H.; KUNIK, T. & CITOVSKEY, V. 2000. Nucleic acid transport in plant-microbe interactions: The molecules that walk through the walls. *Annual Review of Microbiology* 54:187-219.

UMAHARAN, P.; PADIDAM, M.; PHELPS, R.H.; BEACHY, R.N. & FAUQUET, C.M. 1998. Distribution and diversity of geminiviruses in Trinidad and Tobago. *Phytopathology* 88:1262-1268.

UNSELD, S.; FRISCHMUTH, T. & JESKE, H. 2004. Short deletions in nuclear targeting sequences of *African cassava mosaic virus* coat protein prevent geminivirus twinned particle formation. *Virology* 318:90-101.

VALVERDE, R.A.; CLARK, C.A. & VALKONEN, J.P.T. 2007. Viruses and virus disease complexes of sweetpotato. *Plant Viruses* 1:116-126.

VAN DER WALT, E.; MARTIN, D.P.; VARSANI, A.; POLSTON, J.E. & RYBICKI, E.P. 2008. Experimental observations of rapid Maize streak virus evolution reveal a strand-specific nucleotide substitution bias. *Virology Journal* 5:104.

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

VARMA, A. & MALATHI, V.G. 2003. Emerging geminivirus problems: A serious threat to crop production. *Annals of Applied Biology* 142:145-164.

VARSANI, A.; OLUWAFEMI, S.; WINDRAM, O.P.; SHEPHERD, D.N.; MONJANE, A.L.; OWOR, B.E.; RYBICKI, E.P.; LEFEUVRE, P. & MARTIN, D.P. 2008a. Panicum streak virus diversity is similar to that observed for maize streak virus. *Archives of Virology* 153:601-604.

VARSANI, A.; SHEPHERD, D.N.; MONJANE, A.L.; OWOR, B.E.; ERDMANN, J.B.; RYBICKI, E.P.; PETERSCHMITT, M.; BRIDDON, R.W.; MARKHAM, P.G.; OLUWAFEMI, S.; WINDRAM, O.P.; LEFEUVRE, P.; LETT, J.M. & MARTIN, D.P. 2008b. Recombination, decreased host specificity and increased mobility may have driven the emergence of *Maize streak virus* as an agricultural pathogen. *Journal of General Virology* 89:2063-2074.

WANG, H.; HAO, L.; SHUNG, C.Y.; SUNTER, G. & BISARO, D.M. 2003. Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Plant Cell* 15:3020-3032.

WASSWA, P.; OTTO, B.; MARUTHI, M.N.; MUKASA, S.B.; MONGER, W. & GIBSON, R.W. 2011. First identification of a sweet potato begomovirus (sweepovirus) in Uganda: characterization, detection and distribution. *Plant Pathology* 60:1030-1039.

ZERBINI, F.M.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; FERNANDES, J.J.; GILBERTSON, R.L. & CARRIJO, I.V. 1996. Um novo geminivirus isolado de tomateiro (*L. esculentum*) em Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira* 21:430.



ZHANG, S.C. & LING, K.S. 2011. Genetic diversity of sweet potato begomoviruses in the United States and identification of a natural recombinant between *Sweet potato leaf curl virus* and *Sweet potato leaf curl Georgia virus*. *Archives of Virology* 156:955-968.

ZHOU, X.; LIU, Y.; CALVERT, L.; MUNOZ, C.; OTIM-NAPE, G.W.; ROBINSON, D.J. & HARRISON, B.D. 1997. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *Journal of General Virology* 78:2101-2111.

ZHOU, X.; LIU, Y.; ROBINSON, D.J. & HARRISON, B.D. 1998. Four DNA-A variants among Pakistani isolates of cotton leaf curl virus and their affinities to DNA-A of geminivirus isolates from okra. *Journal of General Virology* 79:915-923.

# CAPÍTULO 2

---

---

## **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BEGOMOVÍRUS INFECTANDO TOMATEIRO NO BRASIL**

# CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BEGOMOVÍRUS INFECTANDO TOMATEIRO NO BRASIL\*

## RESUMO

O cultivo de tomateiro no Brasil é frequentemente ameaçado por espécies de begomovírus (família *Geminiviridae*). Aqui, são descritas as sequências completas do DNA-A de três begomovírus do Brasil: uma potencial nova espécie, Tomato interveinal chlorosis virus (ToICV), e duas espécies anteriormente propostas, onde somente as sequências parciais do DNA-A estão disponíveis no banco de dados, Tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV) e Tomato golden vein virus (TGVV). As sequências completas do componente DNA-B de TMoLCV e TGVV e do componente DNA-A de variantes de *Tomato severe rugose virus* também são descritas. Coletivamente todas as sequências analisadas foram filogeneticamente próximas aos dois principais grupos de begomovírus que infectam tomateiro no Brasil.

**Palavra-chave:** Geminivírus, TGVV, TMoLCV, ToICV, *Solanum lycopersicum*

\* Capítulo publicado na revista Archives of Virology (Anexo 7) com modificações:

ALBUQUERQUE, L.; VARSANI, A.; FERNANDES, F.; PINHEIRO, B.; MARTIN, D.; DE TARSO OLIVEIRA FERREIRA, P.; LEMOS, T. & INOUE-NAGATA, A. 2012. Further characterization of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. Archives of Virology 157:747-752

# **FURTHER CHARACTERIZATION OF TOMATO-INFECTING BEGOMOVIRUSES IN BRAZIL**

## **ABSTRACT**

Tomato cultivation in Brazil is threatened by a number of tomato-infecting virus species within the genus *Begomovirus* of the family *Geminiviridae*. Here we report the full DNA-A sequences of three Brazilian begomoviruses: a potentially new tomato-infecting species, Tomato interveinal chlorosis virus (ToICV), and two previously proposed species for which only partial DNA-A sequences are available in the databases, Tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV) and Tomato golden vein virus (TGVV). The complete sequences of the DNA-B components of TMoLCV and TGVV and the DNA-A components of a number of *Tomato severe rugose virus* variants are also presented. Collectively all of the analyzed sequences were phylogenetically clustered within the two major groups of Brazilian tomato-infecting begomoviruses.

**Keywords:** Geminiviruses, TGVV, TMoLCV, ToICV, *Solanum lycopersicum*

## 1. INTRODUÇÃO

Membros do gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) nativos do Novo Mundo são bipartidos e provavelmente surgiram de um ancestral comum (Rojas *et al.*, 2005). Esses vírus infectam uma variedade de plantas economicamente importantes e estão entre os principais problemas de origem biótica na agricultura nas regiões tropicais e subtropicais do mundo.

Embora os primeiros relatos de doenças no tomateiro supostamente causadas por begomovírus datem de 1960 (Flores *et al.*, 1960; Costa, 1976), durante as duas últimas décadas, uma diversidade de begomovírus tem surgido como a maior ameaça para a produção de tomate no Brasil. O aparecimento coincidente de novas espécies de importância econômica infectando o tomateiro e a disseminação do biótipo B da mosca-branca (*Bemisia tabaci*) através da América do Sul no início dos anos de 1990 foi um fenômeno observado em várias outras regiões tropicais e subtropicais do mundo (Rojas *et al.*, 2005; Morales, 2006). Desde o primeiro relato de um begomovírus infectando tomateiro no Brasil, seis espécies foram descritas: *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), e *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) (Hamilton *et al.*, 1981; Fernandes *et al.*, 2006; Calegario *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007; Albuquerque *et al.*, 2010). Além dessas, nove parcialmente caracterizadas e potenciais novas espécies têm sido descritas (Ribeiro *et al.*, 2003; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2008). O estudo apresentado aqui descreve os begomovírus encontrados infectando tomateiros no Brasil em 2003 e 2004.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Seleção de amostras

O DNA total de amostras de tomateiro coletadas em várias regiões geográficas do Brasil e provavelmente infectadas por begomovírus foram mantidas no freezer a -20°C. Estas amostras foram analisadas por PCR usando os primers pALv1978 e pARc715 ou pARc496 (Rojas *et al.*, 1993). Baseado nos resultados de comparação de sequências dos fragmentos de DNA-A amplificado por PCR utilizando o programa Staden 4.0 (Staden, 1996), um grupo de amostras foi selecionado para caracterização viral. No total, foram determinadas as sequências completas do componente DNA-A de isolados de 18 amostras representando a diversidade genética indicada pela comparação das sequências dos fragmentos como mencionado anteriormente. As amostras coletadas exibiam sintomas de clorose internerval, mosaico, deformação foliar, rugosidade e nanismo. Essas 18 amostras foram coletadas em cinco estados brasileiros: Goiás - GO (n=13, incluindo amostras do Distrito Federal); Bahia - BA (n=1); Pernambuco - PE (n=3), e Minas Gerais - MG (n=1).

## **2.2. Clonagem**

Para o sequenciamento completo do genoma viral, a clonagem foi realizada como descrito por Inoue-Nagata *et al.* (2004). Resumidamente, o DNA total foi submetido a RCA (rolling circle amplification) usando  $\Phi$ -29 DNA polymerase (TempliPhi, GE Healthcare); o produto dessa amplificação foi digerido com várias enzimas de restrição (BamHI, ClaI, EcoRV, SacI ou XbaI) para identificar aquelas que geram os fragmentos esperados de ~2,6 kb correspondentes aos componentes genômicos DNA-A ou DNA-B; estes fragmentos foram ligados ao vetor pBluescript SK+ (Stratagene) digerido com a enzima correspondente; e os plasmídeos resultantes foram usados para transformar *Escherichia coli*. Um clone foi selecionado de cada transformação e os insertos contendo os componentes genômicos foram sequenciados por “primer walking” utilizando o serviço de sequenciamento da Macrogen Inc. (Seoul, Coréia do Sul).

## **2.3. Análises das sequências**

As identidades de nucleotídeos e aminoácidos das sequências foram calculadas usando Clustal V (Higgins *et al.*, 1992) (que interpreta os “gaps” no alinhamento como um quinto caracter e está incluído dentro do programa MegAlign; DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) e MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007) (que interpreta os “gaps” como falta de informação e não como um quinto nucleotídeo). As árvores filogenéticas baseadas no método maximum likelihood (ML), com 1000 repetições “bootstraps”, das sequências completas apresentadas neste estudo e 28 sequências de begomovírus representativas do Brasil obtidas no banco de dados foram construídas usando PHYML (GTR+G4) (Guindon & Gascuel, 2003) através do programa RDP3 (Martin *et al.*, 2010). O programa RDP3 também foi utilizado para identificar eventos de recombinação nestas sequências.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A análise da identidade nucleotídica das sequências do DNA-A dos 18 isolados revelou três novas ou parcialmente caracterizadas espécies [de acordo com os critérios estabelecidos para definir espécies de begomovírus (Fauquet *et al.*, 2008)] e uma espécie já caracterizada, ToSRV (Tabela 1, Figura 1 e Anexo 1).

As sequências dos componentes DNA-A de dois isolados (BR:Mdc2681:04 e BR:BSF2729:04) apresentam identidade máxima de nucleotídeos (84-85%) com o componente DNA-A de ToCMoV-Bahia[Brazil:Seabra1:1996] (ToCMoV-BA[BR:Sea1:96]; número de acesso AF490004). Estes resultados indicam que estas sequências representam o componente DNA-A de uma provável nova espécie de begomovírus, nomeada Tomato interveinal chlorosis virus (ToICV). Esse nome proposto baseia-se no sintoma comumente observado em tomateiro infectado com begomovírus.

Seis outras sequências (BR:PADFM:04, BR:PA2143:04, BR:Turv2911:04, BR:Turv2904:04, BR:Juaz2586:04 e BR:Bez2665:04) apresentam identidade nucleotídica

>89% entre elas, e identidade máxima de 75.4 a 77.6% com a sequência do componente DNA-A de ToCMoV-BA[BR:Sea1:96]. Além disso, compartilham entre 85.5 e 97.8% de identidade nucleotídica com a sequência parcial de Tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV; acesso DQ346651) e, portanto, propõe-se que essas seis novas sequências completas do DNA-A sejam consideradas representantes do vírus parcialmente caracterizado TMoLCV. Análises indicam que TMoLCV é mais próximo filogeneticamente do begomovírus Passionfruit severe leaf distortion virus (PSLDV)-[BR:LNS2:Pas:01] (FJ972767), uma nova espécie descrita recentemente infectando plantas de maracujá no Brasil (Ferreira *et al.*, 2010). Entre esses isolados de TMoLCV, quatro isolados de Goiás (BR:PADFM:04, BR:PA2143:04, BR:Turv2911:04 e BR:Turv2904:04) são mais próximos entre si e coletivamente pertencentes a uma nova estirpe, nomeada TMoLCV-DF (Distrito Federal). As sequências BR:Juaz2586:04 e BR:Bez2665:04 dos isolados da Bahia e Pernambuco, respectivamente, foram mais próximos (94.3% de identidade) dos isolados de TMoLCV e receberam a designação de estirpe TMoLCV-PE (Figura 1, Anexo 1). A análise de recombinação mostrou evidências de que os isolados de TMoLCV-DF são recombinantes entre TMoLCV-PE[BR:Bez2665:04] (maior parental) e ToCMoV-[Brazil:Betim1:1996] (ToCMoV-[BR:Bet1:96], AY090557, menor parental). Os pontos de recombinação foram detectados nas posições 2257 e 16 no componente DNA-A (“P-value” =  $7,1 \times 10^{-24}$ ). Os pontos de recombinação contendo a sequência de ToCMoV foram localizados dentro da Rep (“replication initiator protein”) e RI (região intergênica). Essa região recombinante está presente na sequência parcial de TMoLCV e explica o porquê das sequências completas de TMoLCV apresentarem identidades nucleotídicas variando entre 85.5 e 97.8% quando comparadas com a sequência parcial. As identidades mais altas foram observadas entre os isolados de TMoLCV-DF e mais baixas entre isolados de TMoLCV-PE.



Seis outras sequências do DNA-A (BR:Ita1220:03, BR:Taq1613:03, BR:Pip1670:03, BR:Pip1719:03, BR:Pip1799:03 e BR:Arag3043:04) tiveram >97% de identidade entre elas, e entre 87.5 e 88.1% de identidade com a sequência do componente DNA-A de ToYVSV-[Ba3] (EF417915). No entanto, essas sequências apresentam entre 95.3 e 97.1% de identidade com a sequência parcial do DNA-A de um begomovírus nomeado Tomato golden vein virus (TGVV, acesso AY751742). Portanto, sugerimos que estas sequências representem as sequências completas do componente DNA-A de Tomato golden vein virus (TGVV).

Finalmente, quatro sequências do DNA-A (BR:Ind2857:04, BR:Pip1696:03, BR:Pip1792:03 e BR:AlG3032:04) apresentaram identidade nucleotídica maior que 95% com ToSRV-Minas Gerais[Brazil:Uberlandia1:2000] (acesso AY029750) e são claramente isolados de ToSRV.

Todas as 18 sequências pertencem filogeneticamente aos dois grupos de begomovírus que infectam tomateiro no Brasil (Figura 1). TGVV e ToSRV aparentemente ocupam a mesma região geográfica com TMoLCV, enquanto que os isolados de ToICV foram encontrados apenas no estado de Pernambuco.

A natureza bipartida de todos estes begomovírus (ToICV, TGVV, TMoLCV e ToSRV) foi confirmada por PCR usando os primers pBL1v2040 e CRC2 (Rojas *et al.*, 1993). Como os isolados de ToSRV, TMoLCV e TGVV são provavelmente mais encontrados do que outros begomovírus [neste estudo; (Fernandes *et al.*, 2008)], e porque o componente DNA-B já foi relatado para ToSRV, os isolados TMoLCV-DF[BR:PADFM:04] e TGVV-DF[BR:Pip1799:03] foram escolhidos para o sequenciamento completo do DNA-B. A clonagem foi realizada usando a enzima de restrição *ClaI* (para TMoLCV-DF[BR:PADFM:04]) e *BamHI* (para TGVV-DF [BR:Pip1799:03]) como descrito previamente (Inoue-Nagata *et al.*, 2004). A sequência do DNA-B (2599 nucleotídeos) de TMoLCV-DF[BR:PADFM:04] tem 82,5% de identidade nucleotídica com a correspondente

de ToCMoV-Minas Gerais[Brazil:Igarape1:1996] (-MG[BR:Iga1:96; DQ336353]), enquanto o DNA-B (2531 nucleotídeos) de TGVV-DF[BR:Pip1799:03] apresenta uma identidade nucleotídica de 74,3% com o ToYVSV-[Ba3] (EF417916) (Figura 2 e Anexos 2 e 3). Análises das ORFs dos componentes DNA-B revelaram que a MP (proteína de movimento) foi altamente conservada entre os isolados mais próximos usados na análise filogenética (Anexos 2 e 3). A MP do isolado BR:PADFM:04 tem 93,5% de identidade de aminoácido com a de ToCMoV-BA[BR:Sea1:96], enquanto a MP do isolado BR:Pip1799:03 apresenta 94,9% com a de ToYVSV-[Ba3].

Todos os genomas apresentaram uma organização genômica típica dos begomovírus do Novo Mundo, com cinco ORFs no componente DNA-A e duas ORFs no DNA-B. As sequências de nucleotídeos e aminoácidos de todas as ORFs de cada novo vírus (representados por TMLCV-DF[BR:PADFM:04], TGVV-DF[BR:Pip1799:03], e ToICV-PE[BR:BSF2729:04]) foram comparadas com os begomovírus mais representativos do Brasil (Anexos 2 a 4). A Rep (AC1) de BR:PADFM:04 e a CP (capa proteica) de BR:Pip1799:03 e BR:BSF2729:04 tiveram a maior identidade com PSLDV-[BR:LNS2:Pas:01] (86,6% de identidade de aminoácido; FJ972767), ToYVSV-[Ba3] (96,8%) e ToRMV (94,4%), respectivamente.

Todos os componentes (DNA-A e DNA-B) têm uma RI contendo o nonanucleotídeo conservado TAATATT↓AC encontrado na origem de replicação dos geminivírus. Os componentes DNA-A e DNA-B do isolado TMLCV-DF[BR:PADFM:04] apresentam uma região comum (RC, um fragmento de ~200 nucleotídeos compartilhado com alta identidade entre ambos os componentes DNA-A e DNA-B de uma mesma espécie) de 165 nucleotídeos com 95,7% identidade. A RC dos componentes genômicos do isolado TGVV-DF[BR:Pip1799:03] tem 173 nucleotídeos e 94,2% de identidade. Apresentam os iterons: GGGGA e GGGGT para BR:PADFM:04 e GGGGT para BR:Pip1799:03 (Argüello-Astorga

& Ruiz-Medrano, 2001), indicando que os componentes DNA-A e DNA-B são provavelmente cognatos (dados não mostrados).

Aqui, amostras foliares de tomateiro infectadas por begomovírus, coletadas nos anos de 2003 e 2004 nas Regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil, foram estudadas. Os componentes DNA-A foram completamente sequenciados e confirmada a presença das espécies previamente relatadas, mas somente parcialmente caracterizadas (Ribeiro *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2008). Em estudo anterior (Fernandes *et al.*, 2008), TGVV e ToSRV foram predominantes na Região Centro-Oeste do Brasil, enquanto que TMoLCV foi predominante na Região Nordeste. Neste trabalho, verificou-se que TMoLCV também é comum na Região Centro-Oeste. As sequências do DNA-A e DNA-B de TMoLCV são mais relacionadas aos componentes correspondentes de ToCMoV (Figura 1 e 2).

Neste trabalho, foram sequenciados os genomas completos de dois dos begomovirus economicamente mais importantes infectando tomateiro, presentes em várias regiões do Brasil entre 2003 e 2004. Embora a frequência de novos begomovírus descobertos esteja diminuindo, o fato de novas espécies serem encontradas indica claramente que ainda existem begomovírus não identificados. Está claro que TMoLCV, ToICV e ToCMoV têm uma relação próxima. Esses vírus podem ter evoluído de um ancestral comum, o qual possivelmente estava na Região Nordeste do Brasil. Os isolados de ToSRV e TGVV foram previamente relatados como os mais importantes para a cultura de tomate no Brasil (Fernandes *et al.*, 2008). Atualmente, cultivares de tomateiro tolerantes a begomovírus são amplamente utilizadas no Brasil e avaliações contínuas serão realizadas para determinar se o cultivo desses genótipos causará o surgimento de linhagens virais capazes de quebrar essa resistência.

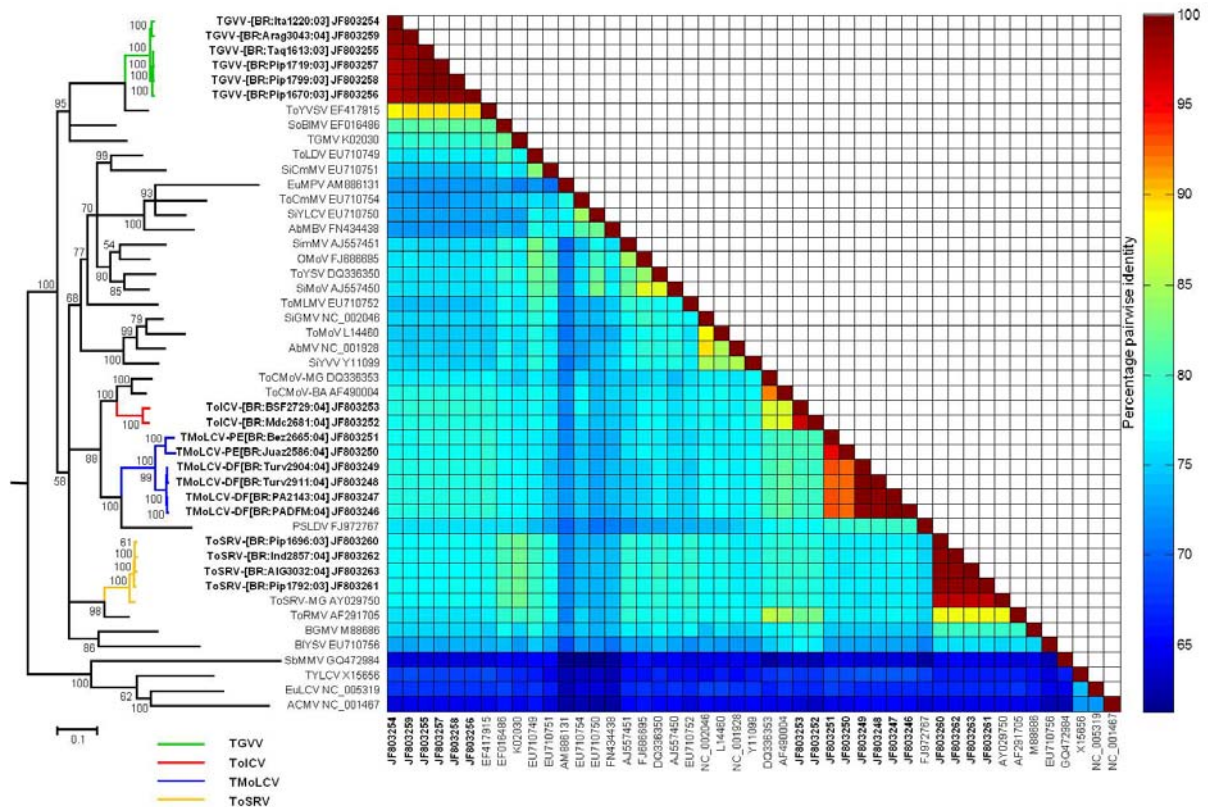
**Tabela 1** Lista dos isolados e clones dos vírus analisados

Isolado	Região	Enzima para clonagem DNA-A/DNA-B <sup>a</sup>	Nome proposto <sup>c</sup>	Acrônimo	Número de acesso DNA-A/DNA-B
BR:PADFM:04 <sup>b</sup>	DF	ClaI/ClaI	TMoLCV-DF[Brazil:Ponte Alta DFM:2004]	TMoLCV-DF[BR:PADFM:04]	JF803246/JF803264
BR:PA2143:04	DF	ClaI	TMoLCV-DF[Brazil:Ponte Alta2143:2004]	TMoLCV-DF[BR:PA2143:04]	JF803247
BR:Turv2911:04	GO	ClaI	TMoLCV-DF[Brazil:Turvânia2911:2004]	TMoLCV- DF[BR:Turv2911:04]	JF803248
BR:Turv2904:04	GO	ClaI	TMoLCV-DF[Brazil:Turvânia2904:2004]	TMoLCV- DF[BR:Turv2904:04]	JF803249
BR:Juaz2586:04	BA	SacI	TMoLCV-PE[Brazil:Juazeiro2586:2004]	TMoLCV- PE[BR:Juaz2586:04]	JF803250
BR:Bez2665:04	PE	ClaI	TMoLCV-PE[Brazil:Bezerras2665:2004]	TMoLCV- PE[BR:Bez2665:04]	JF803251
BR:Mdc2681:04	PE	XbaI	ToICV-PE[Brazil:Mandacaru2681:2004]	ToICV-PE[BR:Mdc2681:04]	JF803252
BR:BSF2729:04	PE	EcoRV	ToICV-PE[Brazil:Belém do São Francisco2729:2004]	ToICV-PE[BR:BSF2729:04]	JF803253
BR:Ita1220:03	GO	BamHI	TGVV-DF[Brazil:Itaberaí1220:2003]	TGVV-DF[BR:Ita1220:03]	JF803254
BR:Taq1613:03	DF	BamHI	TGVV-DF[Brazil:Taquara1613:2003]	TGVV-DF[BR:Taq1613:03]	JF803255
BR:Pip1670:03	DF	BamHI	TGVV-DF[Brazil:Pipiripau1670:2003]	TGVV-DF[BR:Pip1670:03]	JF803256
BR:Pip1719:03	DF	BamHI	TGVV-DF[Brazil:Pipiripau1719:2003]	TGVV-DF[BR:Pip1719:03]	JF803257
BR:Pip1799:03 <sup>b</sup>	DF	BamHI/BamHI	TGVV-DF[Brazil:Pipiripau1799:2003]	TGVV-DF[BR:Pip1799:03]	JF803258/JF803265
BR:Arag3043:04	MG	BamHI	TGVV-DF[Brazil:Araguari3043:2004]	TGVV-DF[BR:Arag3043:04]	JF803259
BR:Pip1696:03	DF	XbaI	ToSRV-MG[Brazil:Pipiripau1696:2003]	ToSRV-MG[BR:Pip1696:03]	JF803260
BR:Pip1792:03	DF	XbaI	ToSRV-MG[Brazil:Pipiripau1792:2003]	ToSRV-MG[BR:Pip1792:03]	JF803261
BR:Ind2857:04	GO	XbaI	ToSRV-MG[Brazil:Indiana2857:2004]	ToSRV-MG[BR:Ind2857:04]	JF803262
BR:AIG3032:04	DF	XbaI	ToSRV-MG[Brazil:Alexandre Gusmão3032:2004]	ToSRV-MG[ BR:AIG3032:04]	JF803263

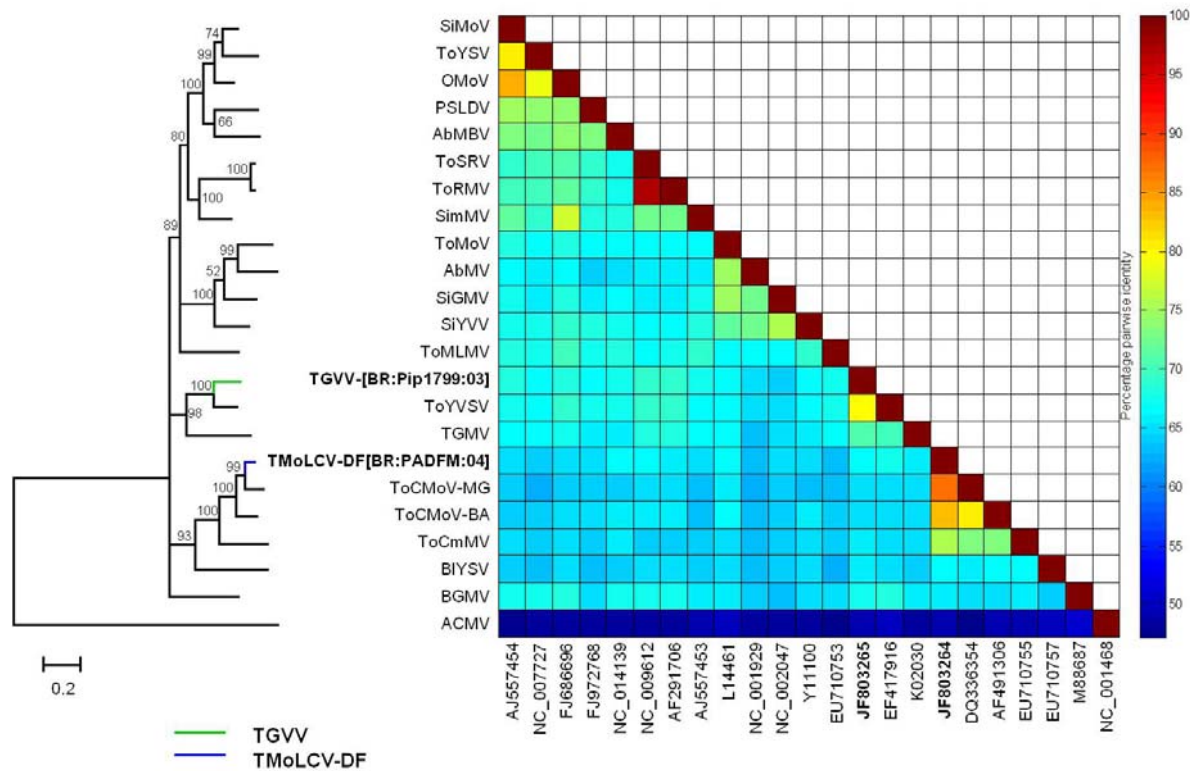
<sup>a</sup> Enzima de restrição usada para a clonagem dos componentes DNA-A/DNA-B

<sup>b</sup> Isolados com clones para os componentes DNA-A e DNA-B

<sup>c</sup> Novas espécies e estirpes propostas: Tomato mottle leaf curl virus-Distrito Federal (TMoLCV-DF), Tomato mottle leaf curl virus-Pernambuco (TMoLCV-PE), Tomato interveinal chlorosis virus-Pernambuco (ToICV-PE), Tomato golden vein virus-Distrito Federal (TGVV-DF) e Tomato severe rugose virus-Minas Gerais (ToSRV-MG)



**Figura 1** Árvore filogenética ML (1000 repetições “bootstrap”) e matriz colorida representando a identidade nucleotídica (determinada com a exclusão dos “gaps” – MEGA4) das sequências selecionadas do DNA-A. Acrônimos e sequências dos vírus usados na análise são: AbMBV, Abutilon mosaic Brazil virus; AbMV, Abutilon mosaic virus; ACMV, African cassava mosaic virus; BCTV, Beet curly top virus; BGMV, Bean golden mosaic virus; BIYSV, Blainvillea yellow spot virus; EuLCV, Euphorbia leaf curl virus; EuMPV, Euphorbia mosaic Peru virus; OMoV, Okra mottle virus; PSLDV, Passionfruit severe leaf distortion virus; SbMMV, Soybean mild mottle virus; SiCmMV, Sida common mosaic virus; SiGMV, Sida golden mosaic virus; SimMV, Sida micrantha mosaic virus; SiMoV, Sida mottle virus; SiYLCV, Sida yellow leaf curl virus; SiYVV, Sida yellow vein virus; SoBIMV, Soybean blistering mosaic virus; TGMV, Tomato golden mosaic virus; ToCmMV, Tomato common mosaic virus; ToCMoV-BA, Tomato chlorotic mottle virus-Bahia; ToCMoV-MG, Tomato chlorotic mottle virus-Minas Gerais; ToLDV, Tomato leaf distortion virus; ToMIMV, Tomato mild mosaic virus; ToMoV, Tomato mottle virus; ToRMV, Tomato rugose mosaic virus; ToSRV, Tomato severe rugose virus; ToYSV, Tomato yellow spot virus; ToYYSV, Tomato yellow vein streak virus; TYLCV, Tomato yellow leaf curl virus. Os números de acesso são mostrados na árvore. A barra indica o número de substituições por sítio.



**Figura 2** Árvore filogenética ML (1000 repetições “bootstrap”) e matriz colorida representando a identidade nucleotídica (determinada com a exclusão dos gaps – MEGA4) das sequências selecionadas do DNA-B. Os mesmos vírus usados na árvore do DNA-A foram usados para o DNA-B, quando disponível. Os números de acesso são mostrados na figura. A barra indica o número de substituições por sítio.

#### 4. LITERATURA CITADA

- ALBUQUERQUE, L.C.; MARTIN, D.P.; AVILA, A.C. & INOUE-NAGATA, A.K. 2010. Characterization of tomato yellow vein streak virus, a begomovirus from Brazil. *Virus Genes* 40:140-147
- ARGÜELLO-ASTORGA, G.R. & RUIZ-MEDRANO, R. 2001. An iteron-related domain is associated to Motif 1 in the replication proteins of geminiviruses: identification of potential interacting amino acid-base pairs by a comparative approach. *Archives of Virology* 146:1465-1485
- CALEGARIO, R.F.; FERREIRA, S.D.S.; DE ANDRADE, E.C. & ZERBINI, F.M. 2007. Characterization of tomato yellow spot virus, a novel tomato-infecting begomovirus in Brazil. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 42:1335-1343
- CASTILLO-URQUIZA, G.P.; BESERRA, J.E.J.; BRUCKNER, F.P.; LIMA, A.T.; VARSANI, A.; ALFENAS-ZERBINI, P. & MURILO ZERBINI, F. 2008. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Archives of Virology* 153:1985-1989
- COSTA, A.S. 1976. Whitefly-Transmitted Plant Diseases. *Annual Review of Phytopathology* 14:429-449
- FAUQUET, C.M.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; MORIONES, E.; STANLEY, J.; ZERBINI, M. & ZHOU, X. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology* 153:783-821
- FERNANDES, F.R.; ALBUQUERQUE, L.C.; GIORDANO, L.B.; BOITEUX, L.S.; AVILA, A.C. & INOUE-NAGATA, A.K. 2008. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes* 36:251-258

- FERNANDES, J.J.; CARVALHO, M.G.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; FONTES, E.P.B. & ZERBINI, F.M. 2006. Biological and molecular properties of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Plant Pathology* 55:513-522
- FERREIRA, S.S.; BARROS, D.R.; DE ALMEIDA, M.R. & ZERBINI, F.M. 2010. Characterization of Passionfruit severe leaf distortion virus, a novel begomovirus infecting passionfruit in Brazil, reveals a close relationship with tomato-infecting begomoviruses. *Plant Pathology* 59:221-230
- FLORES, E.; SILBERSCHMIDT, K. & KRAMER, M. 1960. Observações de "clorose infecciosa" das malváceas em tomateiros do campo. *O Biológico* 26:65-69
- GUINDON, S. & GASCUEL, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52:696-704
- HAMILTON, W.D.O.; SANDERS, R.C.; COUTTS, R.H.A. & BUCK, K.W. 1981. Characterisation of tomato golden mosaic virus as a geminivirus. *FEMS Microbiology Letters* 11:263-267
- HIGGINS, D.G.; BLEASBY, A.J. & FUCHS, R. 1992. Clustal V - improved software for multiple sequence alignment. *Computer Applications in the Biosciences* 8:189-191
- INOUE-NAGATA, A.K.; ALBUQUERQUE, L.C.; ROCHA, W.B. & NAGATA, T. 2004. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi29 DNA polymerase. *Journal of Virological Methods* 116:209-211
- MARTIN, D.P.; LEMEY, P.; LOTT, M.; MOULTON, V.; POSADA, D. & LEFEUVRE, P. 2010. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* 26 2462-2463
- MORALES, F.J. 2006. History and Current Distribution of Begomoviruses in Latin America. *Advances in Virus Research*. Academic Press, pp 127-162



- RIBEIRO, S.G.; AMBROZEVIĆIUS, L.P.; DE AVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; CALEGARIO, R.F.; FERNANDES, J.J.; LIMA, M.F.; MELLO, R.N.; ROCHA, H. & ZERBINI, F.M. 2003. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting geminiviruses in Brazil. *Archives of Virology* 148:281-295
- RIBEIRO, S.G.; MARTIN, D.P.; LACORTE, C.; SIMÕES, I.C.; ORLANDINI, D.R.S. & INOUE-NAGATA, A.K. 2007. Molecular and biological characterization of *Tomato chlorotic mottle virus* suggests that recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses. *Phytopathology* 97:702-711
- ROJAS, A.; KVARNHEDEN, A.; MARCENARO, D. & VALKONEN, J.P.T. 2005. Sequence characterization of Tomato leaf curl Sinaloa virus and *Tomato severe leaf curl virus*: Phylogeny of New World begomovirus and detection of recombination *Archives of Virology*:1281-1299
- ROJAS, M.R.; GILBERTSON, R.L.; RUSSELL, D.R. & MAXWELL, D.P. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77:340-347
- STADEN, R. 1996. The staden sequence analysis package. *Molecular Biotechnology* 5:233-241
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M. & KUMAR, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599

# CAPÍTULO 3

---

---

**NOVA ESPÉCIE DE BEGOMOVÍRUS MONOPARTIDO INFECTANDO  
BATATEIRA-DOCE NO BRASIL**

# NOVA ESPÉCIE DE BEGOMOVÍRUS MONOPARTIDO INFECTANDO BATATEIRA-DOCE NO BRASIL\*

## RESUMO

As sequências completas do genoma de dois isolados de begomovírus monopartidos (gênero *Begomovirus*, família *Geminiviridae*) presentes em uma mesma planta de batata-doce (*Ipomoea batatas*) coletados em São Paulo, Brasil, são apresentadas. Baseado nos critérios taxonômicos atuais para o gênero *Begomovirus*, um dos isolados representa uma nova espécie, para o qual o nome Sweet potato leaf curl Sao Paulo virus (SPLCSPV) é proposto. O outro isolado representa uma nova estirpe de *Sweet potato leaf curl virus*, nomeado de Sweet potato leaf curl virus-Sao Paulo (SPLCV-SP). A sequência completa do isolado de SPLCSPV apresenta máxima identidade nucleotídica (87.6%) com os isolados de *Sweet potato leaf curl Spain virus* (SPLCESV). Análise filogenética e de recombinação foram feitas para estudar a relação desses isolados com outros begomovírus monopartidos que infectam o gênero *Ipomoea*.

**Palavra-chave:** geminivírus, *Ipomoea batatas*, recombinação, sweepovírus.

\* Capítulo publicado na revista Archives of Virology (Anexo 8) com modificações:

ALBUQUERQUE, L.C.; INOUE-NAGATA, A.K.; PINHEIRO, B.; RIBEIRO SDA, G.; RESENDE, R.O.; MORIONES, E. & NAVAS-CASTILLO, J. 2011. A novel monopartite begomovirus infecting sweet potato in Brazil. Archives of Virology 156:1291-1294

# A NOVEL MONOPARTITE BEGOMOVIRUS INFECTING SWEET POTATO IN BRAZIL

## ABSTRACT

The complete genome sequences of two monopartite begomovirus isolates (genus *Begomovirus*, family *Geminiviridae*) present in a single sweet potato (*Ipomoea batatas*) plant collected in São Paulo, Brazil, are presented. Based on the current taxonomic criteria for the genus *Begomovirus*, one of the isolates was shown to represent a novel species, tentatively named Sweet potato leaf curl Sao Paulo virus (SPLCSPV). The other isolate represented a new strain of *Sweet potato leaf curl virus*, named sweet potato leaf curl virus-Sao Paulo (SPLCV-SP). The full genome sequence of the SPLCSPV isolate shared the highest nucleotide identity (87.6%) with isolates of *Sweet potato leaf curl Spain virus* (SPLCESV). Phylogenetic and recombination analyses were used to investigate the relationships of these isolates to other monopartite *Ipomoea*-infecting begomoviruses.

**Keywords:** geminiviruses, *Ipomoea batatas*, recombination, sweepoviruses.

## **1. INTRODUÇÃO**

Os geminivírus (família *Geminiviridae*) são um importante grupo de vírus de plantas com o genoma consistindo de uma ou duas moléculas de ssDNA circular de 2,6-3,0 kb encapsidado em uma partícula geminada formada por dois icosaedros incompletos. Baseado no círculo de hospedeiros, organização genômica e inseto vetor, os geminivírus são atualmente classificados dentro de quatro gêneros: *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Mastrevirus* e *Topocuvirus* (Stanley *et al.*, 2005). Alguns begomovírus monopartidos infectam espécies do gênero *Ipomoea* dentro da família *Convolvulaceae* (Lozano *et al.*, 2009; Paprotka *et al.*, 2010). Análise filogenética mostra que esses vírus, para os quais o nome sweepovírus tem sido proposto (Fauquet & Stanley, 2003), são agrupados monofileticamente, separados dos dois principais grupos de begomovírus, Velho Mundo e Novo Mundo (Lozano *et al.*, 2009). As plantas de batata-doce (*I. batatas*) infectadas por sweepovírus são frequentemente assintomáticas, embora perdas tenham sido relatadas para algumas variedades (Lotrakul *et al.*, 2003). A batata-doce é propagada vegetativamente e, por isso, a acumulação viral tem se tornado o fator mais limitante para sua produção. Os sweepovírus têm sido descritos infectando batateira-doce em vários países, incluindo Peru (Fuentes & Salazar, 2003), Espanha (Lozano *et al.*, 2009), China (Luan *et al.*, 2007), Estados Unidos (Lotrakul *et al.*, 1998; Lotrakul & Valverde, 1999; Lotrakul *et al.*, 2003) e, recentemente, em um banco de germoplasma do Brasil (Paprotka *et al.*, 2010). No Brasil, durante os últimos anos, foram realizados estudos para identificar os sweepovírus infectando batateira-doce tanto em cultivo comercial como familiar. Como resultado, neste estudo relatamos a sequência completa de um novo begomovírus monopartido infectando batateira-doce no estado de São Paulo, Brasil.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Origem da amostra**

Uma amostra foliar #SP71 de batateira-doce (variedade Londrina) exibindo sintomas de clorose e necrose foi coletada em um campo comercial em Álvares Machado, estado de São Paulo (coordenadas 22°00'S, 51°27'W) em abril de 2009.

## **2.2. Clonagem**

O DNA total foi extraído dessa amostra usando o método CTAB (Doyle & Doyle, 1987) e os prováveis componentes genômicos foram amplificados pelo método RCA (rolling-circle amplication) utilizando a  $\Phi$ -29 DNA polimerase (TempliPhi, GE Healthcare) como descrito por Inoue-Nagata *et al.* (2004). O produto dessa amplificação foi digerido com dez enzimas de restrição (BamHI, ClaI, EcoRI, EcoRV, HindIII, KpnI, PstI, SacI, SpeI, e XbaI). As enzimas BamHI e SacI geraram fragmentos de aproximadamente 2,8 kb correspondentes ao tamanho do genoma completo de um sweepovírus. Estes fragmentos foram clonados no vetor pBluescript SK<sup>+</sup> (Stratagene) digerido com BamHI e SacI, respectivamente, introduzidos em células de *E. coli* DH5 $\alpha$  por transformação e sequenciados pela Macrogen Inc. (Seoul, Coréia do Sul).

## **2.3. Análise das sequências**

As identidades nucleotídicas das sequências obtidas nesse trabalho e outras representativas de sweepovírus foram calculadas após o alinhamento das sequências usando o programa Clustal V (Higgins *et al.*, 1992) - incluído dentro do programa MegAlign; DNASTAR Inc., Madison, WI, USA. A árvore filogenética foi construída usando o programa MEGA4 pelo método neighbour-joining (Tamura *et al.*, 2007). A análise de recombinação foi feita utilizando o programa RDP3 (Martin *et al.*, 2010) a partir de um alinhamento de sequências de sweepovírus utilizando o programa Muscle (Edgar, 2004). Posteriormente, o evento de recombinação detectado foi confirmado pelo programa SimPlot (Lole *et al.*, 1999).

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As moléculas de DNA obtidas dos isolados da amostra #SP71 e clonadas após a digestão com BamHI (número de acesso no GenBank HQ393477) e SacI (HQ393473) têm 2782 e 2837 nucleotídeos, respectivamente. As sequências apresentam características típicas dos begomovírus monopartidos, com duas ORFs (“open reading frames”) no sentido viral e quatro ORFs no sentido complementar, separadas por uma região intergênica contendo o nonanucleotídeo (TAATATT↓AC) conservado dentro da família *Geminiviridae* com poucas exceções, como o *Beet curly top Iran virus* e *Eragrosti curvula streak virus* (Yazdi *et al.*, 2008; Varsani *et al.*, 2009). Dentro da região intergênica, os elementos repetidos (iterons) localizados próximos ao TATA box da ORF da proteína Rep apresenta a sequência consenso GGWGD e quatro iterons, três diretos (AAATGGTGGA, AATTGGTGGA e GGTGGA) e um invertido (TCCACCAAAT), idênticos aos descritos para *Sweet potato leaf curl Lanzarote virus* (Lozano *et al.*, 2009).

As identidades nucleotídicas foram calculadas usando o ClustalV (Tabela 1). A sequência do clone SP71-BamHI (GenBank HQ393477) mostrou máxima identidade (87,6%) com *Sweet potato leaf curl Spain virus*-[ES:CI:BG5:02] (GenBank EF456743), seguido (86,5%) por *Sweet potato mosaic-associated virus*-[BR:BSB1] (FJ969831), ambas recentemente descritas na Espanha e Brasil, respectivamente (Lozano *et al.*, 2009; Paprotka *et al.*, 2010). A sequência do clone SP71-SacI (GenBank HQ393473) apresentou máxima identidade nucleotídica (92,2%) com *Sweet potato leaf curl virus*-RS2[BR:Ros1] (FJ969837) (Paprotka *et al.*, 2010). Portanto, de acordo com os atuais critérios para classificação dos begomovírus (Fauquet *et al.*, 2008), a sequência do clone SP71-BamHI representa um isolado de uma nova espécie de begomovírus, nomeada *Sweet potato leaf curl Sao Paulo virus* (SPLCSPV). A sequência do clone SP71-SacI corresponde a um isolado de uma nova estirpe de *Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV). Esses isolados foram designados *Sweet potato leaf curl Sao Paulo virus*-[Brazil:Alvares Machado:2009] (SPLCSPV-[BR:AlvM:09] e *Sweet*

potato leaf curl virus-Sao Paulo[Brazil:Alvares Machado:2009] (SPLCV-SP[BR:AlvM:09]), respectivamente.

A árvore filogenética construída usando MEGA4 é mostrada na Figura 1. A sequência de SPLCSPV-[BR:AlvM:09] agrupou com Sweet potato mosaic-associated virus-[Brazil: Brasilia1], enquanto que SPLCV-SP[BR:AlvM:09] ficou próximo ao Sweet potato leaf curl virus-Rio Grande do Sul 2[Brazil: Rosario1], ambos obtidos de um banco de germoplasma no Brasil (Paprotka *et al.*, 2010).

A presença de isolados pertencentes a duas espécies de begomovírus em uma mesma planta de batata-doce no campo, como mostrado aqui, é mais um exemplo de infecção mista, que foi descrita como sendo frequente nessa planta hospedeira (Lozano *et al.*, 2009). Esse fenômeno é extremamente importante para a evolução viral porque infecções mistas são um pré-requisito para a ocorrência natural de eventos de recombinação, os quais podem contribuir para o surgimento de novos begomovírus (Padidam *et al.*, 1999; Sanz *et al.*, 2000). Assim, evidências de recombinação foram analisadas usando o RDP3 e SimPlot entre os isolados descritos aqui e outros sweepovírus. As análises demonstraram que SPLCSPV provavelmente contribuiu com material genético [fragmento de DNA de ~727 nt (“*P*-value” =  $3,0 \times 10^{-40}$ ) e ~897 nt (“*P*-value” =  $3,0 \times 10^{-40}$ ), respectivamente] para o surgimento de dois vírus, SPLCV-SP (descrito aqui, Figura 2) e Sweet potato golden vein-associated virus-PB1 (Paprotka *et al.*, 2010).

Apenas um estudo envolvendo isolados de sweepovírus do banco de germoplasma de batata-doce mantido *ex vitro* da Embrapa Hortaliças foi realizado no Brasil (Paprotka *et al.*, 2010). Os resultados apresentados aqui como parte de um levantamento em lavouras comerciais no Brasil indicam a presença de begomovírus em cultivos comerciais de batata-doce e apontam para uma complexa situação ecológica com uma grande diversidade de

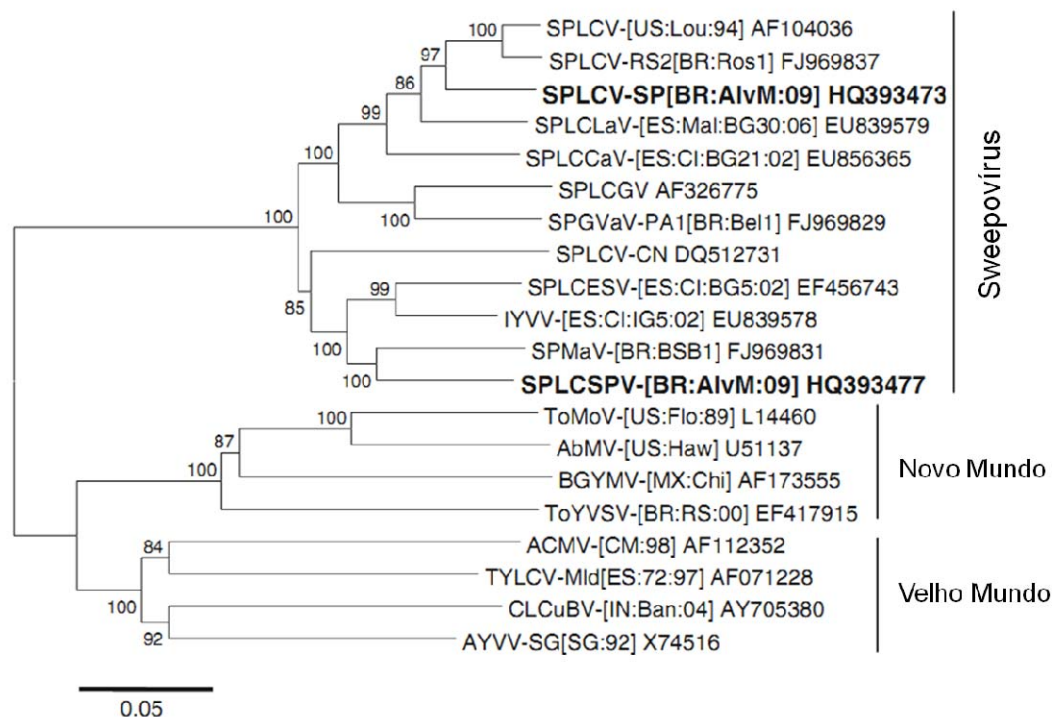


sweepovírus presentes, e essa diversidade deve aumentar à medida que novos estudos são realizados.

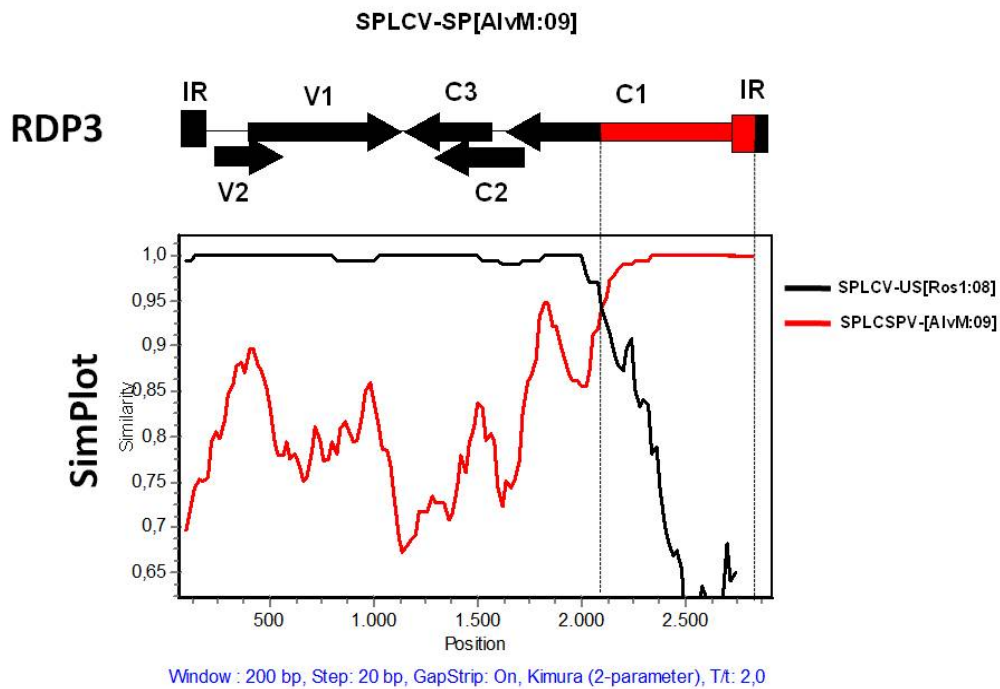
**Tabela 1** Porcentagens de identidade nucleotídica da sequência completa do genoma dos isolados SP71-BamHI e SP71-SacI descritos aqui e outros sweepovírus representativos.

<b>Vírus</b>	<b>SP71BamHI</b>	<b>SP71SacI</b>
Sweet potato leaf curl Sao Paulo virus-[Brazil:Alvares Machado:2009] (SP71-BamHI)	100	84,2
Sweet potato leaf curl virus-Sao Paulo-[Brazil:Alvares Machado:2009] (SP71-SacI)	84,2	100,0
Ipomoea yellow vein virus-[Spain:Málaga:IG5:2006]	80,8	77,5
Sweet potato golden vein-associated virus-Pará[Brazil:Belém1]	74,1	81,2
Sweet potato golden vein-associated virus-Paraíba1[BR:Sou1]	80,6	88,1
Sweet potato leaf curl Canary virus-[Spain:Canary Islands:BG21:2002]	75,4	85,2
Sweet potato leaf curl Georgia virus-[United States:Georgia16]	77,6	77,1
Sweet potato leaf curl Lanzarote virus-[Spain:Málaga:BG30:2006]	79,2	89,6
Sweet potato leaf curl Spain virus-[Spain:Canary Islands:BG5:2002]	<b><u>87,6</u></b>	79,2
Sweet potato leaf curl virus-[United States:Louisiana:1994]	75,3	89,6
Sweet potato leaf curl China virus-[China:2005]	75,2	74,5
Sweet potato leaf curl virus-Rio Grande do Sul 2[Brazil:Rosario1]	75,2	<b><u>92,2</u></b>
Sweet potato mosaic-associated virus-[Brazil:Brasília1]	86,5	77,5

Acrônimos e números de acesso no GenBank são mostrados na Figura 1. As maiores porcentagens de identidade nucleotídica para os isolados SP71-BamHI e SP71-SacI estão sublinhadas.



**Figura 1** Árvore filogenética indicando a relação entre o genoma completo de SPLICSPV-[BR:AlvM:09] e SPLICV-SP[BR:AlvM:09] apresentados aqui (em negrito) e outros sweepovírus respresentativos. A árvore foi construída pelo método neighbour-joining com 1000 repetições usando MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007). Os vírus usados no alinhamento foram os seguintes: Sweet potato leaf curl virus-[United States of America:Louisiana:1994] (SPLCV-[US:Lou:94]), Sweet potato leaf curl virus-Rio Grande do Sul 2 [Brazil:Rosario1] (SPLCV-RS2[BR:Ros1]), Sweet potato leaf curl Lanzarote virus-[Spain:Málaga:BG30:2006] (SPLCLaV-[ES:Mal:BG30:06]), Sweet potato leaf curl Canary virus-[Spain:Canary Islands:BG21:2002] (SPLCCaV-[ES:CI:BG21:02]), Sweet potato leaf curl Georgia virus-[United States:Georgia 16] (SPLCGV-[US:Geo16]), Sweet potato golden vein-associated virus-Pará [Brazil:Belém 1] (SPGVaV-PA[BR:Bel1]), Sweet potato leaf curl China virus-[China:2005] (SPLCCNV-CN:05), Sweet potato leaf curl Spain virus-[Spain:Canary Islands:BG5:2002] (SPLCESV-[ES:CI:BG5:02]), Ipomoea yellow vein virus-[Spain:Málaga:IG5:2006] (IYVV-[ES:Mal:IG5:06]), Sweet potato mosaic-associated virus-[Brazil:Brasília1] (SPMaV-[BR:BSB1]). DNA-A dos begomovírus do Novo Mundo (Tomato mottle virus-[United States:Florida:1989] (ToMoV-[US:Flo:89]), Abutilon mosaic virus-[United States:Hawaii] (AbMV-[US:Hav]), Bean golden yellow mosaic virus-[Mexico:Chiapas] (BGYMV-[MX:Chi]) e Velho Mundo (African cassava mosaic virus-[Cameroon:1998] (ACMV-[CM:98]), Tomato yellow leaf curl virus-Mild[Spain:72:1997] ([TYLCV-Mld[ES:72:97]), Cotton leaf curl Bangalore virus-[India:Bangalore:2004] (CLCuBV-[IN:Ban:04]), Ageratum yellow vein virus-Singapore[Singapore:1992] (AYVV-SG[SG:92]) estão incluídos. Números de acesso no GenBank são mostrados na árvore. A barra indica o numero de substituições por sítio.



**Figura 2** Análise de recombinação ilustrando as posições dos pontos de recombinação. A representação esquemática do evento de recombinação detectado pelos programas RDP3 e SimPlot indica dois pontos de recombinação no genoma de SPLCV-SP[BR:AlvM:09], nucleotídeo 2059 e 2786 (“*P*-value” =  $3,0 \times 10^{-40}$ ) gerando um fragmento de DNA de ~727 nucleotídeos. SPLCV-US[BR:Ros1] é o maior parental e SPLCSPV[BR:AlvM:09] o menor parental.

#### 4. LITERATURA CITADA

- DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15
- EDGAR, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32:1792-1797
- FAUQUET, C.M.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; MORIONES, E.; STANLEY, J.; ZERBINI, M. & ZHOU, X. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology* 153:783-821
- FAUQUET, C.M. & STANLEY, J. 2003. Geminivirus classification and nomenclature: progress and problems. *Annals of Applied Biology* 142:165-189
- FUENTES, S. & SALAZAR, L.F. 2003. First Report of Sweet potato leaf curl virus in Peru. *Plant Disease* 87:98-98
- HIGGINS, D.G.; BLEASBY, A.J. & FUCHS, R. 1992. Clustal V - Improved Software for Multiple Sequence Alignment. *Computer Applications in the Biosciences* 8:189-191
- INOUE-NAGATA, A.K.; ALBUQUERQUE, L.C.; ROCHA, W.B. & NAGATA, T. 2004. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi29 DNA polymerase. *Journal of Virological Methods* 116:209-211
- LOLE, K.S.; BOLLINGER, R.C.; PARANJAPE, R.S.; GADKARI, D.; KULKARNI, S.S.; NOVAK, N.G.; INGERSOLL, R.; SHEPPARD, H.W. & RAY, S.C. 1999. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *Journal of Virology* 73:152-160
- LOTTRAKUL, P. & VALVERDE, R.A. 1999. Cloning of a DNA-A-like genomic component of sweet potato leaf curl virus: nucleotide sequence and phylogenetic relationships. In:

- line M.P.P.O. (ed) Molecular Plant Pathology On line, Molecular Plant Pathology On line edn. Molecular Plant Pathology On line
- LOTRAKUL, P.; VALVERDE, R.A.; CLARK, C.A. & FAUQUET, C.M. 2003. Properties of a Begomovirus isolated from sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) infected with Sweet potato leaf curl virus. *Revista Mexicana de Fitopatologia* 21:128-136
- LOTRAKUL, P.; VALVERDE, R.A.; CLARK, C.A.; SIM, J. & DE LA TORRE, R. 1998. Detection of a geminivirus infecting sweet potato in the United States. *Plant Disease* 82:1253-1257
- LOZANO, G.; TRENADO, H.P.; VALVERDE, R.A. & NAVAS-CASTILLO, J. 2009. Novel begomovirus species of recombinant nature in sweet potato (*Ipomoea batatas*) and *Ipomoea indica*: taxonomic and phylogenetic implications. *Journal General Virology* 90:2550-2562
- LUAN, Y.S.; ZHANG, J.; LIU, D.M. & LI, W.L. 2007. Molecular characterization of sweet potato leaf curl virus isolate from China (SPLCV-CN) and its phylogenetic relationship with other members of the Geminiviridae. *Virus Genes* 35:379-385
- MARTIN, D.P.; LEMEY, P.; LOTT, M.; MOULTON, V.; POSADA, D. & LEFEUVRE, P. 2010. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* 26 2462-2463
- PADIDAM, M.; SAWYER, S. & FAUQUET, C.M. 1999. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265:218-225.
- PAPROTKA, T.; BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N.; RESENDE, R.O.; JESKE, H.; FARIA, J.C. & RIBEIRO, S.G. 2010. Genomic diversity of sweet potato geminiviruses in a Brazilian germplasm bank. *Virus Research* 149:224-233
- SANZ, A.I.; FRAILE, A.; GARCIA-ARENAL, F.; ZHOU, X.; ROBINSON, D.J.; KHALID, S.; BUTT, T. & HARRISON, B.D. 2000. Multiple infection, recombination and

- genome relationships among begomovirus isolates found in cotton and other plants in Pakistan. *Journal of General Virology* 81:1839-1849.
- STANLEY, J.; BISARO, D.M.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; FAUQUET, C.M.; HARRISON, B.D.; RYBICKI, E.P. & STENGER, D.C. 2005. Family *Geminiviridae*. In: Fauquet C.M.; Mayo M.A.; Maniloff J.; Desselberger U.; Ball L.A. (eds) *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp 301-326
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M. & KUMAR, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599
- VARSANI, A.; SHEPHERD, D.N.; DENT, K.; MONJANE, A.L.; RYBICKI, E.P. & MARTIN, D.P. 2009. A highly divergent South African geminivirus species illuminates the ancient evolutionary history of this family. *Virology Journal* 6:36
- YAZDI, H.R.; HEYDARNEJAD, J. & MASSUMI, H. 2008. Genome characterization and genetic diversity of beet curly top Iran virus: a geminivirus with a novel nonanucleotide. *Virus Genes* 36:539-545

# CAPÍTULO 4

---

---

**DIVERSIDADE GENÉTICA E ANÁLISE DE RECOMBINAÇÃO DE  
SWEEPOVÍRUS NO BRASIL**



## DIVERSIDADE GENÉTICA E ANÁLISE DE RECOMBINAÇÃO DE SWEEPÓVIRUS NO BRASIL\*

### RESUMO

Begomovírus monopartidos (gênero *Begomovirus*, família *Geminiviridae*) infectam batateira-doce em todo o mundo e são conhecidos como sweepovírus. Devido à batateira-doce ser propagada vegetativamente, a degenerescência causada pelo acúmulo viral tornou-se um dos maiores fatores limitantes para a sua produção. Infecções mistas com espécies e estirpes de sweepovírus podem levar à ocorrência de recombinação, a qual pode contribuir para o surgimento de novos sweepovírus recombinantes. O estudo apresentado aqui determinou a sequência completa de 34 novos isolados de sweepovírus oriundos de amostras obtidas de um banco de germoplasma de batateira-doce e de campo de produção no Brasil. Estas sequências foram comparadas com outras obtidas de um banco de dados público afim de fornecer uma visão geral da diversidade genética e dos padrões de troca genética em isolados de sweepovírus do Brasil, e também revisar a classificação e nomenclatura de sweepovírus de acordo com os critérios estabelecidos pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV). Coinfecções e eventos de recombinação foram identificados. As análises dos pontos de recombinação detectados entre os sweepovírus revelaram que a maioria ocorre na região intergênica (RI) e na metade da “open reading frame” (ORF) C1. A diversidade genética de sweepovírus foi consideravelmente maior do que anteriormente descrita no Brasil. Finalmente, análises de recombinação indicam que trocas genômicas são responsáveis pelo surgimento de espécies e estirpes de sweepovírus e fornecem informações valiosas para o entendimento da diversidade e evolução desses vírus.

**Palavra-chave:** batata-doce, begomovírus, *Convolvulaceae*, *Ipomoea batatas*, sweepovírus.

\* Capítulo aceito para publicação na revista *Virology Journal* (Anexo 9) com modificações:

ALBUQUERQUE, L.C.; INOUE-NAGATA, A.K.; PINHEIRO, B.; RESENDE, R.O.; MORIONES, E. & NAVAS-CASTILLO, J. 2011. Genetic diversity and recombination analysis of sweepoviruses from Brazil.

# GENETIC DIVERSITY AND RECOMBINATION ANALYSIS OF SWEEP VIRUSES FROM BRAZIL

## ABSTRACT

Monopartite begomoviruses (genus *Begomovirus*, family *Geminiviridae*) infect sweet potato (*Ipomoea batatas*) around the world are known as sweepviruses. Because sweet potato is vegetatively propagated, accumulation of viruses can become a major constraint for its production. Mixed infections of sweepvirus species and strains can lead to recombination, which may contribute to the generation of new recombinant sweepviruses. The study reported here determined the sequences of 34 new sweepvirus full genome sequences sampled in a sweet potato germplasm bank and in commercial fields in Brazil. These sequences were compared with others from public nucleotide sequence databases to provide a comprehensive overview of the genetic diversity and patterns of genetic exchange in sweepviruses isolated from Brazil and to review the classification and nomenclature of sweepviruses in accordance with the current guidelines proposed by the Geminiviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Co-infections and extensive recombination events were identified in Brazilian sweepviruses. Analyses of the recombination breakpoints detected within the sweepvirus dataset revealed that most of them occurred in the intergenic region (IR) and in the middle of the C1 open reading frame (ORF). The genetic diversity of sweepviruses was considerably greater than previously described in Brazil. Finally, recombination analyses revealed that genomic exchange is responsible for the emergence of sweepvirus species and strains and provided valuable new information for understanding the diversity and evolution of sweepviruses.

**Keywords:** begomovirus, *Convolvulaceae*, *Ipomoea batatas*, sweepvirus, sweet potato.

## 1. INTRODUÇÃO

A batata-doce (*Ipomoea batatas*, família *Convolvucaceae*) é uma das mais importantes culturas de subsistência em vários países em desenvolvimento atrás apenas da batata (*Solanum tuberosum*) e mandioca (*Manihot esculenta*) (FAOSTAT). Mais de 30 espécies virais são conhecidas infectando batateira-doce, as quais podem causar sérias doenças à cultura (Clark *et al.*, 2011). Muitos desses são begomovírus monopartidos (gênero *Begomovirus*, família *Geminiviridae*). Os primeiros begomovírus infectando a cultura caracterizados molecularmente foram *Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV) e *Sweet potato leaf curl Georgia virus* (SPLCGoV), isolados em Louisiana, EUA, em 1999 (Lotrakul & Valverde, 1999; Lotrakul *et al.*, 2003). Posteriormente, infecções causadas por begomovírus em batateira-doce foram relatadas em vários países, incluindo Peru (Fuentes & Salazar, 2003), Espanha (Lozano *et al.*, 2009), China (Luan *et al.*, 2006; Luan *et al.*, 2007), Itália (Briddon *et al.*, 2006), Uganda (Wasswa *et al.*, 2011), Estados Unidos (Zhang & Ling, 2011) e Brasil (Paprotka *et al.*, 2010; Albuquerque *et al.*, 2011). Estes relatos resultaram na descrição de dez novas espécies (Luan *et al.*, 2007; Lozano *et al.*, 2009; Paprotka *et al.*, 2010; Albuquerque *et al.*, 2011; Wasswa *et al.*, 2011; Zhang & Ling, 2011). Filogeneticamente, esses vírus, cujo nome sweepovírus tem sido proposto (Lozano *et al.*, 2009; Briddon *et al.*, 2010), agrupam em um cluster monofilético, separado dos begomovírus do Novo e Velho Mundo (Lozano *et al.*, 2009). Além da batateira-doce, os sweepovírus podem infectar outras hospedeiras como *I. nil* ou *I. setosa* (Trenado *et al.*, 2011). Os sintomas causados por sweepovírus dependem da hospedeira e normalmente consistem de enrolamento foliar e amarelecimento de nervura, embora infecções possam ser assintomáticas.

Os begomovírus são transmitidos a plantas dicotiledôneas pela mosca-branca, *Bemisia tabaci*, causando prejuízos importantes em várias culturas do mundo (Banks *et al.*, 1999; Clark & Hoy, 2006; Valverde *et al.*, 2007). Esses vírus possuem genoma pequeno constituído

de ssDNA circular, com um (monopartido) ou dois (bipartido) componentes genômicos encapsidados em uma partícula icosaédrica geminada (Rojas *et al.*, 2005; Stanley *et al.*, 2005). O componente DNA-A tem uma (V1) ou duas ORFs (V1 e V2, nos begomovírus do Velho Mundo) no sentido viral e quatro ORFs (C1, C2, C3 e C4) no sentido complementar, separadas por uma região intergênica (RI). O DNA-A codifica a proteína da capa (CP ou V1) essencial para a transmissão viral pela *B. tabaci* e uma proteína V2 que pode estar envolvida na acumulação viral, desenvolvimento de sintomas e movimento viral (Harrison, 1985; Padidam *et al.*, 1996). As ORFs no sentido complementar codificam as proteínas Rep (“replication-associated protein” ou C1), TrAP (“transcriptional activation protein” ou C2), que controla a expressão viral, REn (“replication enhancer protein” ou C3), necessária para a replicação do DNA viral, e C4, uma supressora de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS). O componente DNA-B dos begomovírus bipartidos codifica duas proteínas, NSP (“nuclear shuttle protein” ou BV1) e MP (proteína de movimento ou BC1) envolvidas no movimento intra e intercelular na planta (Noueiry *et al.*, 1994).

Uma vez que a batateira-doce é propagada vegetativamente, a acumulação viral pode ocorrer resultando na coinfeção de múltiplos genomas virais em uma única planta. Infecções mistas de espécies e estirpes de sweepovírus são descritas como frequentes em batateira-doce (Lozano *et al.*, 2009; Albuquerque *et al.*, 2011; Zhang & Ling, 2011). Esse fenômeno é extremamente importante para a evolução viral, pois fornece oportunidades para que eventos de recombinação ocorram gerando uma alta diversidade genética (Bridson *et al.*, 1996; Padidam *et al.*, 1999; Sanz *et al.*, 2000). A importância da recombinação na evolução dos geminivírus é bem conhecida (Umaharan *et al.*, 1998; Padidam *et al.*, 1999; Lefeuvre *et al.*, 2007b) e provavelmente é o mecanismo responsável pela diversificação genética e pelo surgimento das mais importantes espécies de begomovírus na agricultura (Monci *et al.*, 2002; Garcia-Andres *et al.*, 2006; Owor *et al.*, 2007). Enquanto gera descendentes mais adaptados, a

recombinação tem sido a causa da alta diversidade genética e conseqüentemente tem complicado a classificação de novas espécies.

Neste trabalho, apresentamos um estudo de diversidade genética entre sweepovírus no Brasil. Trinta e quatro sequências completas foram determinadas e analisadas. Baseadas nestas e em outras sequências disponíveis no banco de dados, a classificação e nomenclatura dos sweepovírus foram revisadas de acordo com os critérios taxonômicos para a família *Geminiviridae* do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV). Neste estudo também são fornecidas evidências claras de que eventos de recombinação podem levar ao surgimento de novas espécies e estirpes de sweepovírus.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Coleção de amostras e extração de DNA**

Amostras foliares de batateira-doce exibindo vários sintomas, incluindo espessamento de nervura, clorose, enrolamento, manchas e distorção foliar foram coletadas no banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças (Brasília-DF, Brasil, ou sweet potato Embrapa germplasm bank - SPEGB) e em campos de produção de quatro estados brasileiros (Tabela 1). O DNA total foi extraído seguindo o protocolo descrito por Doyle & Doyle (1987).

### **2.2. Estratégia para clonagem**

O DNA geminiviral circular foi amplificado por círculo rolante (“rolling circle amplification – RCA”) usando a  $\Phi$ -29 DNA polimerase (TempliPhi kit, GE Healthcare) como descrito por Inoue-Nagata *et al.* (2004). O produto do RCA foi digerido com várias enzimas de restrição (BamHI, EcoRI, EcoRV, HindIII, KpnI, PstI, SacI, SacII, SpeI e XbaI) para identificar aquelas que digerem em um sítio único para clonagem do genoma completo (~2,8 kb). Os fragmentos correspondentes ao genoma completo foram clonados no vetor pBluescript SK(+) (Stratagene, Califórnia, EUA) e sequenciados usando os serviços da

Macrogen Inc. (Seoul, Coréia do Sul). Uma ou duas enzimas foram selecionadas para a clonagem do genoma viral presentes em cada amostra (Tabela 1).

### **2.3. Diversidade genética**

As identidades nucleotídicas foram calculadas usando o Clustal V (Higgins *et al.*, 1992) (incluído no programa MegAlign DNASTAR Inc., Madison, EUA). Como recomendado pelo grupo de estudos da família *Geminiviridae* (ICTV), a sequência completa do componente genômico DNA-A com identidade nucleotídica <89%, quando comparada com todas as outras sequências, foram consideradas novas espécies, enquanto aquelas <94 e >89% foram consideradas novas estirpes de uma espécie (Fauquet *et al.*, 2008).

### **2.4. Análise filogenética**

As sequências completas dos 34 isolados de sweepovírus obtidos das 21 amostras analisadas nesse estudo (Tabela 1), juntamente com 67 sequências completas de sweepovírus disponíveis no banco de dados público (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) em Outubro de 2011 (Tabela 2), foram alinhadas usando o programa Muscle (Edgar, 2004). As relações filogenéticas foram inferidas usando UPGMA com 1000 repetições e as distâncias evolutivas foram calculadas usando o método p-distance incluído no MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011).

### **2.5. Análises de recombinação**

Todas as sequências usadas neste estudo (Tabela 1 e 2) foram alinhadas usando o programa Muscle (Edgar, 2004) e a detecção das sequências recombinantes, identificação das prováveis sequências parentais e localização dos possíveis pontos de recombinação foram feitas usando os métodos RDP (Martin & Rybicki, 2000), GENCONV (Padidam *et al.*, 1999), BOOTSCAN (Martin *et al.*, 2005), MAXIACHI (Smith, 1992), CHIMAERA (Posada & Crandall, 2002), SIScan (Gibbs *et al.*, 2000) e 3SEQ (Boni *et al.*, 2007) incluídos no programa RDP3 (Martin *et al.*, 2010). Somente os eventos de recombinação detectados por

todos os métodos descritos acima e envolvendo fragmentos compartilhando  $\geq 97\%$  de identidade nucleotídica com seus parentais foram considerados. Os eventos de recombinação detectados foram confirmados com o programa SimPlot (Lole *et al.*, 1999).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Análises das sequências completas dos genomas de sweepovírus

A sequência nucleotídica completa dos 34 isolados (GenBank HQ393442 ao HQ393472 e HQ393474 ao HQ393476), correspondendo aos componentes genômicos completos dos sweepovírus, foi determinada para as amostras do SPEGB (sweet potato Embrapa germoplasm bank) e dos campos comerciais. Todos os genomas (tamanhos variando entre 2779 e 2843 nucleotídeos) têm a organização típica dos begomovírus monopartidos, com duas ORFs no sentido viral (V1 e V2) e quatro ORFs no sentido complementar (C1, C2, C3 e C4). Todas possuem a sequência nonanucleotídeo conservada 5'-TAATATT↓AC-3', e quatro elementos repetidos (iterons; Anexo 1), três diretos (I, II e III) e um invertido (IV), com a sequência consenso GGWGD localizada próxima ao TATA box (Arguello-Astorga *et al.*, 1994). O domínio relacionado aos iterons da região N-terminal da Rep ("Rep IRD, iteron-related domain in the N-terminal region of the Rep") também foi identificado (Argüello-Astorga & Ruiz-Medrano, 2001). Nesse estudo foram encontradas sequências contendo três novos iterons (GGTGGG; TATGGGTGGA e CCCACCTAAT) e três Rep IRDs (MATPKRFRIS; MAPPNRFKIQ e MPRAGRFLN) que diferem daqueles encontrados por Lozano *et al.* (2009) e Zang & Ling (2011) para os sweepovírus (Anexo 5).

As 34 sequências determinadas aqui foram comparadas com 67 sequências de sweepovírus obtidas do banco de dados (Tabela 2 e anexo 6). Cada isolado foi nomeado seguindo os critérios atuais de nomenclatura para os begomovírus (Tabela 1 e Anexo 6 para o nome completo do isolado). Considerando os atuais critérios taxonômicos para a família *Geminiviridae* propostos pelo ICTV (Fauquet *et al.*, 2003; Fauquet *et al.*, 2008), dois isolados

pertencem a uma mesma espécie se a identidade nucleotídica for >89%. Os isolados descritos nesse estudo pertencem a três espécies, *Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV), *Sweet potato golden vein virus* (SPGVV) (o termo “associated” foi excluído do nome, *sweet potato golden vein-associated virus*, seguindo os padrões de nomenclatura para os begomovírus) e *Sweet potato leaf curl Spain virus* (SPLCESV), com a porcentagem de identidade nucleotídica variando entre 92,2 e 98,4% dentro de cada espécie. Entre esses isolados, vinte e um pertencem a três novas estirpes de SPLCV e SPGVV nomeados SPLCV-Brazil (SPLCV-BR), SPLCV-Pernambuco (SPLCV-PE) e SPGVV-Rondonia (SPGVV-RO). Os outros isolados são variantes de SPLCV-United States (SPLCV-US), SPGVV-Paraíba (SPGVV-PB) e SPLCESV. Os isolados de SPGVV e SPLCESV foram encontrados somente no SPEGB, enquanto os isolados de SPLCV foram encontrados no SPEGB e nos campos comerciais. As amostras de São Paulo estavam infectadas com isolados de SPLCV-US e SPLCV-Sao Paulo (SPLCV-SP). Por outro lado, as amostras de Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Sul estavam infectadas por isolados de SPLCV-PE (Tabela 1). Um fato interessante foi que infecções mistas foram identificadas em seis amostras (#171, #184, #325, #337, #346 e #370) do SPEGB, enquanto todas as amostras de campo estavam aparentemente infectadas por isolados pertencentes a uma única espécie/estirpe, como sugerido pela uniformidade dos clones obtidos dessas amostras (Tabela 1).

### **3.3. Análises taxonômica e filogenética dos sweepovírus**

As identidades nucleotídicas entre as sequências determinadas nesse estudo e as obtidas do banco de dados (GenBank) foram calculadas usando o Clustal V. Um dado importante foi que alguns isolados de sweepovírus, de acordo com os critérios para classificação da família *Geminiviridae* (Fauquet *et al.*, 2008), foram classificados de forma equivocada (Tabela 2 e Anexo 6 são mostrados os novos nomes propostos). Estes isolados foram SPLCV-Ceara[Brazil:Fortaleza1] (SPLCV-CE[BR:For1], FJ969832), SPLCV-Rio Grande do



Sul1[Brazil:Tavares1] (SPLCV-RS1[BR:Tav1], FJ969833) (Paprotka *et al.*, 2010), Sweet potato golden vein-associated virus-[United States:Mississippi:1b-3:07], (SPGVaV-[US:MS:1B-3], HQ333143) (Zhang & Ling, 2011), SPGVaV-Pará[Brazil:Belém1], (SPGVaV-PA[BR:Bel1], FJ969829) (Paprotka *et al.*, 2010) e Ipomoea yellow vein virus-[Spain:Malaga:IG1:2006] (IYVV[ES:Mal:IG1:06], EU839576) (Lozano *et al.*, 2009). O genoma do isolado de SPLCV-CE[BR:For1] apresenta <89% de identidade nucleotídica com qualquer outra sequência de begomovírus (Anexo 2) e de acordo com o limite estabelecido de 89% de identidade para separação de espécie dentro do gênero *Begomovirus* (Fauquet *et al.*, 2003), este isolado muito provavelmente pertence a uma nova espécie, renomeada aqui como Sweet potato leaf curl Brazil virus (SPLCBRV). O isolado SPLCV-RS1[BR:Tav1] apresenta >90% de identidade com os isolados de SPLCLaV e, portanto, deve ser classificado como Sweet potato leaf curl Lanzarote virus-Brazil[BR:RS:Tav1:07] (SPLCLaV-BR[BR:RS:Tav1:07]. A sequência de IYVV-[ES:Mal:IG1:06] compartilha menos que 89% com IYVV-[Spain:1998] e, portanto, este isolado foi classificado como uma nova espécie nomeada Ipomoea yellow vein Malaga virus (IYVMaV). Adicionalmente, baseado nas identidades nucleotídicas encontradas (Anexo 6), sugere-se que os isolados SPGVaV-[United States:Mississippi:1B-3] (SPGVaV-[US:MS:1B-3], HQ333143), SPGVaV-[Brazil:Belém1] (SPGVaV-PA[BR:Bel1], FJ969829) e Merremia leaf curl virus-[Puerto Rico:N1] (DQ644561) sejam classificados como estirpes de Merremia leaf curl virus (MerLCuV): MerLCuV-US[US:MS:1B-3:07], MerLCuV-BR[BR:PA:Bel1:07] e MerLCuV-PR[PR:N1:06], respectivamente.

Na árvore filogenética (Figura 1) as sequências de sweepovírus foram consistentemente agrupadas de acordo com a classificação proposta em espécie/estirpe e separadas dos begomovírus do Novo e Velho Mundo. Esse agrupamento está de acordo com o cálculo de identidade nucleotídica (Anexo 6).

### 3.4. Análise de recombinação

Todas as 101 sequências de sweepovírus foram alinhadas e analisadas quanto à possível ocorrência de recombinação. Os métodos usados para determinar os pontos de recombinação indicam fortes evidências de pelo menos 13 eventos de recombinação em 19 dos 101 genomas analisados (Figura 2). Seguindo os critérios adotados (eventos de recombinação detectados por pelo menos sete métodos e fragmentos recombinantes com identidade nucleotídica  $\geq 97\%$  com as sequências parentais), a maioria dos eventos de recombinação foi detectada entre isolados do SPEGB. Um total de oito padrões de recombinação foram detectados nas sequências descritas nesse trabalho, enquanto cinco foram encontrados nas sequências de sweepovírus previamente publicadas. Os pontos de recombinação foram detectados entre a região intergênica (RI) e V1 (eventos 1, 2 e 5); V1 e C2/C3 (evento 3); C1 e C1 (evento 4); V1 e C2 (evento 6); V1 e C1 (evento 7); V2 e C2/C3 (evento 9); C1/C4 e V1/V2 (evento 12) e C1 e RI (eventos 8, 10, 11 e 13) (Figura 2). Após a análise com o programa RDP3, as recombinações detectadas nas sequências descritas nesse estudo (identificadas pelos eventos 1 – 8, Figura 2A, 2B) foram testadas usando o programa SimPlot (Figura 3). Todos os eventos identificados pelo programa RDP3 foram confirmados pelo SimPlot. SPLCV-US[BR:RO:OPO:08] (HQ393453) parece ser um recombinante (pontos de recombinação detectados nas posições 37 e 1006 nt) entre os prováveis parentais SPLCV-SP[BR:SP:AlvM:09], HQ393476 e SPLCV-BR[BR:RO:OPO:08], HQ393455 (Figura 3A). Entre os isolados de SPLCV-BR somente o SPLCV-BR[BR:BA:Uru:08] (HQ393442) apresenta três eventos de recombinação (evento 2 – 58-523; evento 3 – 955-1325 e evento 4 – 1926-2614) e três prováveis parentais: SPGVV-RO[BR:BA:Uti:08] (HQ393447), SPLCV-US[BR:RO:OPO:08] (HQ393453) e uma sequência desconhecida (Figura 3B). Para os isolados de SPLCV-BR, [BR:BA:CA:08] e [BR:RO:Cac:08], dois eventos de recombinação foram identificados (evento 2 – 45-541 e evento 4 – 1926-2614), enquanto SPLCV-

BR[BR:RO:OPO:08] parece ter apenas o evento 2 (Figura 2B). O isolado SPLCESV-[BR:RO:Cac:08] (HQ393458) foi identificado como recombinante (posições 994 e 2770 nt) de SPLCV-BR[BR:BA:CA:08] (HQ393445) e SPLCESV-[BR:BA:Uti:08] (HQ393448) (Figura 3C). Quando as sequências de SPGVV-PB[BR:BA:CA:08] (HQ393444) e SPGVV-RO[BR:RO:Cac:08] (HQ393459) foram desafiadas usando o SimPlot, dois fragmentos recombinantes (evento 6 – 698 e 1589; e evento 7 – 581 e 1727) com dois prováveis parentais SPLCESV-[BR:RO:Cac:08] e SPLCV US[BR:PA:08] (HQ393450); e SPLCESV-[BR:RO:Cac:08] e uma sequência desconhecida foram identificados (Figura 3D e 3E), respectivamente. As quatro sequências restantes de SPGVV-RO apresentaram apenas o evento 7 (Figura 2B). Finalmente, quando a análise foi realizada para o isolado SPLCV-SP[BR:SP:PP:09], dois pontos de recombinação (nas posições 24 e 2007) e dois prováveis parentais (SPLCV-US[BR:RS:Ros1:07], FJ969837 e SPLCSPV-[BR:SP:AlvM:09], HQ393477) foram detectados (Figura 3F).

#### 4. DISCUSSÃO

O uso do RCA (“rolling circle amplification”) para amplificar DNA circular viral (Inoue-Nagata *et al.*, 2004) tem facilitado a clonagem do genoma dos geminivírus. Fato comprovado para amostras de batateira-doce, cuja extração de DNA total é difícil devido às altas quantidades de polissacarídeos no tecido (Varadarajan & Prakash, 1991). Uma vez que o método RCA requer pequenas quantidades de DNA, diluir a amostra é o suficiente para evitar os efeitos de substâncias contaminantes. Um total de 34 sequências genômicas completas foram isoladas de amostras de batateira-doce coletadas em banco de germoplasma (SPEGB) e em campos comerciais de quatro estados brasileiros. De acordo com os critérios do ICTV (Fauquet *et al.*, 2008), estas pertencem a novas estirpes de SPLCV (Lotrakul *et al.*, 1998), SPLCV-BR e SPLCV-PE; estirpes de SPGVV (Paprotka *et al.*, 2010), SPGVV-RO e outros

13 isolados considerados variantes de SPLCV-US (Lotrakul *et al.*, 1998), SPLCV-SP (Albuquerque *et al.*, 2011) e SPLCESV (Lozano *et al.*, 2009).

Todas as sequências de sweepovírus usadas nesse estudo foram comparadas e, uma vez que a classificação foi revisada de acordo com os critérios do ICTV, verificou-se que quatro isolados podem não ter sido apropriadamente classificados. Sugere-se que os isolados descritos como SPLCV-CE (Paprotka *et al.*, 2010) e IYVV-[ES:IG1] (Lozano *et al.*, 2009) sejam classificados como novas espécies, nomeadas aqui como Sweet potato leaf curl Brazil virus (SPLCBRV) e Ipomoea yellow vein Malaga virus (IYVMaV), respectivamente. Por outro lado, o isolado SPLCV-RS1 (Paprotka *et al.*, 2010) poderia ser classificado como uma nova estirpe de SPLCLaV (Lozano *et al.*, 2009) e sugere-se o nome Sweet potato leaf curl Lanzarote virus-Brazil (SPLCLaV-BR). Uma vez isso feito, sugere-se que todos os isolados de SPLCLaV da Espanha sejam classificados como SPLCLaV-ES. Da mesma forma, propõe-se que os isolados designados como SPGVaV-[US:MS:1B-3], SPGVaV-PA[BR:Bel1] e Merremia leaf curl virus-[PR:N1] (MeLCV-[PR:N1]) sejam renomeados como MerLCuV-US-[US:MS:1B-3:07], MerLCuV-BR[BR:PA:Bel1:07] e MerLCuV-[PR:N1:06], respectivamente. Além disso, sugere-se eliminar o termo “associated” dos nomes virais, uma vez que a expressão de sintomas não foi estudada em nenhuma espécie. Finalmente, concluiu-se que 44 das 67 sequências requerem um identificador de estirpe (Tabela 2). Esses resultados claramente ilustram a complexidade da taxonomia e nomenclatura dos sweepovírus. Portanto, um conjunto de modificações é sugerido para atualizar a nomenclatura dos sweepovírus e permitir uma análise filogenética mais coerente (Tabela 1 e Figura 1).

A análise filogenética demonstrou que a diversidade de sweepovírus encontrada nas amostras do SPEGB é maior do que nas coletadas no campo. Enquanto no SPEGB (n=10) três espécies (SPLCV, SPGVV e SPLCESV), quatro estirpes (SPLCV-US, SPLCV-BR, SPLCV-PE, SPGVV-PB e SPGVV-RO) e 11 recombinantes foram encontrados, nas amostras de

campo (n=11) somente uma espécie (SPLCV) e três estirpes (SPLCV-US, SPLCV-SP e SPLCV-PE) foram observadas. Além disso, infecções mistas foram encontradas somente nas amostras do SPEGB, embora esse tipo de infecção tenha sido encontrada no campo em outros países (Lozano *et al.*, 2009; Zhang & Ling, 2011). Algumas características presentes no SPEGB, como a propagação vegetativa da batateira-doce, a coexistência de vários acessos coletados pelo Brasil e confinados no mesmo telado, e a presença de mosca-branca (*Bemisia tabaci*) na coleção viva do banco de germoplasma, podem explicar estas infecções mistas.

Os padrões de recombinação inter-espécies/estirpes dos geminivírus e “hot” e “cold spots” de recombinação tem sido descritos entre membros do gênero *Begomovirus* (Lefeuvre *et al.*, 2007a; Owor *et al.*, 2007; Prasanna & Rai, 2007; Patil & Fauquet, 2009). No entanto, após análise dos pontos de recombinação detectados entre os sweepovírus alguns eventos de recombinação foram identificados. Em alguns casos (Figura 3A, C, D e F), os recombinantes parecem ser resultado de eventos de recombinação recentes. Embora muitos sweepovírus sejam relatados, outros ainda permanecem desconhecidos sendo possivelmente os parentais virais não identificados de alguns recombinantes, como mostrado na Figura 3E. A maioria dos pontos de recombinação ocorre na RI (detectado entre as posições 2770 e 96) e na metade da ORF C1 (entre as posições 2000 e 2250) (Figura 2A). Do mesmo modo, três pontos de recombinação (eventos 1, 3 e 5) foram identificados próximos à região terminal da ORF V1 (Figura 2A). Esses resultados são consistentes com aqueles já descritos para os geminivírus, onde demonstram que a Rep, interface ORF V1/C3 e RI são “hot spots” de recombinação (Garcia-Andres *et al.*, 2007; Lefeuvre *et al.*, 2007a; Lefeuvre *et al.*, 2007b; Lefeuvre *et al.*, 2009). Lefeuvre *et al.* (Lefeuvre *et al.*, 2007a) também descrevem a presença de uma região “cold spot” de recombinação dentro da ORF V2 e o terceiro quarto da ORF V1 dos begomovírus, mas aqui se detectou a ocorrência de pontos de recombinação na primeira metade da ORF V1. Alguns eventos de recombinação em sweepovírus têm sido previamente

descritos e a maioria foi confirmada nesse estudo (eventos 9-13, Figura 2). A detecção de padrões similares de recombinação está de acordo com as recentes hipóteses de que sítios de recombinação não estão aleatoriamente distribuídos ao longo do genoma (Jeske *et al.*, 2001; Lefeuvre *et al.*, 2007b; Prasanna & Rai, 2007). Os padrões de recombinação observados são muito provavelmente devidos à existência de regiões com alta predisposição bioquímica e biofísica e com tolerância à recombinação. Recombinantes gerados experimentalmente têm mostrado que a RI e a interface V1/C3 são “hot spot” de recombinação (Garcia-Andres *et al.*, 2007) e isso pode explicar o porquê de recombinantes oriundos de pontos de recombinação que ocorreram fora dos genes serem geralmente mais viáveis do que aqueles ocorridos dentro dos genes (Lefeuvre *et al.*, 2007b). Além da homologia de sequência, estruturas secundárias podem também favorecer a ocorrência de recombinação (Garcia-Andres *et al.*, 2007). Neste caso, detectou-se pontos de recombinação na Rep e isso foi também observado entre outros geminivírus.

## **5. CONCLUSÃO**

Esse estudo mostrou que a diversidade genética de sweepovírus é consideravelmente maior do que aquela descrita anteriormente (Paprotka *et al.*, 2010) e destaca a importância da recombinação na evolução desses vírus. Estes resultados indicam que eventos de recombinação, muito provavelmente, favorecidos por infecções mistas, são aparentemente responsáveis pelo surgimento de espécies e estirpes de sweepovírus, embora alterações no círculo de hospedeiros, tropismo celular, sintomas e patogenicidade viral ainda permaneçam obscuras. Recentemente, o primeiro clone infectivo de um sweepovírus, SPLCLaV, foi descrito (Trenado *et al.*, 2011). Isso é importante uma vez que possibilita o estudo de aspectos relacionados à patogenicidade, além de poder ser usado em programas de melhoramento genético visando a obtenção de batateira-doce resistente. O estudo da diversidade viral em uma região em particular fornece informações importantes para o desenvolvimento de

estratégias de controle, além disso, é essencial na identificação de espécies/estirpes para seleção de germoplasma resistente, e finalmente para a compreensão da diversificação de sweepovírus resultante das trocas de material propagativo no país. A manutenção *in vivo* de plantas propagadas vegetativamente tem provado ser uma estratégia arriscada, pois pode permitir ou acelerar o surgimento de novas espécies ou estirpes que podem disseminar na natureza se as condições de isolamento não forem suficientes para mantê-los livres de insetos vetores.

**Tabela 1 Origem dos 34 isolados de sweepovírus usados neste estudo**

Origem da amostra	Amostra	Enzima	Espécie	Estirpe[Isolado]	Acrônimo	Nº de acesso	
SPEGB <sup>a</sup>	#167	EcoRV	SPLCV <sup>b</sup>	United States[Brazil:Bahia:Cruz das Almas1:2008]	SPLCV-US[BR:BA:CA1:08]	HQ393443	
SPEGB	#171	SacI		United States[Brazil:Bahia:Cruz das Almas2:2008]	SPLCV-US[BR:BA:CA2:08]	HQ393446	
SPEGB	#293	EcoRV		United States[Brazil:Para:2008]	SPLCV-US[BR:PA:08]	HQ393450	
SPEGB	#325	SacI		United States[Brazil:Rondonia:Porto Velho:2008]	SPLCV-US[BR:RO:PV:08]	HQ393451	
SPEGB	#337	EcoRV		United States[Brazil:Rondonia:Ouro Preto do Oeste:2008]	SPLCV-US[BR:RO:OPO:08]	HQ393453	
Sao Paulo	#SP12	BamHI		United States[Brazil:Sao Paulo:Alfredo Marcondes1:2009]	SPLCV-US[BR:SP:AM1:09]	HQ393471	
Sao Paulo	#SP12	SacI		United States[Brazil:Sao Paulo:Alfredo Marcondes2:2009]	SPLCV-US[BR:SP:AM2:09]	HQ393472	
Sao Paulo	#SP88	BamHI		United States[Brazil:Sao Paulo:Alfredo Marcondes3:2009]	SPLCV-US[BR:SP:AM3:09]	HQ393474	
Sao Paulo	#SP130	BamHI		United States[Brazil:Sao Paulo:Alfredo Marcondes4:2009]	SPLCV-US[BR:SP:AM4:09]	HQ393475	
Sao Paulo	#SP140	BamHI		Sao Paulo[Brazil:Sao Paulo:Presidente Prudente:2009]	SPLCV-SP[BR:SP:PP:09]	HQ393476	
SPEGB	#134	SpeI		Brazil[Brazil:Bahia:Uruca:2008]	SPLCV-BR[BR:BA:Uru:08]	HQ393442	
SPEGB	#171	BamHI		Brazil[Brazil:Bahia:Cruz das Almas:2008]	SPLCV-BR[BR:BA:CA:08]	HQ393445	
SPEGB	#235	BamHI		Brazil[Brazil:Sergipe:Riachao:2008]	SPLCV-BR[BR:SE:Ria:08]	HQ393449	
SPEGB	#337	SacI		Brazil[Brazil:Rondonia:Ouro Preto do Oeste:2008]	SPLCV-BR[BR:RO:OPO:08]	HQ393455	
SPEGB	#370	SacI		Brazil[Brazil:Rondonia:Cacoal:2008]	SPLCV-BR[BR:RO:Cac:08]	HQ393460	
SPEGB	#346	EcoRV		Pernambuco[Brazil:Rondonia:Porto Velho:2008]	SPLCV-PE[BR:RO:PV:08]	HQ393456	
Paraiba	#PB82	SacI		Pernambuco[Brazil:Paraiba:Pedras de Fogo:2008]	SPLCV-PE[BR:PB:PF:08]	HQ393461	
Pernambuco	#PE49	BamHI		Pernambuco[Brazil:Pernambuco:Camocim de São Félix1:2008]	SPLCV-PE[BR:PE:CSF1:08]	HQ393462	
Pernambuco	#PE49	SacI		Pernambuco[Brazil:Pernambuco:Camocim de São Félix2:2008]	SPLCV-PE[BR:PE:CSF2:08]	HQ393463	
Rio Grande do sul	#RS9	BamHI		Pernambuco[Brazil:Rio grande do Sul:Mariana Pimentel1:2009]	SPLCV-PE[BR:RS:MP1:09]	HQ393464	
Rio Grande do sul	#RS9	SacI		Pernambuco[Brazil:Rio Grande do Sul:Mariana Pimentel2:2009]	SPLCV-PE[BR:RS:MP2:09]	HQ393465	
Rio Grande do sul	#RS24	SacI		Pernambuco[Brazil:Rio Grande do Sul:Mariana Pimentel4:2009]	SPLCV-PE[BR:RS:MP4:09]	HQ393466	
Rio Grande do sul	#RS29	BamHI		Pernambuco[Brazil:Rio Grande do Sul:Mariana Pimentel5:2009]	SPLCV-PE[BR:RS:MP5:09]	HQ393467	
Rio Grande do sul	#RS33	BamHI		Pernambuco[Brazil:Rio Grande do Sul:Mariana Pimentel6:2009]	SPLCV-PE[BR:RS:MP6:09]	HQ393468	
Rio Grande do sul	#RS52	BamHI		Pernambuco[Brazil:Rio Grande do Sul:Mariana Pimentel7:2009]	SPLCV-PE[BR:RS:MP7:09]	HQ393469	
Rio Grande do sul	#RS52	SacI		Pernambuco[Brazil:Rio Grande do Sul:Mariana Pimentel3:2009]	SPLCV-PE[BR:RS:MP3:09]	HQ393470	
SPEGB	#171	BamHI		SPGVV <sup>c</sup>	Paraiba[Brazil:Bahia:Cruz das Almas:2008]	SPGVV-PB[BR:BA:CA:08]	HQ393444
SPEGB	#184	SacI			Rondonia[Brazil:Bahia:Utinga:2008]	SPGVV-RO[BR:BA:Uti:08]	HQ393447
SPEGB	#325	SacI			Rondonia[Brazil:Rondonia:Porto Velho1:2008]	SPGVV-RO[BR:RO:PV1:08]	HQ393452
SPEGB	#337	EcoRV			Rondonia[Brazil:Rondonia:Ouro Preto do Oeste:2008]	SPGVV-RO[BR:RO:OPO:08]	HQ393454
SPEGB	#346	EcoRV			Rondonia[Brazil:Rondonia:Porto Velho2:2008]	SPGVV-RO[BR:RO:PV2:08]	HQ393457
SPEGB	#370	BamHI			Rondonia[Brazil:Rondonia:Cacoal:2008]	SPGVV-RO[BR:RO:Cac:08]	HQ393459
SPEGB	#184	SpeI		SPLCESV <sup>d</sup>	[Brazil:Bahia:Utinga:2008]	SPLCESV-[BR:BA:Uti:08]	HQ393448
SPEGB	#370	BamHI			[Brazil:Rondonia:Cacoal:2008]	SPLCESV-[BR:RO:Cac:08]	HQ393458

<sup>a</sup> Sweet potato Embrapa Germplasm Bank

<sup>b</sup> Sweet potato leaf curl virus

<sup>c</sup> Sweet potato golden vein virus

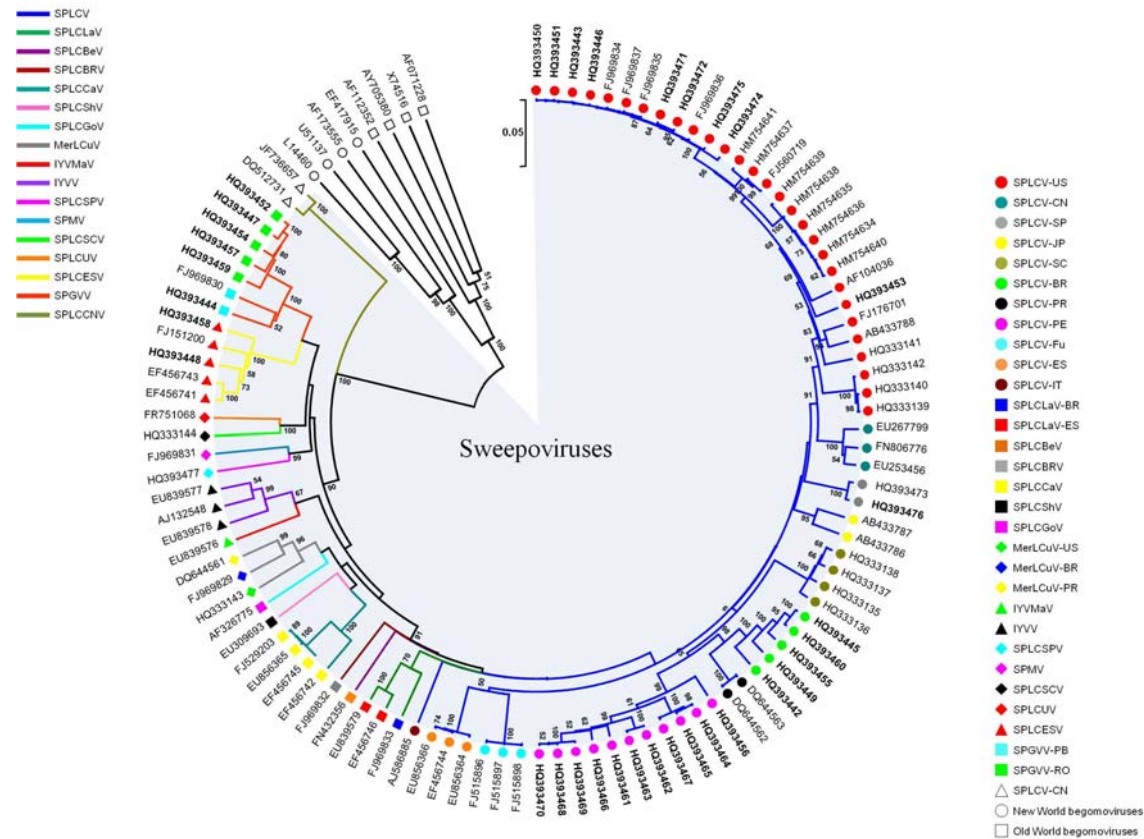
<sup>d</sup> Sweet potato leaf curl Spain virus



**Tabela 2 Sequência dos sweepovírus usados neste estudo**

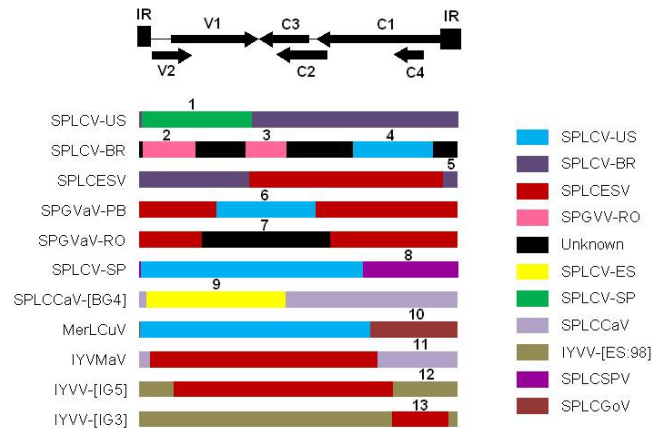
Espécie-estirpe	Nº de acesso	Disponível no GenBank	Origem	Referência	Acronônimo sugerido neste estudo <sup>a</sup>
SPLCV-US	FJ969834	SPLCV-RS2[BR:Est1]	Brazil	Paprotka et al., 2010	SPLCV-US[BR:RS:Est1:07]
	FJ969837	SPLCV-RS2[BR:Ros1]	Brazil	Paprotka et al., 2010	SPLCV-US[BR:RS:Ros1:07]
	FJ969835	SPLCV-RS2[BR:Mac1]	Brazil	Paprotka et al., 2010	SPLCV-US[BR:RS:Mac1:07]
	FJ969836	SPLCV-RS2[BR:Poa1]	Brazil	Paprotka et al., 2010	SPLCV-US[BR:RS:Poa1:07]
	HM754641	SPLCV-[Haenam1]	South Korea	GenBank	SPLCV-US[KR:Hae1:09]
	HM754637	SPLCV-[Yeooju 507]	South Korea	GenBank	SPLCV-US[KR:Yeo507:09]
	FJ560719	SPLCKrV-[J-508]	South Korea	GenBank	SPLCV-US[KR:Yeo:08]
	HM754639	SPLCV-[Haenam532]	South Korea	GenBank	SPLCV-US[KR:Hae532:09]
	HM754638	SPLCV-[Haenam 519-3]	South Korea	GenBank	SPLCV-US[KR:Hae519:09]
	HM754635	SPLCV-[Yeooju 388]	South Korea	GenBank	SPLCV-US[KR:Yeo388:09]
	HM754636	SPLCV-[Nonsan 445-2]	South Korea	GenBank	SPLCV-US[KR:Non445-2:09]
	HM754634	SPLCV-[Chungju 263]	South Korea	GenBank	SPLCV-US[KR:Chu263:09]
	HM754640	SPLCV-[Haenam 618-2]	South Korea	GenBank	SPLCV-US[KR:Hae618:09]
	AF104036	SPLCV-US[US:Low:94]	USA	Lotrakul & Valverde, 1999	SPLCV-US[US:Low:94]
	FJ176701	SPLCV-[Eastern China]	China	GenBank	SPLCV-US[CN:Jia:08]
	AB433788	SPLCV-[Japan:Kyoto:1998]	Japan	GenBank	SPLCV-US[JR:Kyo:98]
	HQ333141	SPLCV-[US:MS:WS1-4]	USA	Zhang & Ling, 2011	SPLCV-US[US:MS:WS1-4:07]
	HQ333142	SPLCV-[US:MS:WS3-8]	USA	Zhang & Ling, 2011	SPLCV-US[US:MS:WS3-8:07]
	HQ333140	SPLCV-[US:MS:4B-14]	USA	Zhang & Ling, 2011	SPLCV-US[US:MS:4b-14:07]
	HQ333139	SPLCV-[US:MS:1B-1A]	USA	Zhang & Ling, 2011	SPLCV-US[US:MS:1b-1a:07]
SPLCV-CN	EU267799	SPLCV-[RL7]	China	GenBank	SPLCV-CN[CN:Yn:RL7:06]
	FN806776	SPLCV-[Y338]	China	GenBank	SPLCV-CN[CN:Yn338:09]
	EU253456	SPLCV-[RL31]	China	GenBank	SPLCV-CN[CN:Yn:RL31:07]
SPLCV-SP	HQ393473	SPLCV-SP[BR:AlvM:09]	Brazil	Albuquerque et al., 2011	SPLCV-SP[BR:SP:AlvM:09]
SPLCV-JP	AB433787	SPLCV-[Japan:Kumamoto:1998]	Japan	GenBank	SPLCV-JP[JR:Kum:98]
	AB433786	SPLCV-[Japan:Miyazaki:1996]	Japan	GenBank	SPLCV-JP[JR:Miy:96]
SPLCV-SC	HQ333138	SPLCV-[US:SC:646B-11]	USA	Zhang & Ling, 2011	SPLCV-SC[US:SC:646-B11:06]
	HQ333137	SPLCV-[US:SC:634-7]	USA	Zhang & Ling, 2011	SPLCV-SC[US:SC:634-7:06]
	HQ333135	SPLCV-[US:SC:377-23]	USA	Zhang & Ling, 2011	SPLCV-SC[US:SC:377-23:06]
	HQ333136	SPLCV-[US:SC:634-2]	USA	Zhang & Ling, 2011	SPLCV-SC[US:SC:634-2:06]
SPLCV-PR	DQ644563	SPLCV-[N4]	Puerto Rico	GenBank	SPLCV-PR[PR:Me-N4:06]
	DQ644562	SPLCV-[PR80-N2]	Puerto Rico	GenBank	SPLCV-PR[PR:80-N2:06]
SPLCV-Fu	FJ515898	SPLCV-[Fp-3]	China	Yang et al., 2009	SPLCV-Fu[CN:Fj:Fp3:07]
	FJ515897	SPLCV-[Fp-2]	China	Yang et al., 2009	SPLCV-Fu[CN:Fj:Fp2:07]
	FJ515896	SPLCV-[Fp-1]	China	Yang et al., 2009	SPLCV-Fu[CN:Fj:Fp1:07]
SPLCV-ES	EU856364	SPLCV-ES[ES:CI:BG12:02]	Spain	Lozano et al., 2009	SPLCV-ES[ES:CI:BG12:02]
	EF456744	SPLCV-ES[ES:CI:BG6:02]	Spain	Lozano et al., 2009	SPLCV-ES[ES:CI:BG6:02]
	EU856366	SPLCV-ES[ES:CI:BG13:02]	Spain	Lozano et al., 2009	SPLCV-ES[ES:CI:BG13:02]
SPLCV-IT	AJ586885	SPLCV-IT[IT:Sic:02]	Italy	Briddon et al., 2005	SPLCV-IT[IT:Sic:02]
SPLCLaV-BR	FJ969833	SPLCV-RS1[BR:Tav1]	Brazil	Paprotka et al., 2010	SPLCLaV-BR[BR:RS:Tav1:07]
SPLCLaV-ES	EF456746	SPLCLaV-[ES:CI:BG27:02]	Spain	Lozano et al., 2009	SPLCLaV-ES[ES:CI:BG27:02]
	EU839579	SPLCLaV-[ES:Mal:BG30:06]	Spain	Lozano et al., 2009	SPLCLaV-ES[ES:Mal:BG30:06]
SPLCBeV	FN432356	SPLCBV-[India:West Bengal:2008]	India	GenBank	SPLCBeV-[IN:WB:08]
SPLCBrV	FJ969832	SPLCV-CE[BR:For1]	Brazil	Paprotka et al., 2010	SPLCBrV-[BR:CE:For1:07]
SPLCCaV	EF456742	SPLCCaV-[ES:CI:BG4:02]	Spain	Lozano et al., 2009	SPLCCaV-[ES:CI:BG4:02]
	EF456745	SPLCCaV-[ES:CI:BG7:02]	Spain	Lozano et al., 2009	SPLCCaV-[ES:CI:BG7:02]
	EU856365	SPLCCaV-[ES:CI:BG21:02]	Spain	Lozano et al., 2009	SPLCCaV-[ES:CI:BG21:02]
	FJ529203	SPLCCaV-[ES:CI:BG25:02]	Spain	Lozano et al., 2009	SPLCCaV-[ES:CI:BG25:02]
SPLCShV	EU309693	SPLCV	China	GenBank	SPLCShV-[CN:Sha:07]
SPLCGoV	AF326775	SPLCGV-[16]	USA	Lotrakul et al., 2003	SPLCGoV-[US:Geo:16]
MerLCuV-US	HQ333143	SPGVaV-[US:MS:1B-3]	USA	Zhang & Ling, 2011	MerLCuV-US[US:MS:1B-3:07]
MerLCuV-BR	FJ969829	SPGVaV-PA[BR:Bel1]	Brazil	Paprotka et al., 2010	MerLCuV-BR[BR:PA:Bel1:07]
MerLCuV-PR	DQ644561	MeLCV-[PR:N1]	Puerto Rico	GenBank	MeLCuV-PR[PR:N1:06]
IYVMaV	EU839576	IYVV-[ES:Mal:IG1:06]	Spain	Lozano et al., 2009	IYVMaV-[ES:Mal:IG1:06]
IYVV	EU839578	IYVV-[ES:Mal:IG5:06]	Spain	Lozano et al., 2009	IYVV-[ES:Mal:IG5:06]
	AJ132548	IYVV-[ES:98]	Spain	Banks et al., 1999	IYVV-[ES:98]
	EU839577	IYVV-[ES:Mal:IG3:06]	Spain	Lozano et al., 2009	IYVV-[ES:Mal:IG3:06]
SPLCSPV	HQ393477	SPLCSPV-[BR:AlvM:09]	Brazil	Albuquerque et al., 2011	SPLCSPV-[BR:SP:AlvM:09]
SPMV	FJ969831	SPMaV-[BR:BSB1]	Brazil	Paprotka et al., 2010	SPMV-[BR:BSB1:07]
SPLCSCV	HQ333144	SPLCSCV-[US:SC:648B-9]	USA	Zhang & Ling, 2011	SPLCSCV-[US:SC:648-B9:06]
SPLCUV	FR751068	SPLCUV-[UG:KAMP:08]	Uganda	Wasswa et al., 2011	SPLCUV-[UG:KAMP:08]
SPLCESV	EF456741	SPLCESV-[ES:CI:BG1:02]	Spain	Lozano et al., 2009	SPLCESV-[ES:CI:BG1:02]
	EF456743	SPLCESV-[ES:CI:BG5:02]	Spain	Lozano et al., 2009	SPLCESV-[ES:CI:BG5:02]
	FJ151200	SPLCESV-[ES:Mal:IG2:06]	Spain	Lozano et al., 2009	SPLCESV-[ES:Mal:IG2:06]
SPGVV-PB	FJ969830	SPGVaV-PB1[BR:Sou1]	Brazil	Paprotka et al., 2010	SPGVV-PB[BR:PB:Sou1:07]
SPLCCNV	DQ512731	SPLCV-[CN]	China	Luan et al., 2007	SPLCCNV-[CN:05]
	JF736657	SPLCV-B3	China	GenBank	SPLCCNV-[CN:Zhe:10]

<sup>a</sup> Nomes completos dos vírus são mostrados na Additional file 2



**Figura 1** Árvore filogenética UPGMA (1000 repetições) baseada no alinhamento múltiplo de sequências completas de sweepovírus descritas neste trabalho (negrito) e aquelas disponíveis no banco de dados públicos. Acrônimos são descritos na Tabela 2. Sequências representativas de begomovírus são incluídas do Novo Mundo (L14460, *Tomato mottle virus*: ToMoV-[US:Flo:89]; U51137, *Abutilon mosaic virus*: AbMV-[US:Haw]; AF173555, *Bean golden yellow mosaic virus*: BGYMV-[MX:Chi] and EF417915, *Tomato yellow vein streak virus*: ToYVSV-[BR:Ba3]) e Velho Mundo (AF112352, *African cassava mosaic virus*: ACMV-[CM:98]; AY705380, *Cotton leaf curl Burewala virus*: CLCuBuV-[IN:Ban:04]; X74516, AYVV-SG[SG:92] e AF071228, *Tomato yellow leaf curl virus*: TYLCV-Mdl[ES:72:97]). A barra indica o número de substituições por sítio. Valores de “bootstrap” >50% estão indicados.

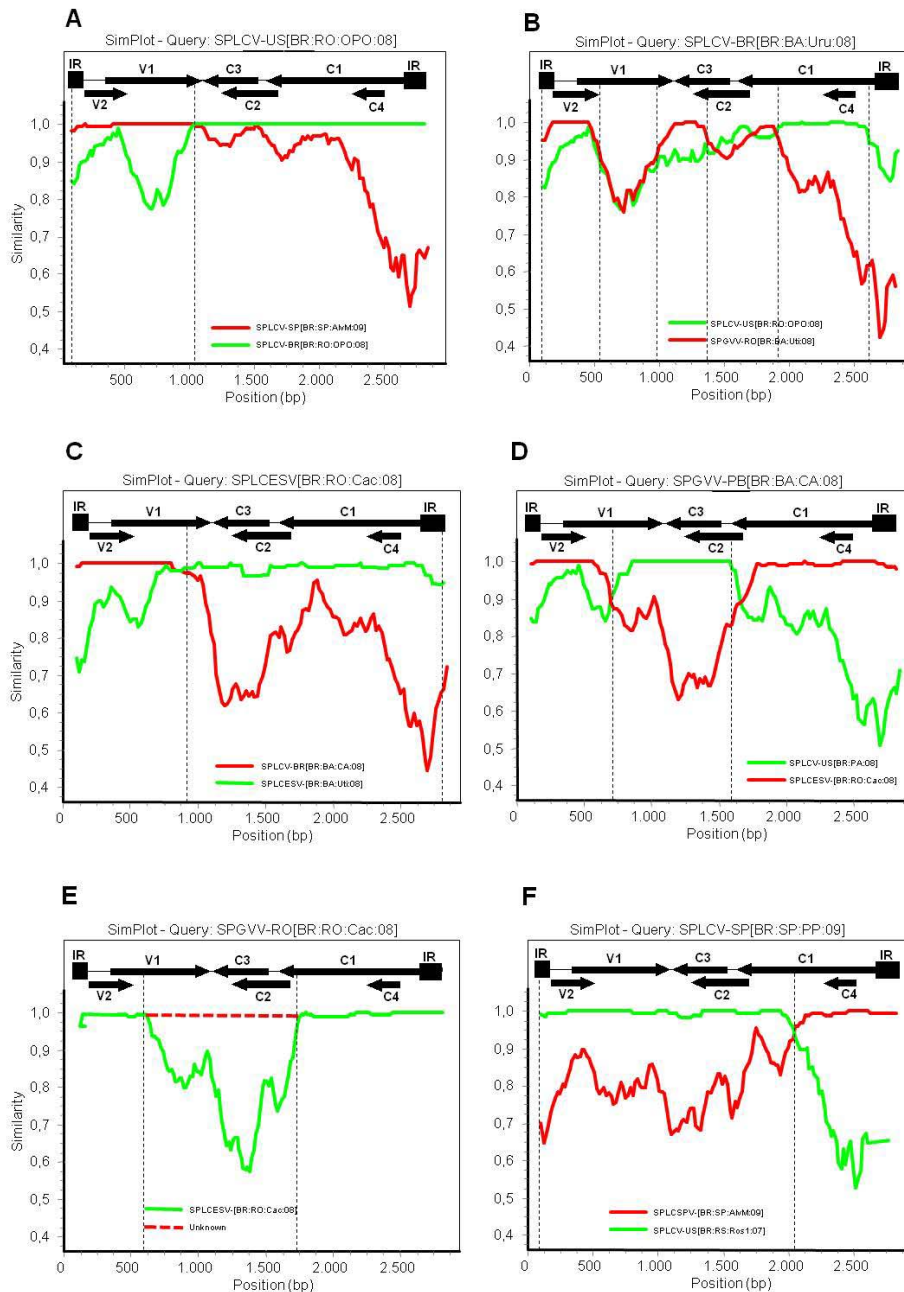
**A**



**B**

Evento	Recombinante	Maior Parental (% identidade)	Menor Parental (% identidade)	Pontos de Recombinação		Métodos	"P-value"
				Início (ORF)	Fim (ORF)		
1	SPLCV-US[BR.RO.OPO:08]	SPLCV-BR[BR.OPO:08] (99.9)	SPLCV-SP[BR.AlvM:09] (99.8)	37 (IR)	1006 (V1)	RGEMCST	2.8 x 10 <sup>-19</sup>
	58 (IR)			523 (V1)			
2	SPLCV-BR[BR.BA.Uru:08]	Unknown	SPGVV-RO[BR.BA.Uti:08] (>97.4)	45 (IR)	541 (V1)	RGEMCST	7.6 x 10 <sup>-09</sup>
	SPLCV-BR[BR.BA.CA:08]			58 (IR)	524 (V1)		
	SPLCV-BR[BR.RO.Cac:08]			45 (IR)	541 (V1)		
3	SPLCV-BR[BR.BA.Uru:08]	Unknown	SPGVV-RO[BR.BA.Uti:08] (99.2)	955 (V1)	1325 (C2/C3)	RGEMCST	2.7 x 10 <sup>-23</sup>
4	SPLCV-BR[BR.BA.Uru:08]	Unknown	SPLCV-US[BR.RO.OPO:08] (99.6)	1926 (C1)	2614 (C1)	RGEMCST	1.1 x 10 <sup>-38</sup>
	SPLCV-BR[BR.BA.CA:08]						
	SPLCV-BR[BR.RO.Cac:08]						
5	SPLCESV-[BR.RO.Cac:08]	SPLCESV-[BR.BA.Uti:08] (97.8)	SPLCV-BR[BR.BA.CA:08] (99.4)	2770 (IR)	994 (V1)	RGEMCST	6.7 x 10 <sup>-41</sup>
6	SPGVV-PB[BR.BA.CA:08]	SPLCESV-[BR.RO.Cac:08] (99.3)	SPLCV-US[BR.PA:08] (100)	698 (V1)	1589 (C2)	RGEMCST	2.6 x 10 <sup>-48</sup>
7	SPGVV-RO[BR.RO.Cac:08]	SPLCESV-[BR.RO.Cac:08] (99.6)	Unknown	581 (V1)	1727 (C1)	RGEMCST	6.1 x 10 <sup>-50</sup>
	SPGVV-RO[BR.RO.PV2:08]						
	SPGVV-RO[BR.RO.OPO:08]						
	SPGVV-RO[BR.BA.Uti:08]						
8	SPLCV-SF[BR.SP.AlvM:09]	SPLCV-US[BR.RS.Ros1:07] (99.8)	SPLCSPV-[BR.SP.AlvM:09] (99.7)	2007 (C1)	24 (IR)	RGEMCST	4.7 x 10 <sup>-47</sup>
	SPLCV-SF[BR.SP.PP:09]						
9	SPLCCaV-[ES.CIBG4:06]	SPLCCaV-[ES.CIBG25:02] (99.8)	SPLCV-ES[ES.CIBG6:02] (99.8)	84 (V2)	1349 (C2/C3)	RGEMCST	2.4 x 10 <sup>-15</sup>
10	MerLCuV-US[US.MS.1B-3:07]	SPLCV-US[US.MS.WS1-4:07] (97.5)	SPLCGoV-[US.Geo16] (97.3)	2081 (C1)	13 (IR)	RGEMCST	3.2 x 10 <sup>-34</sup>
11	IYVMaV-[ES.Mal.IG1:06]	SPLCESV-[ES.Mal.IG2:06] (99.7)	SPLCCaV-[ES.CIBG4:02] (97.4)	2186 (C1)	96 (IR)	RGEMCST	5.7 x 10 <sup>-61</sup>
12	IYVV[ES.Mal.IG5:06]	SPLCESV-[ES.CIBG5:02] (98.8)	IYVV-[ES:98] (97)	2247 (C1/C4)	325 (V1/V2)	RGEMCST	1.6 x 10 <sup>-37</sup>
13	IYVV-[ES.Mal.IG3:06]	IYVV-[ES:98] (98.8)	SPLCESV-[ES.CIBG5:02] (99)	2230 (C1/C3)	2748 (IR)	RGEMCST	2.8 x 10 <sup>-48</sup>

**Figura 2** Representação esquemática dos eventos de recombinação (A) e detalhes dos pontos de recombinação (B) detectados em sweepvírus. A organização genômica típica dos sweepvírus é mostrada no topo da figura. Cada genoma é representado pelo retângulo colorido de acordo com o isolado. Os números indicam os eventos de recombinação descritos em B. R,G,B,M,C,S e T indicam a detecção pelos métodos RDP, GENCONV, BOOTSCAN, MAXCHI, CHIMAERA, SISCAN e 3SEQ, respectivamente, sendo que aquele de maior p-value está destacado em negrito.



**Figura 3** Evidência de eventos de recombinação nos sweepovírus brasileiros. (A) SPLCV-US[BR:RO:OPO:08], (B) SPLCV-BR[BR:BA:Uru:08], (C) SPLCESV-[BR:RO:Cac:08], (D) SPGVV-PB[BR:BA:CA:08], (E) SPGVV-RO[BR:RO:Cac:08] e (F) SPLCV-SP[BR:SP:PP:09]. Análises com SimPlot foram feitas com o alinhamento das sequências completas usando 200bp, Step 20bp, GapStrip no método Kimura (2-parameter). Os pontos de recombinação são mostrados pelas linhas verticais.

## 6. LITERATURA CITADA

ALBUQUERQUE, L.C.; INOUE-NAGATA, A.K.; PINHEIRO, B.; RIBEIRO SDA, G.; RESENDE, R.O.; MORIONES, E. & NAVAS-CASTILLO, J. 2011. A novel monopartite begomovirus infecting sweet potato in Brazil. *Archives of Virology* 156:1291-1294

ARGUELLO-ASTORGA, G.R.; GUEVARA-GONZALEZ, R.G.; HERRERA-ESTRELLA, L.R. & RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. 1994. Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: A model for replication. *Virology* 203:90-100

ARGÜELLO-ASTORGA, G.R. & RUIZ-MEDRANO, R. 2001. An iteron-related domain is associated to Motif 1 in the replication proteins of geminiviruses: identification of potential interacting amino acid-base pairs by a comparative approach. *Archives of Virology* 146:1465-1485

BANKS, G.K.; BEDFORD, I.D.; BEITIA, F.J.; RODRIQUEZ-CEREZO, E. & MARKHAM, P.G. 1999. A novel geminivirus of *Ipomoea indica* (*Convolvulaceae*) from southern Spain. *Plant Disease* 83:486

BONI, M.F.; POSADA, D. & FELDMAN, M.W. 2007. An exact nonparametric method for inferring mosaic structure in sequence triplets. *Genetics* 176:1035-1047

BRIDDON, R.; PATIL, B.; BAGEWADI, B.; NAWAZ-UL-REHMAN, M. & FAUQUET, C. 2010. Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. *BMC Evolutionary Biology* 10:97

BRIDDON, R.W.; BEDFORD, I.D.; TSAI, J.H. & MARKHAM, P.G. 1996. Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, *Tomato pseudo-curly top virus*, suggests a recombinant origin. *Virology* 219:387-394

BRIDDON, R.W.; BULL, S.E. & BEDFORD, I.D. 2006. Occurrence of *Sweet potato leaf curl virus* in Sicily. *Plant Pathology* 55:286-286

CLARK, C.A.; DAVIS, J.A.; ABAD, J.A.; CUELLAR, W.J.; FUENTES, S.; KREUZE, J.F.; GIBSON, R.W.; MUKASA, S.B.; TUGUME, A.K.; TAIRO, F.D. & VALKONEN, J.P.T. 2011. Sweetpotato Viruses: 15 Years of Progress on Understanding and Managing Complex Diseases. *Plant Disease* 96:168-185

CLARK, C.A. & HOY, M.W. 2006. Effects of common viruses on yield and quality of beauregard sweet potato in Louisiana. *Plant Disease* 90:83-88

DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15

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

FAOSTAT. FAO Statistical Databases [<http://faostat.fao.org/>].

FAUQUET, C.M.; BISARO, D.M.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; HARRISON, B.D.; RYBICKI, E.P.; STENGER, D.C. & STANLEY, J. 2003. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family *Geminiviridae*, and an updated list of begomovirus species. *Archives of Virology* 148:405-421

FAUQUET, C.M.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; MORIONES, E.; STANLEY, J.; ZERBINI, M. & ZHOU, X. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology* 153:783-821

FUENTES, S. & SALAZAR, L.F. 2003. First report of *Sweet potato leaf curl virus* in Peru. *Plant Disease* 87:98-98

GARCIA-ANDRES, S.; MONCI, F.; NAVAS-CASTILLO, J. & MORIONES, E. 2006. Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: Evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature. *Virology* 350:433-442

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

GIBBS, M.J.; ARMSTRONG, J.S. & GIBBS, A.J. 2000. Sister-Scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics* 16:573-582

HARRISON, B.D. 1985. Advances in geminivirus research. *Annual Review of Phytopathology* 23:55-82

HIGGINS, D.G.; BLEASBY, A.J. & FUCHS, R. 1992. Clustal V - improved software for multiple sequence alignment. *Computer Applications in the Biosciences* 8:189-191

INOUE-NAGATA, A.K.; ALBUQUERQUE, L.C.; ROCHA, W.B. & NAGATA, T. 2004. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi29 DNA polymerase. *Journal of Virological Methods* 116:209-211

JESKE, H.; LUETGEMEIER, M. & PREISS, W. 2001. DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of *Abutilon mosaic virus*. *EMBO Journal* 20:6158-6167

LEFEUVRE, P.; LETT, J.M.; REYNAUD, B. & MARTIN, D.P. 2007a. Avoidance of protein fold disruption in natural virus recombinants. *Plos Pathogens* 3:e181

LEFEUVRE, P.; LETT, J.M.; VARSANI, A. & MARTIN, D.P. 2009. Widely conserved recombination patterns among single-stranded DNA viruses. *Journal of Virology* 83:2697-2707

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

LOLE, K.S.; BOLLINGER, R.C.; PARANJAPE, R.S.; GADKARI, D.; KULKARNI, S.S.; NOVAK, N.G.; INGERSOLL, R.; SHEPPARD, H.W. & RAY, S.C. 1999. Full-length *Human immunodeficiency virus* type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *Journal of Virology* 73:152-160

LOTRAKUL, P. & VALVERDE, R.A. 1999. Cloning of a DNA-A-like genomic component of sweet potato leaf curl virus: nucleotide sequence and phylogenetic relationships. *Molecular Plant Pathology* Online: <http://www.bspp.org.uk/mppol/1999/0422lotrakul/index.htm>

LOTRAKUL, P.; VALVERDE, R.A.; CLARK, C.A. & FAUQUET, C.M. 2003. Properties of a begomovirus isolated from sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) infected with *Sweet potato leaf curl virus*. *Revista Mexicana de Fitopatologia* 21:128-136

LOTRAKUL, P.; VALVERDE, R.A.; CLARK, C.A.; SIM, J. & DE LA TORRE, R. 1998. Detection of a geminivirus infecting sweet potato in the United States. *Plant Disease* 82:1253-1257

LOZANO, G.; TRENADO, H.P.; VALVERDE, R.A. & NAVAS-CASTILLO, J. 2009. Novel begomovirus species of recombinant nature in sweet potato (*Ipomoea batatas*) and *Ipomoea indica*: taxonomic and phylogenetic implications. *Journal of General Virology* 90:2550-2562

LUAN, Y.S.; ZHANG, J. & AN, L.J. 2006. First report of *Sweet potato leaf curl virus* in China. *Plant Disease* 90:1111

LUAN, Y.S.; ZHANG, J.; LIU, D.M. & LI, W.L. 2007. Molecular characterization of sweet potato leaf curl virus isolate from China (SPLCV-CN) and its phylogenetic relationship with other members of the *Geminiviridae*. *Virus Genes* 35:379-385



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

MARTIN, D.P.; POSADA, D.; CRANDALL, K.A. & WILLIAMSON, C.A. 2005. A modified bootscan algorithm for automated identification of recombinant sequence and recombination breakpoints. *AIDS Research and Human Retroviruses* 21:98-102

MARTIN, D.P. & RYBICKI, E.P. 2000. RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics* 15:562-563

MONCI, F.; SANCHEZ-CAMPOS, S.; NAVAS-CASTILLO, J. & MORIONES, E. 2002. 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* 303:317-326.

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

OWOR, B.E.; MARTIN, D.P.; SHEPHERD, D.N.; EDEMA, R.; MONJANE, A.L.; RYBICKI, E.P.; THOMSON, J.A. & VARSANI, A. 2007. Genetic analysis of maize streak virus isolates from Uganda reveals widespread distribution of a recombinant variant. *Journal of General Virology* 88:3154-3165

PADIDAM, M.; BEACHY, R.N. & FAUQUET, C.M. 1996. The role of AV2 ("Precoat") and coat protein in viral replication and movement in tomato leaf curl geminivirus. *Virology* 224:390-404

PADIDAM, M.; SAWYER, S. & FAUQUET, C.M. 1999. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265:218-225.

PAPROTKA, T.; BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N.; RESENDE, R.O.; JESKE, H.; FARIA, J.C. & RIBEIRO, S.G. 2010. Genomic diversity of sweet potato geminiviruses in a Brazilian germplasm bank. *Virus Research* 149:224-233

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

POSADA, D. & CRANDALL, K.A. 2002. The effect of recombination on the accuracy of phylogeny estimation. *Journal of Molecular Evolution* 54:396-402

PRASANNA, H.C. & RAI, M. 2007. Detection and frequency of recombination in tomato-infecting begomoviruses of South and Southeast Asia. *Virology Journal* 4:111

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

SANZ, A.I.; FRAILE, A.; GARCIA-ARENAL, F.; ZHOU, X.; ROBINSON, D.J.; KHALID, S.; BUTT, T. & HARRISON, B.D. 2000. Multiple infection, recombination and genome relationships among begomovirus isolates found in cotton and other plants in Pakistan. *Journal of General Virology* 81:1839-1849.

SMITH, J.M. 1992. Analyzing the mosaic structure of genes. *Journal of Molecular Evolution* 34:126-129

STANLEY, J.; BISARO, D.M.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; FAUQUET, C.M.; HARRISON, B.D.; RYBICKI, E.P. & STENGER, D.C. 2005. Family *Geminiviridae*. In: Fauquet C.M.; Mayo M.A.; Maniloff J.; Desselberger U.; Ball L.A. (eds) *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp 301-326

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M. & KUMAR, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum

likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731-2739

TRENADO, H.P.; ORÍLIO, A.F.; MÁRQUEZ-MARTÍN, B.; MORIONES, E. & NAVAS-CASTILLO, J. 2011. Sweepviruses cause disease in sweet potato and related *Ipomoea* spp.: fulfilling Koch's postulates for a divergent group in the genus *Begomovirus*. *PLoS One* 6:e27329

UMAHARAN, P.; PADIDAM, M.; PHELPS, R.H.; BEACHY, R.N. & FAUQUET, C.M. 1998. Distribution and diversity of geminiviruses in Trinidad and Tobago. *Phytopathology* 88:1262-1268

VALVERDE, R.A.; CLARK, C.A. & VALKONEN, J.P.T. 2007. Viruses and virus disease complexes of sweetpotato. *Plant Viruses* 1:116-126

VARADARAJAN, G. & PRAKASH, C. 1991. A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from the sweet potato and its related species. *Plant Molecular Biology Reporter* 9:6-12

WASSWA, P.; OTTO, B.; MARUTHI, M.N.; MUKASA, S.B.; MONGER, W. & GIBSON, R.W. 2011. First identification of a sweet potato begomovirus (sweepovirus) in Uganda: characterization, detection and distribution. *Plant Pathology* 60:1030-1039

ZHANG, S.C. & LING, K.S. 2011. Genetic diversity of sweet potato begomoviruses in the United States and identification of a natural recombinant between *Sweet potato leaf curl virus* and *Sweet potato leaf curl Georgia virus*. *Archives of Virology* 156:955-968

## CONCLUSÕES GERAIS

Doenças causadas por membros da família *Geminiviridae* têm causado significativas perdas em diversas culturas em várias regiões do mundo. No Brasil, as begomoviroses representam a totalidade dos relatos de doenças causadas por membros dessa família. Após a introdução do biótipo B da mosca-branca (*B. tabaci*) várias espécies de begomovírus foram descritas afectando culturas de importância econômica, assim como espécies de plantas daninhas. Neste trabalho foi apresentado um estudo de diversidade de begomovírus em duas culturas de importância econômica e social para o país, o tomateiro e a batateira-doce.

Em tomateiro, os resultados apresentados mostram que algumas espécies de begomovírus (TMoLCV, TGVV e ToSRV) são predominantes em algumas regiões do país e que, embora, a frequência de observação de novos begomovírus descritos esteja diminuindo ainda é possível encontrar novas espécies (ToICV). Foi demonstrado também que uma dessas espécies predominantes apresenta uma estirpe recombinante (TMoLCV-DF) que aparentemente é mais adaptada do que a estirpe não recombinante (TMoLCV-PE), pois conseguiu se estabelecer em outras regiões. Este é um exemplo claro de que os begomovírus estão continuamente evoluindo por meio de mecanismos de variabilidade genética, especialmente a recombinação. É provável que a migração do cultivo para novas regiões e a introdução de genótipos resistentes sejam fatores que contribuam para o surgimento de linhagens virais mais adaptadas e futuros estudos possivelmente mostrarão o surgimento de novas espécies ou estirpes infectando tomateiro no Brasil. Portanto, estudos de diversidade genética devem ser contínuos para identificar as espécies de begomovírus mais relevantes. Este é, sem dúvida, um passo importante no desenvolvimento de estratégias de controle.

Em batateira-doce, esse estudo mostrou uma diversidade genética de sweepovírus no banco de germoplasma e no campo e também a importância da recombinação na evolução desses vírus. O acúmulo viral, favorecido pela propagação vegetativa da batateira-doce,

resulta em eventos de recombinação responsáveis pelo surgimento de espécies e estirpes de sweepovírus. Aqui, foram identificadas várias novas estirpes, uma nova espécie e variantes, além de vários eventos de recombinação. É provável que essa alta diversidade genética esteja associada à rápida evolução desses vírus favorecida pelo tipo de reprodução da batateira-doce. Portanto, é extremamente importante que o material utilizado na propagação seja de boa qualidade fitossanitária para evitar um elevado grau de degenerescência da cultura. A obtenção de materiais livres de vírus, através do cultivo *in vitro* de ápices caulinares para viabilizar a limpeza clonal de plantas infectadas tem se mostrado uma das estratégias mais promissoras no controle dessas e de outras viroses.

# ANEXOS

---

---

**ANEXO 1:** Porcentagens de identidade nucleotídica entre as sequências completas do DNA-A dos 18 isolados apresentados neste estudo e os begomovirus mais representativos.

	TMoLCV-DF <sup>a</sup>				TMoLCV-PE <sup>b</sup>		ToICV-PE <sup>c</sup>		TGVV-DF <sup>d</sup>						ToSRV-MG				Sequência de bancos de dados <sup>e</sup>								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
1.BR:PADFM:04	100																										
2.BR:PA2143:04	99,4	100																									
3.BR:Turv2911:04	98,9	99,4	100																								
4.BR:Turv2904:04	98,6	99,0	99,3	100																							
5.BR:Juaz2586:04	90,3	90,3	90,1	89,8	100																						
6.BR:Bez2665:04	90,6	90,9	90,8	90,4	94,3	100																					
7.BR:Mdc2681:04	74,9	75,2	75,2	74,6	75,9	75,9	100																				
8.BR:BSF2729:04	74,5	75,0	74,7	74,5	75,8	75,6	96,6	100																			
9.BR:Ita1220:03	72,9	73,0	73,0	72,3	71,6	72,4	71,5	72,0	100																		
10.BR:Taq1613:03	70,5	73,7	73,6	73,0	72,6	72,7	72,7	73,1	97,8	100																	
11.BR:Pip1670:03	70,5	73,7	73,6	73,0	72,4	72,7	72,5	73,1	97,7	99,4	100																
12.BR:Pip1719:03	72,6	72,8	72,7	70,5	71,7	72,5	72,2	72,8	97,5	99,6	99,1	100															
13.BR:Pip1799:03	70,6	73,2	73,8	73,2	72,7	72,9	72,7	73,1	97,7	99,8	99,3	99,5	100														
14.BR:Arag3043:04	72,4	72,7	72,6	72,0	71,5	72,9	72,2	72,7	98,1	98,2	98,1	98,0	98,1	100													
15.BR:Ind2857:04	70,5	70,3	70,2	69,8	69,4	70,8	74,3	74,3	71,3	70,9	70,8	70,7	71,0	71,3	100												
16.BR:Pip1696:03	70,6	70,6	70,4	69,8	70,1	70,5	73,9	74,1	71,3	71,1	71,0	70,9	71,8	70,7	99,2	100											
17.BR:Pip1792:03	70,5	70,3	70,2	69,8	70,2	70,9	73,9	73,9	71,4	71,8	71,5	71,5	71,8	70,8	99,1	99,2	100										
18.BR:AIG3032:04	70,5	70,5	70,2	69,8	69,2	70,4	74,2	74,2	71,2	71,6	71,4	70,8	71,7	70,6	99,2	99,2	99,2	100									
19.ToCMoV-BA	<b>77,6</b>	<b>77,6</b>	<b>77,6</b>	<b>77,2</b>	<b>75,6</b>	<b>75,4</b>	<b>85,0</b>	<b>84,0</b>	71,8	71,9	71,8	71,5	71,9	69,1	74,1	73,8	73,8	73,9	100								
20.ToCMoV-MG	75,5	76,4	76,3	76,0	73,6	74,8	83,6	83,5	69,8	69,9	70,0	69,7	70,0	67,4	73,3	73,1	72,8	73,1	90,7	100							
21.ToYVSV	73,1	74,1	74,0	72,8	73,6	73,4	72,6	73,3	<b>87,5</b>	<b>88,0</b>	<b>88,0</b>	<b>87,7</b>	<b>88,1</b>	<b>87,8</b>	71,9	71,9	72,0	71,9	72,3	71,1	100						
22.TGMV	69,6	69,0	69,0	68,5	69,9	69,1	69,6	70,4	70,9	72,6	72,5	71,8	72,6	72,8	76,4	76,4	76,5	76,5	69,7	67,9	73,0	100					
23.ToRMV	70,8	70,8	70,4	69,7	71,3	70,7	77,8	77,6	69,1	68,9	68,9	69,3	68,9	68,7	85,6	85,4	85,5	85,4	80,7	82,3	69,6	73,9	100				
24.ToSRV-MG	69,2	69,7	69,5	69,0	69,7	70,2	72,1	72,3	69,9	71,0	70,8	70,3	71,1	70,2	<b>95,9</b>	<b>96,0</b>	<b>96,3</b>	<b>95,9</b>	73,3	72,2	71,1	75,4	85,2	100			
25.ToYSV	69,8	69,5	69,5	69,1	70,6	70,3	71,2	71,1	69,2	69,5	69,7	69,3	69,4	69,2	75,2	74,8	75,0	75,1	69,6	69,0	70,2	74,0	73,1	74,2	100		
26.PSLDV	74,8	74,9	75,0	74,3	74,9	73,6	72,7	72,2	68,4	69,3	69,0	67,5	69,3	68,8	69,1	69,1	69,9	69,7	73,9	72,6	69,5	69,4	69,7	68,3	66,4	100	

<sup>a-d</sup> Novas espécies e estirpes propostas, <sup>a</sup>Tomato mottle leaf curl virus-Distrito Federal, <sup>b</sup>TMoLCV-Pernambuco, <sup>c</sup>Tomatointerveinalchlorosis virus-Pernambuco, <sup>d</sup>Tomato golden vein virus-Distrito Federal

<sup>e</sup> Nomes completos e os números de acesso no GenBank são mostrados na Figura 1.

Os valores dentro dos retângulos com borda entre sequências relacionadas indicam identidade nucleotídica >89%. As maiores porcentagens de identidade para os isolados estão em negrito.

**ANEXO 2** Porcentagens de identidade nucleotídica (nt) e de aminoácido (aa) deduzido entre BR:PADFM:04 e os begomovírus mais representativos do Brasil

	DNA-A	DNA-B	Rep		Trap		Ren		AC4		CP		MP		NSP	
			nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa
BR:Pip1799:03	70,6	54,8	76,9	79,8	75,1	65,1	78,7	76,5	82,6	63,5	77,6	76,9	69,3	81,2	67,7	68,4
BR.BSF2729:04	74,5	na <sup>a</sup>	79,5	84,9	74,4	67,4	76,4	72,0	86,7	74,2	80,4	76,5	na	na	na	na
ToCMoV-BA	77,6	78,1	80,5	85,2	72,1	65,9	76,7	72,7	89,1	78,4	82,9	76,5	86,5	93,5	88,3	89,5
ToCMoV-MG	75,5	82,5	78,6	84,3	72,3	66,7	76,4	69,7	85,7	71,1	80,8	74,1	92,5	92,2	87,8	85,9
ToYYSV	73,1	56,0	76,2	81,2	76,7	64,3	77,2	77,3	80,3	66,0	78,5	75,7	70,4	81,2	68,0	69,9
TGMV	69,6	50,6	71,8	75,2	77,7	69,0	76,4	75,8	68,6	51,7	79,6	76,5	73,0	81,9	64,9	68,8
ToRMV	70,8	52,6	70,2	73,5	74,1	70,5	76,9	69,7	66,3	13,4	82,8	76,9	68,7	80,9	63,9	65,2
ToSRV	69,2	52,3	68,7	72,9	74,4	68,2	79,2	75,0	64,8	44,8	80,2	74,9	69,3	81,2	64,3	65,6
ToYSV	69,8	53,3	70,9	72,9	74,4	69,8	76,9	75,0	na	na	82,1	76,5	68,4	78,5	64,5	68,5
PSLDV	74,8	82,1	82,1	86,6	76,2	69,0	77,9	78,8	91,2	83,5	78,2	84,1	68,1	79,9	67,3	71,1

<sup>a</sup> Indisponível/não aplicável

**ANEXO 3** Porcentagens de identidade nucleotídica (nt) e de aminoácido (aa) deduzido entre BR:Pip1799:03 e os begomovírus mais representativos do Brasil

	DNA-A	DNA-B	Rep		Trap		Ren		AC4		CP		MP		NSP	
			nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa
BR.BSF2729:04	73,1	na <sup>a</sup>	75,2	79,8	75,4	72,9	81,7	79,5	80,6	63,5	80,2	89,1	na	na	na	na
ToCMoV-BA	71,9	51,4	75,2	78,3	70,8	67,4	80,2	78,8	81,8	64,7	79,3	86,6	67,5	78,8	66,8	67,6
ToCMoV-MG	70,0	52,0	73,3	77,5	69,5	65,1	79,2	77,3	79,1	61,2	77,3	83,8	66,7	76,5	63,8	62,9
ToYYSV	88,1	74,3	86,5	90,2	89,2	88,4	91,7	89,4	93,0	81,2	90,7	96,8	89,2	94,9	82,5	83,6
TGMV	72,6	55,6	71,9	74,7	80,8	76,0	82,2	81,1	74,8	62,4	82,9	94,3	76,8	82,9	72,6	74,6
ToRMV	68,9	57,4	69,4	73,0	71,8	70,5	79,7	76,5	77,5	14,1	78,8	86,6	74,4	81,6	73,5	73,8
ToSRV	71,1	57,1	68,8	71,5	75,6	64,3	82,2	78,8	73,6	52,9	80,1	87,9	73,9	81,6	73,2	74,6
ToYSV	69,4	53,3	70,6	73,5	76,7	72,1	78,7	79,5	na	na	78,1	88,3	69,2	77,8	69,0	74,2
PSLDV	69,3	54,1	73,6	78,2	72,3	63,6	76,2	77,3	82,9	63,5	74,5	84,6	72,6	78,5	67,3	76,2

<sup>a</sup> Indisponível/não aplicável

**ANEXO 4** Porcentagens de identidade nucleotídica (nt) e de aminoácido (aa) deduzido entre BR.BSF2729:04 e os begomovírus mais representativos do Brasil

	DNA-A	DNA-B <sup>a</sup>	Rep		Trap		Ren		AC4		CP	
			nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa
ToCMoV-BA	84,0	-	87,7	90,0	89,0	84,5	88,2	87,9	90,1	79,4	86,1	94,0
ToCMoV-MG	83,5	-	89,2	92,0	87,7	82,2	87,7	86,4	92,2	85,6	84,3	91,2
ToYYSV	73,3	-	75,9	80,9	76,4	70,5	81,2	82,6	81,0	69,1	80,1	89,1
TGMV	70,4	-	70,8	76,4	75,1	67,4	78,4	77,3	69,3	54,0	78,9	89,9
ToRMV	77,6	-	73,0	78,3	89,0	84,5	90,0	90,2	64,8	11,3	87,7	94,4
ToSRV	72,3	-	69,7	74,1	77,7	75,2	82,2	78,8	64,3	42,5	81,3	92,0
ToYSV	71,1	-	71,6	74,9	76,7	71,3	79,7	78,0	na <sup>b</sup>	na	81,5	91,2
PSLDV	72,2	-	71,6	84,0	75,6	69,0	76,4	73,5	85,0	73,2	76,6	84,1

<sup>a</sup> Sequência do DNA-B indisponível

<sup>b</sup> Não aplicável



**ANEXO 5** Iterons (diretos I, II e II; e invertido IV) e os correspondentes domínios relacionados aos iterons da região 5' terminal do gene Rep (Rep IRD) dos sweepovírus. As cores seguem como descrito na figura de Lozano *et al.* (2009): Grupo formado por IYVV, SPLCV-ES e SPLCV-IT (azul); SPLCV-US[Lou:24] (rosa); SPLCLaV (amarelo); e SPLCESV (verde). Os três iterons e os três Rep IDRs apresentados neste estudo são mostrados em negrito. Este anexo pode ser consultado em <http://www.virologyj.com/xxxxxxx> como additional file 1 (Open Access).

**ANEXO 6** Informações dos sweepovírus. Nomes completos e a representação colorida da porcentagem de identidade nucleotídica das sequências completas dos isolados de sweepovírus descritos aqui e os disponíveis no GenBank. Os isolados apresentados neste estudo são mostrados em negrito. Devido ao tamanho do arquivo esse anexo pode ser consultado em <http://www.virologyj.com/xxxxxxx> como additional file 2 (Open Access).

**ANEXO 7** ALBUQUERQUE, L.; VARSANI, A.; FERNANDES, F.; PINHEIRO, B.; MARTIN, D.; DE TARSO OLIVEIRA FERREIRA, P.; LEMOS, T. & INOUE-NAGATA, A. 2012. Further characterization of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology* 157:747-752

**ANEXO 8** ALBUQUERQUE, L.C.; INOUE-NAGATA, A.K.; PINHEIRO, B.; RIBEIRO SDA, G.; RESENDE, R.O.; MORIONES, E. & NAVAS-CASTILLO, J. 2011. A novel monopartite begomovirus infecting sweet potato in Brazil. *Archives of Virology* 156:1291-1294

**ANEXO 9** ALBUQUERQUE, L.C.; INOUE-NAGATA, A.K.; PINHEIRO, B.; RESENDE, R.O.; MORIONES, E. & NAVAS-CASTILLO, J. 2011. Genetic diversity and recombination analysis of sweepoviruses from Brazil. Artigo aceito para publicação na revista *Virology Journal*.

SPLCV-PR[BR_CA_08]	GCCATTTGGTGACTCTCAGACTTTCAAAT-GAATTGGTG--ACTGGTGAC	2716
SPLCV-PR[BR_Cac_08]	GCCATTTGGTGACTCTCAGACTTTCAAAT-GAATTGGTG--ACTGGTGAC	2716
SPLCV-PR[BR_Ria_08]	GCCATTTGGTGACTCTCAGACTTTCAAAT-GAATTGGTG--ACTGGTGAC	2716
SPLCV-PR[BR_OPO_08]	GCCATTTGGTGACTCTCAGACTTTCAAAT-GAATTGGTG--ACTGGTGAC	2716
SPLCV-PR[BR_Uru_08]	GCCATTTGGGAGACAACCCTAGTTCAAAT-GAATTGGAG--ACTGGAGAC	2715
SPLCV-PE[BR_Cau1_09]	GCCATTTGGGAGACAATCAATAAATCAAAT-GAATTGGAG--ACTGGAGAC	2716
SPLCV-PE[BR_Cau2_09]	GCCATTTGGGAGACAATCAATAAATCAAAT-GAATTGGAG--ACTGGAGAC	2716
SPLCV-PE[BR_MP7_09]	GCCATTTGGGAGACAATCACTAGTTCAAAT-GAATTGGAG--ACTGGAGAC	2715
SPLCV-PE[BR_MP3_09]	GCCATTTGGGAGACAATCACTAGTTCAAAT-GAATTGGAG--ACTGGAGAC	2715
SPLCV-PE[BR_MP6_09]	GCCATTTGGGAGACAATCACTAGTTCAAAT-GAATTGGAG--ACTGGAGAC	2715
SPLCV-PE[BR_MP4_09]	GCCATTTGGGAGACAATCACTAGTTCAAAT-GAATTGGAG--ACTGGAGAC	2716
SPLCV-PE[BR_PF_09]	GCCATTTGGGAGACAATCATAAATTTCAAAT-GAATTGGAG--ACTGGAGAC	2717
SPLCV-PE[BR_MP1_09]	GCCATTTGGTGACTCTCATACTTTCAAAT-GAATTGGTG--ACTGGTGAC	2717
SPLCV-PE[BR_MP2_09]	GCCATTTGGTGACTCTCATACTTTCAAAT-GAATTGGTG--ACTGGTGAC	2717
SPLCV-PE[BR_MP5_09]	GCCATTTGGTGACTGATACTTTCAAAT-GAATTGGTG--ACTGGTGAC	2716
SPLCV-PE[BR_PV_08]	GCCATTTGGTGACTCTCAGACTTTCAAATGAATTGGTG--ACTGGTGAC	2717
SPLCV-US[BR_OPO_08]	GCCATTTGGTGACTCTCAGACTTTCAAAT-GAATTGGTG--ACTGGTGAC	2717
SPLCV-US[BR_CA1_08]	GCCATTTGGGAGACACGCATAAGTTCAAAT-GAATTGGAG--ACTGGAGAC	2717
SPLCV-US[BR_PA_08]	GCCATTTGGGAGACACGCATAAGTTCAAAT-GAATTGGAG--ACTGGAGAC	2717
SPLCV-US[BR_CA2_08]	GCCATTTGGGAGACACGCATAAGTTCAAAT-GAATTGGAG--ACTGGAGAC	2717
SPLCV-US[BR_PV_08]	GCCATTTGGGAGACACGCATAAGTTCAAAT-GAATTGGAG--ACTGGAGAC	2717
SPLCV-US[BR_AM1_09]	GCCATTTGGGAGACACGCATAAGTTCAAAT-GAATTGGAG--ACTGGAGAC	2717
SPLCV-US[BR_AM2_09]	GCCATTTGGGAGACACGCATAAGTTCAAAT-GAATTGGAG--ACTGGAGAC	2717
SPLCV-US[BR_AM3_09]	GCCATTTGGGAGACACGCATAAGTTCAAAT-GAATTGGAG--ACTGGAGAC	2717
SPLCV-US[BR_AM4_09]	GCCATTTGGGAGACACGCATAAGTTCAAAT-GAATTGGAG--ACTGGAGAC	2717
SPLCV-US[BR_AM3_09]	GCCATTTGGGAGACACGCATAAGTTCAAAT-GAATTGGAG--ACTGGAGAC	2715
SPLCV-SP[BR_PP_09]	GTCAAATGGGTGG-ACACAAAACTCTATATGAATTGGTGGAAAGGGTGGAC	2733
<b>SPGVaV-RO[BR_Uti_08]</b>	ATCAAATGGGTGG-ACACACAAACTCTATATGAATTGGTGGAAAGGGTGGGC	2730
<b>SPGVaV-RO[BR_PV1_08]</b>	AGCTAATGGGTGG-ACACACAAACTCTATATGAATTGGTGGAAAGGGTGGAC	2731
SPGVaV-RO[BR_Cac_08]	AGCAAATGGGTGG-ACACACAAACTCTATATGAATTGGTGGAAAGGGTGGAC	2730
SPGVaV-RO[BR_OPO_08]	AGCAAATGGGTGG-ACACACAAACTCTATATGAATTGGTGGAAAGGGTGGAC	2730
SPGVaV-RO[BR_PV2_08]	AGCAAATGGGTGG-ACACACAAACTCTATATGAATTGGTGGAAAGGGTGGAC	2730
<b>SPLCESV-BA[BR_Uti_08]</b>	ATCAAATGGGTGG-ACACACAAACTCTATATGAATTGGTGGAAAGGGTGGGC	2675
SPLCESV-BA[BR_Cac_08]	AGCAAATGGGTGG-ACACACAAACTCTATATGAATTGGTGGAAAGGGTGGAC	2714
SPGVaV-PB1[BR_CA_08]	AGCAAATGGGTGG-ACACACAAACTCTATATGAATTGGTGGAAAGGGTGGAC	2730
	. *::: *:*.* * * :. *::: *::: *::: * * * * *	

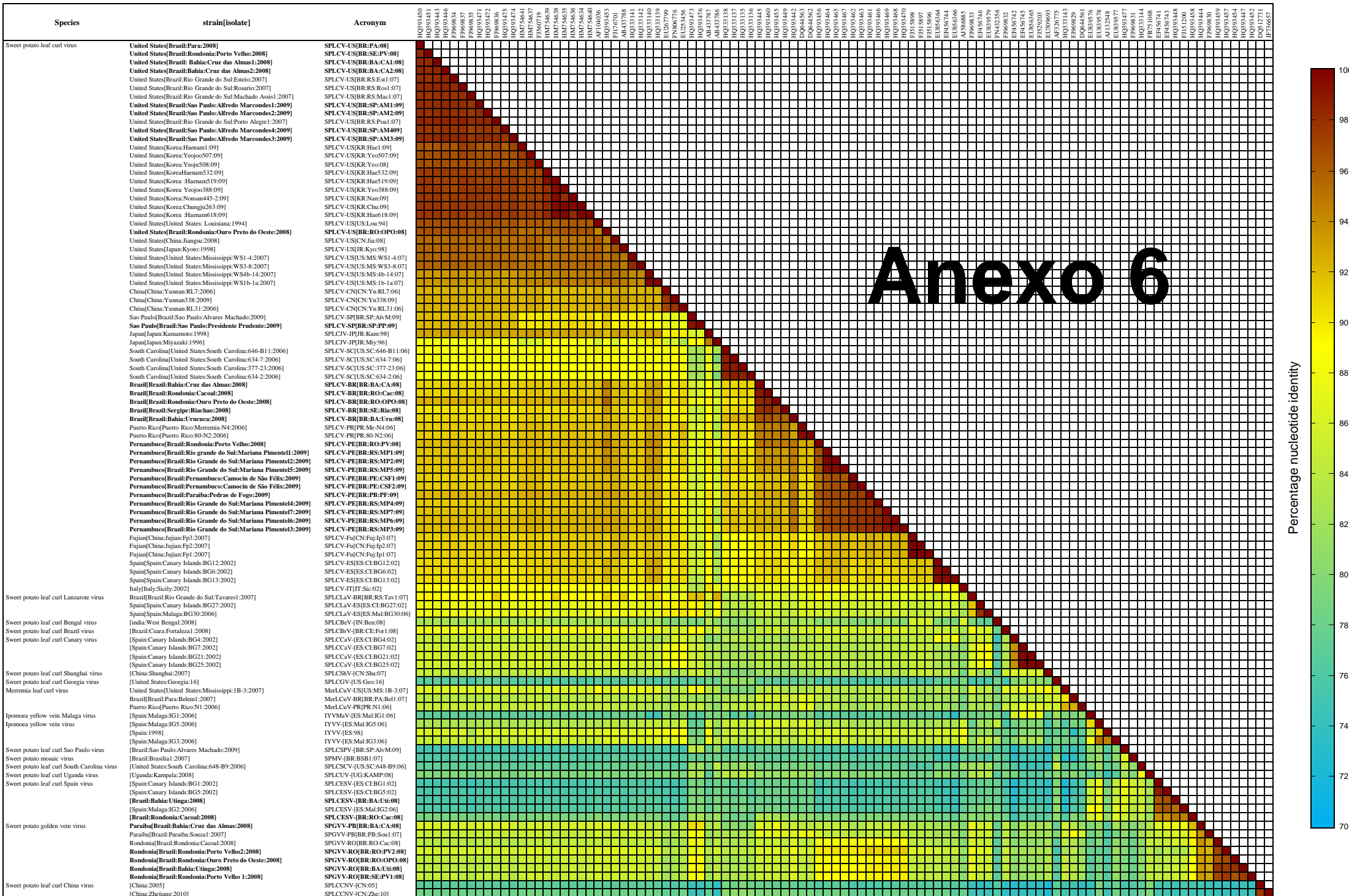
# Anexo 5

SPLCV-PR[BR_CA_08]	AATTTATACTATGTCACCAAATGGCATTTTGGTAATTTAGAAGATCCTTT	2766	MAPPKRFRIS
SPLCV-PR[BR_Cac_08]	AATTTATACTATGTCACCAAATGGCATTTTGGTAATTTAGAAGATCCTTT	2766	MAPPKRFRIS
<b>SPLCV-PR[BR_Ria_08]</b>	AATTTATACTATGTCACCAAATGGCATTTTGGTAATTTAGAAGATCCTTT	2766	<b>MATPKRFRIS</b>
SPLCV-PR[BR_OPO_08]	AATTTATACTATGTCACCAAATGGCATTTTGGTAATTTAGAAGATCCTTT	2766	MAPPKRFRIS

Rep IRD

SPLCV-PR[BR_Uru_08]	AATATATAGTATGTCTCCAAATGGCATT	TTTGGTAATTTAGAAGATCCTTT	2765	MAPPKRFKIQ
SPLCV-PE[BR_Cau1_09]	AATATATAGTATGTCTCCAAATGGCATT	TTTGGTAATTTAGAAGATCCTTT	2766	MAPPKRFKIQ
SPLCV-PE[BR_Cau2_09]	AATATATAGTATGTCTCCAAATGGCATT	TTTGGTAATTTAGAAGATCCTTT	2766	MAPPKRFKIQ
SPLCV-PE[BR_MP7_09]	AATATATAGTATGTCTCCAAATGGCATT	TTTGGTAATTTAGAAGATCCTTT	2765	MAPPKRFKIQ
SPLCV-PE[BR_MP3_09]	AATATATAGTATGTCTCCAAATGGCATT	TTTGGTAATTTAGAAGATCCTTT	2765	MAPPKRFKIQ
SPLCV-PE[BR_MP6_09]	AATATATAGTATGTCTCCAAATGGCATT	TTTGGTAATTTAGAAGATCCTTT	2765	MAPPKRFKIQ
SPLCV-PE[BR_MP4_09]	AATATATAATATGTCTCCAAATGGCATT	TTTGGTAATTTAGAAGATCCTTT	2766	MAPPKRFKIQ
SPLCV-PE[BR_PF_09]	AATATATAGTATGTCTCCAAATGGCATT	TTTGGTAATTTAGAAGATCCTTT	2767	MAPPKRFKIQ
SPLCV-PE[BR_MP1_09]	AATTTATACTATGTCACCAAATGGCATT	TTTGGTAATTTAGAAGATCCTTT	2767	MAPPKRFKIQ
SPLCV-PE[BR_MP2_09]	AATTTATACTATGTCACCAAATGGCATT	TTTGGTAATTTAGAAGATCCTTT	2767	MAPPKRFKIQ
SPLCV-PE[BR_MP5_09]	AATTTATACTATGTCACCAAATGGCATT	TTTGGTAATTTAGAAGATCCTTT	2766	MAPPKRFKIQ
SPLCV-PE[BR_PV_08]	AATTTATACTATGTCACCAAATGGCATT	TTTGGTAATTTAGAAGATCCTTT	2767	MAPPKRFKIQ
SPLCV-US[BR_OPO_08]	AATTTATACTATGTCACCAAATGGCATT	TTTGGTAATTTAGAAGATCCTTT	2767	MAPPKRFKIQ
SPLCV-US[BR_CA1_08]	AATATATAGTATGTCTCCAAATGGCATT	CTGGTAATTTAGAAGATCCTTT	2767	MAPPKRFKIQ
SPLCV-US[BR_PA_08]	AATATATAGTATGTCTCCAAATGGCATT	CTGGTAATTTAGAAGATCCTTT	2767	MAPPKRFKIQ
<b>SPLCV-US[BR_CA2_08]</b>	AATATATAGTATGTCTCCAAATGGCATT	CTGGTAATTTAGAAGATCCTTT	2767	<b>MAPPNRFKIQ</b>
SPLCV-US[BR_PV_08]	AATATATAGTATGTCTCCAAATGGCATT	CTGGTAATTTAGAAGATCCTTT	2767	MAPPKRFKIQ
SPLCV-US[BR_AM1_09]	AATATATAGTATGTCTCCAAATGGCATT	CTGGTAATTTAGAAGATCCTTT	2767	MAPPKRFKIQ
SPLCV-US[BR_AM2_09]	AATATATAGTATGTCTCCAAATGGCATT	CTGGTAATTTAGAAGATCCTTT	2767	MAPPKRFKIQ
SPLCV-US[BR_AM3_09]	AATATATAGTATGTCTCCAAATGGCATT	CTGGTAATTTAGAAGATCCTTT	2767	MAPPKRFKIQ
SPLCV-US[BR_AM4_09]	AATATATAGTATGTCTCCAAATGGCATT	CTGGTAATTTAGAAGATCCTTT	2765	MAPPKRFKIQ
SPLCV-SP[BR_PP_09]	AATTTATATGTGTCCACCAAATGGCAA	ATTGGTAATTTAG--GTA	2781	MPRAGRFNIN
SPGVaV-RO[BR_Uti_08]	AATTTATATGTGTCCACCTAATGGCATT	TTTGGTAATTAG-----AA	2771	MPRAGRFNIN
SPGVaV-RO[BR_PV1_08]	AATTTATATGTGTCCACCTAATGGCATT	TTTGGTAATTAG-----AA	2772	MPRAGRFNIN
SPGVaV-RO[BR_Cac_08]	AATATATATGTGTCCACCTAATGGCATT	TTTGGTAATTAG-----AA	2771	MPRAGRFNIN
SPGVaV-RO[BR_OPO_08]	AATTTATATGTGTCCACCTAATGGCATT	TTTGGTAATTAG-----AA	2771	MPRAGRFNIN
SPGVaV-RO[BR_PV2_08]	AATTTATATGTGTCCACCTAATGGCATT	TTTGGTAATTTAGAAGATCCTTT	2780	MPRAGRFNIN
<b>SPLCESV-BA[BR_Uti_08]</b>	AATTTATATGTGTCCCACCTAATGGCATT	TTTGGTAATTAG-----AA	2716	MPRAGRFNIN
SPLCESV-BA[BR_Cac_08]	AATATATATGTGTCCACCTAATGGCATT	TTTGGTAATTAG-----AA	2755	MPRAGRFNIN
SPGVaV-PB1[BR_CA_08]	AATTTATATGTGTCCACCTAATGGCATT	TTTGGTAATTAG-----AA	2771	MPRAGRFNIN

\*\*\*:\*\*\*\* : \*:::\*\*\*\*\*: \* \*\*\*\*\*:



## Further characterization of tomato-infecting begomoviruses in Brazil

Leonardo C. Albuquerque · Arvind Varsani · Fernanda R. Fernandes ·  
Bruna Pinheiro · Darren P. Martin · Paulo de Tarso Oliveira Ferreira ·  
Thaís Oliveira Lemos · Alice K. Inoue-Nagata

Received: 1 September 2011 / Accepted: 29 November 2011  
© Springer-Verlag 2012

**Abstract** Tomato cultivation in Brazil is threatened by a number of tomato-infecting viruses belonging to the genus *Begomovirus* of the family *Geminiviridae*. Here, we report the full DNA-A sequences of three Brazilian begomoviruses: a potentially new tomato-infecting viruses, tomato interveinal chlorosis virus (ToICV), and two previously proposed begomoviruses for which only partial DNA-A sequences are available in the databases: tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV) and tomato golden vein virus (TGVV). The complete sequences of the DNA-B components of TMoLCV and TGVV and the DNA-A components of a number of tomato severe rugose virus variants are also presented. Collectively, all of the analyzed sequences were phylogenetically clustered within the two major groups of Brazilian tomato-infecting begomoviruses.

The sequences reported in this paper have been deposited in the GenBank under the accession numbers JF803246-JF803265.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00705-011-1213-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

L. C. Albuquerque  
Department Fitopatologia, Universidade  
de Brasília, Brasília, DF 70910-900, Brazil

A. Varsani  
School of Biological Science, University  
of Canterbury, Christchurch 8140, New Zealand

A. Varsani  
Electron Microscope Unit, University  
of Cape Town, Cape Town 7701, South Africa

A. Varsani  
Biomolecular Interaction Centre, University  
of Canterbury, Christchurch 8140, New Zealand

Indigenous New World members of the genus *Begomovirus* of the family *Geminiviridae* are bipartite (i.e., they have two genome components) and probably arose from a single lineage [19]. These viruses infect a variety of economically important crops and are one of the main biotic constraints on agricultural production throughout the tropical and subtropical regions of the world.

Although the first reports of tomato diseases presumably caused by begomoviruses date back to the 1960s [5, 10], during the last two decades, a diverse begomovirus complex has emerged as a major threat to tomato production in Brazil. The coincidental emergence of many novel economically significant tomato-infecting begomoviruses and the spread of the B biotype of *Bemisia tabaci* throughout South America during the early 1990s was a phenomenon mirrored in many other tropical and subtropical regions of the world [16, 21]. Since the first report of tomato-infecting begomoviruses in Brazil, six begomovirus species have been described: *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato rugose*

F. R. Fernandes · B. Pinheiro · P. de Tarso Oliveira Ferreira ·  
T. O. Lemos · A. K. Inoue-Nagata (✉)  
Embrapa Vegetables, Km 09, BR060, Cx. Postal 218,  
Brasília, DF 70359-970, Brazil  
e-mail: alicenag@cnph.embrapa.br

D. P. Martin  
Computational Biology Group, Institute of Infectious Diseases  
and Molecular Medicine, University of Cape Town,  
Observatory, Anzio Rd, Cape Town 7925, South Africa

*mosaic virus* (ToRMV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), and *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) [1, 3, 8, 12, 18]. Additionally, nine partially characterized members of potential new species have been described [4, 7, 17]. The study presented here reports the identification of Brazilian begomoviruses found infecting tomatoes in Brazil in 2003 to 2004.

Total DNA from tomato samples collected from various geographic regions of Brazil and putatively infected with begomoviruses was maintained in a  $-20^{\circ}\text{C}$  freezer. The samples were screened for the presence of begomovirus DNA by PCR using the primer pair pALv1978 and pARc715 or pARc496 [20]. Based on results of comparisons of sequences of PCR-amplified DNA-A fragments (calculated using Staden 4.0 [22]), a subset of these samples were selected for further characterization. In total, we determined the complete sequences of begomovirus DNA components from 18 samples representing the range of begomovirus genetic diversity in these samples as revealed by the sequence comparisons. Most samples were collected from plants exhibiting symptoms such as interveinal chlorosis, mosaic, leaf distortion, rugosity and stunting. These eighteen samples originated from five Brazilian states: Goiás, GO ( $n = 13$ , including samples from the Federal District); Bahia, BA ( $n = 1$ ); Pernambuco, PE ( $n = 3$ ), and Minas Gerais, MG ( $n = 1$ ).

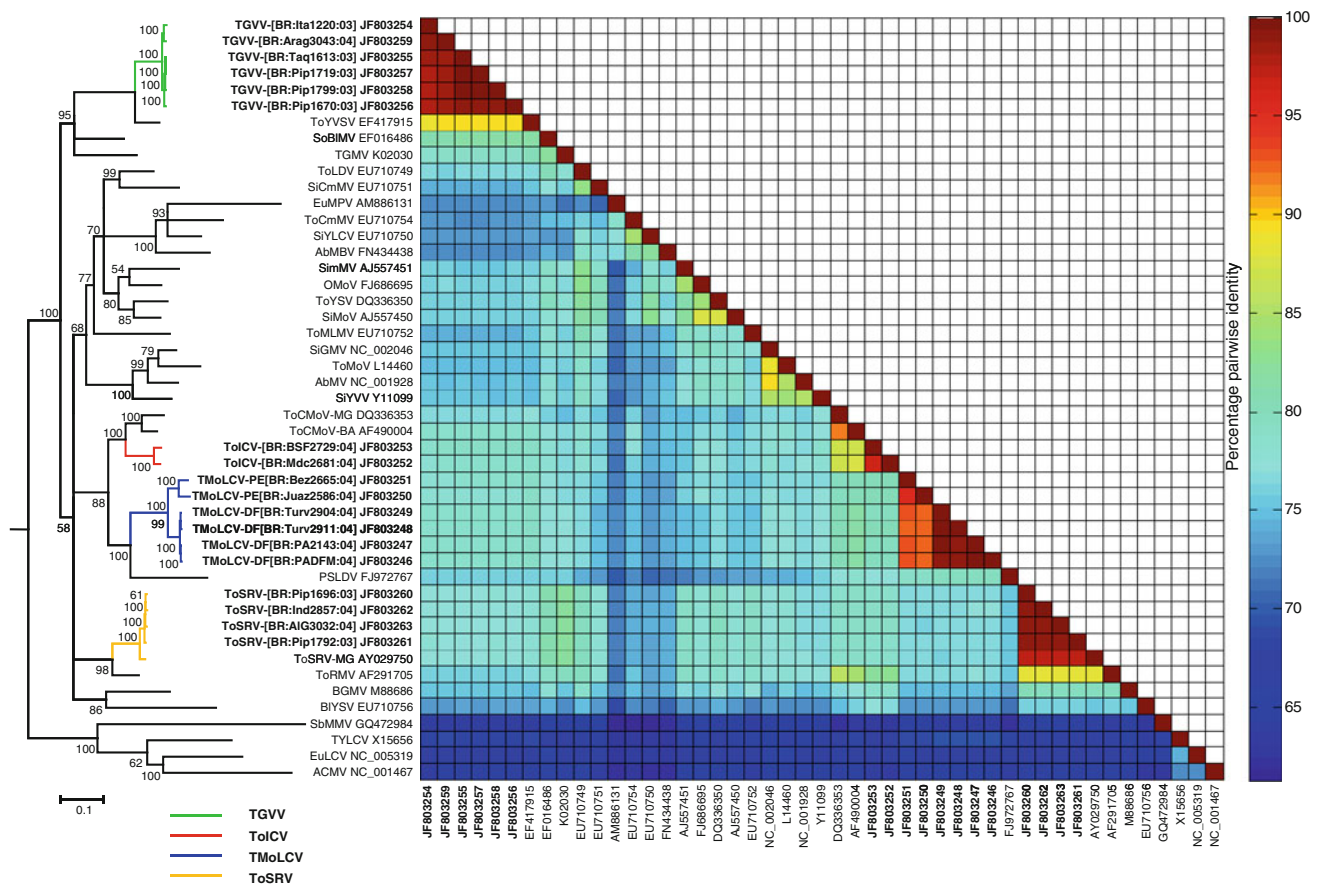
For viral full genome sequencing, cloning was carried out as described previously [14]. Briefly, total DNA was subjected to rolling-circle amplification (RCA) using  $\Phi$ -29 DNA polymerase (TempliPhi, GE Healthcare), the resulting concatamers were digested with various restriction enzymes (*Bam*HI, *Cla*I, *Eco*RV, *Sac*I or *Xba*I) to identify those that generate linear  $\sim 2.6$ -kb full-length DNA-A or DNA-B genome component, these fragments were ligated to appropriately digested pBluescript SK+ (Stratagene), and the resulting plasmids were used to transform *Escherichia coli*. One clone was selected from each transformation experiment, and the begomovirus genome components that they contained were sequenced by primer walking at Macrogen Inc. (Seoul, South Korea). Pairwise nucleotide and deduced amino acid sequence identities were determined using ClustalV [13] (which interprets alignment gaps as a fifth character state and is implemented in the program MegAlign; DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) and MEGA4 [23] (which treats alignment gaps as missing data rather than as a fifth nucleotide state). A maximum-likelihood (ML) phylogenetic tree (1000 bootstrap replicates) of the eighteen complete DNA-A sequences determined in this study together with 28 other sequences of representative New World begomovirus DNA-A components was constructed using PHYML [11] using model GTR+G4, which was chosen as the best-fit

model by RDP3 [15]. RDP3 was also used to identify recombination events in these sequences, and only one recombination event was detected.

Pairwise nucleotide sequence comparisons of the DNA-A sequences of the eighteen isolates coupled with ML phylogenetic support (Fig. 1) revealed that the sequences represented three new or partially characterized species (in accordance with the begomovirus species demarcation criteria [6]) or a previously identified species, ToSRV (Fig. 1, Table 1 and Supplementary Table S1).

The DNA-A sequence component of two isolates (BR:Mdc2681:04 and BR:BSF2729:04) shares the highest pairwise nucleotide identity (84–85%) with the DNA-A component of ToCMoV-Bahia[Brazil:Seabra1:1996] (ToCMoV-BA[BR:Sea1:96]; accession number AF490004). This results indicated that these sequences represent the DNA-A component of a member of a putative new begomovirus species, for which we propose the name Tomato interveinal chlorosis virus (ToICV). This proposal is based on the symptom most commonly observed on tomato plants in which this begomovirus component was detected.

Six other DNA-A sequences (BR:PADFM:04, BR:PA2143:04, BR:Turv2911:04, BR:Turv2904:04, BR:Juaz2586:04 and BR:Bez2665:04) had  $>89.8\%$  pairwise sequence identity among themselves, and the highest identities of 75.4 to 77.6% with the sequence of the DNA-A component of ToCMoV-BA[BR:Sea1:96]. Additionally, they share between 85.5 and 97.8% pairwise nucleotide sequence identity with the partial sequence of tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV; accession no. DQ346651), and we therefore propose that these six new sequences be considered as representing the complete DNA-A component sequences of the previously partially characterized TMoLCV. Phylogenetic analysis indicated that the TMoLCV isolates are most closely related to passionfruit severe leaf distortion virus (PSLDV)-[BR:LNS2:Pas:01] (FJ972767), a newly identified virus reported recently infecting passiflora plants in Brazil [9]. Among these TMoLCV isolates, four from Goiás (BR:PADFM:04, BR:PA2143:04, BR:Turv2911:04 and BR:Turv2904:04) are quite closely related to one another, and we have assigned these to a “TMoLCV-DF” (Distrito Federal) strain grouping. The BR:Juaz2586:04 and BR:Bez2665:04 sequences from Bahia and Pernambuco states, respectively, were closely related TMoLCV isolates (94.3% identity) and are assigned to a “TMoLCV-PE” strain designation (Fig. 1 and Supplementary Table S1). Recombination analysis showed evidence that TMoLCV-DF isolates were actually recombinants between TMoLCV-PE[BR:Bez2665:04] (major parent) and ToCMoV-[Brazil:Betim1:1996] (ToCMoV-[BR:Bet1:96], AY090557, minor parent). Recombination points were detected at positions 2257 and 16 in the DNA-A component ( $P$ -value =  $7.1 \times 10^{-24}$ ). The recombination points containing a



**Fig. 1** Maximum-likelihood phylogenetic tree with GTR+G4 selected as the best-fit model by RDP3 and pairwise sequence similarity matrix (determined with pairwise exclusion of alignment gaps) for selected, full-length DNA-A sequences. Acronyms and viruses used in the analysis are as follows: AbMBV, abutilon mosaic Brazil virus; AbMV, abutilon mosaic virus; ACMV, African cassava mosaic virus; BCTV, beet curly top virus; BGMV, bean golden mosaic virus; BIYSV, blainvillea yellow spot virus; EuLCV, euphorbia leaf curl virus; EuMPV, euphorbia mosaic Peru virus; OMoV, okra mottle virus; PSLDV, passionfruit severe leaf distortion virus; SbMMV, soybean mild mottle virus; SiCmMV, sida common mosaic virus; SiGMV, sida golden mosaic virus; SimMV, Sida

micrantha mosaic virus; SiMoV, sida mottle virus; SiYLCV, sida yellow leaf curl virus; SiYVV, sida yellow vein virus; SoBIMV, soybean blistering mosaic virus; TGMV, tomato golden mosaic virus; ToCmMV, tomato common mosaic virus; ToCMoV-BA, tomato chlorotic mottle virus-Bahia; ToCMoV-MG, tomato chlorotic mottle virus-Minas Gerais; ToLDV, tomato leaf distortion virus; ToMIMV, tomato mild mosaic virus; ToMoV, tomato mottle virus; ToRMV, tomato rugose mosaic virus; ToSRV, tomato severe rugose virus; ToYSV, tomato yellow spot virus; ToYVSV, tomato yellow vein streak virus; TYLCV, tomato yellow leaf curl virus. Accession numbers are shown in the tree. The scale bar indicates the number of substitutions per site

ToCMoV sequence were located within the Rep (replication initiator protein) and IR (intergenic region) sequences. This region is present within the previously reported partial ToMLCV sequences, and this explains why these ToMLCV full-genome sequences shared from 85.5 to 97.8% pairwise nucleotide sequence identity with those partial sequences. The highest identities were observed between sequences from isolates of the same strain, and the lowest, between those from different strains.

Six other DNA sequences (BR:Ita1220:03, BR:Taq 1613:03, BR:Pip1670:03, BR:Pip1719:03, BR:Pip1799:03 and BR:Arag3043:04) had >97% pairwise sequence identity among themselves, and between 87.5 and 88.1% identity with the sequence of DNA-A component of ToYVSV-[Ba3] (EF417915). However, these DNA-A

sequences had between 95.3 and 97.1% identity with the partially DNA-A sequence of a virus that has been provisionally named tomato golden vein virus (TGVV, accession no. AY751742). Therefore, we propose that these sequences represent the complete DNA sequences of tomato golden vein virus (TGVV).

Finally, four DNA-A sequences (BR:Ind2857:04, BR: Pip1696:03, BR:Pip1792:03 and BR:AIG3032:04) share greater than 95% pairwise genome identity with ToSRV-Minas Gerais[Brazil:Uberlandia1:2000] (accession no. AY029750) and are clearly DNA-A components of ToSRV.

All 18 DNA-A sequences clustered within the two main Brazilian tomato-infecting begomovirus groups (Fig. 1). TGVV and ToSRV appear to have largely overlapping

**Table 1** List of isolates and cloned virus components analyzed

Isolate	Region	Enzyme for cloning DNA-A/DNA-B <sup>a</sup>	Proposed name <sup>c</sup>	Acronym	Accession number DNA-A/DNA-B
BR:PADFM:04 <sup>b</sup>	DF	<i>ClaI/ClaI</i>	TMoLCV-DF[Brazil:Ponte Alta DFM:2004]	TMoLCV-DF[BR:PADFM:04]	JF803246/JF803264
BR:PA2143:04	DF	<i>ClaI</i>	TMoLCV-DF[Brazil:Ponte Alta2143:2004]	TMoLCV-DF[BR:PA2143:04]	JF803247
BR:Turv2911:04	GO	<i>ClaI</i>	TMoLCV-DF[Brazil:Turvânia2911:2004]	TMoLCV-DF[BR:Turv2911:04]	JF803248
BR:Turv2904:04	GO	<i>ClaI</i>	TMoLCV-DF[Brazil:Turvânia2904:2004]	TMoLCV-DF[BR:Turv2904:04]	JF803249
BR:Juaz2586:04	BA	<i>SacI</i>	TMoLCV-PE[Brazil:Juazeiro2586:2004]	TMoLCV-PE[BR:Juaz2586:04]	JF803250
BR:Bez2665:04	PE	<i>ClaI</i>	TMoLCV-PE[Brazil:Bezzeros2665:2004]	TMoLCV-PE[BR:Bez2665:04]	JF803251
BR:Mdc2681:04	PE	<i>XbaI</i>	ToICV-PE[Brazil:Mandacaru2681:2004]	ToICV-PE[BR:Mdc2681:04]	JF803252
BR:BSF2729:04	PE	<i>EcoRV</i>	ToICV-PE[Brazil:Belém do São Francisco2729:2004]	ToICV-PE[BR:BSF2729:04]	JF803253
BR:Ita1220:03	GO	<i>BamHI</i>	TGVV-DF[Brazil:Itaberai1220:2003]	TGVV-DF[BR:Ita1220:03]	JF803254
BR:Taq1613:03	DF	<i>BamHI</i>	TGVV-DF[Brazil:Taquara1613:2003]	TGVV-DF[BR:Taq1613:03]	JF803255
BR:Pip1670:03	DF	<i>BamHI</i>	TGVV-DF[Brazil:Pipiripau1670:2003]	TGVV-DF[BR:Pip1670:03]	JF803256
BR:Pip1719:03	DF	<i>BamHI</i>	TGVV-DF[Brazil:Pipiripau1719:2003]	TGVV-DF[BR:Pip1719:03]	JF803257
BR:Pip1799:03 <sup>b</sup>	DF	<i>BamHI/BamHI</i>	TGVV-DF[Brazil:Pipiripau1799:2003]	TGVV-DF[BR:Pip1799:03]	JF803258/JF803265
BR:Arag3043:04	MG	<i>BamHI</i>	TGVV-DF[Brazil:Araguari3043:2004]	TGVV-DF[BR:Arag3043:04]	JF803259
BR:Pip1696:03	DF	<i>XbaI</i>	ToSRV-MG[Brazil:Pipiripau1696:2003]	ToSRV-MG[BR:Pip1696:03]	JF803260
BR:Pip1792:03	DF	<i>XbaI</i>	ToSRV-MG[Brazil:Pipiripau1792:2003]	ToSRV-MG[BR:Pip1792:03]	JF803261
BR:Ind2857:04	GO	<i>XbaI</i>	ToSRV-MG[Brazil:Indiana2857:2004]	ToSRV-MG[BR:Ind2857:04]	JF803262
BR:AIG3032:04	DF	<i>XbaI</i>	ToSRV-MG[Brazil:Alexandre Gusmão3032:2004]	ToSRV-MG[BR:AIG3032:04]	JF803263

<sup>a</sup> Restriction enzyme used for cloning of the DNA-A/DNA-B components

<sup>b</sup> Isolate with cloned DNA-A and DNA-B components

<sup>c</sup> Proposed new species and strains: Tomato mottle leaf curl virus-Distrito Federal (TMoLCV-DF), Tomato mottle leaf curl virus-Pernambuco (TMoLCV-PE), Tomato interveinal chlorosis virus-Pernambuco (ToICV-PE), Tomato golden vein virus-Distrito Federal (TGVV-DF) and Tomato severe rugose virus-Minas Gerais (ToSRV-MG)

geographical ranges with TMoLCV, whereas the two ToICV sequences were only found in the state of Pernambuco.

The bipartite nature of all these begomoviruses (ToICV, TGVV, TMoLCV and ToSRV) was confirmed by PCR using pBL1v2040 and CRC2 primers [20]. As ToSRV, TMoLCV and TGVV isolates most likely are more frequently found than other begomoviruses (this study; [7]), and because the DNA-B component has already been reported for ToSRV, the isolates TMoLCV-DF[BR:PADFM:04] and TGVV-DF[BR:Pip1799:03] were chosen

for complete DNA-B component sequencing. Cloning was carried out using the restriction enzymes *ClaI* (for TMoLCV-DF[BR:PADFM:04]) and *BamHI* (for TGVV-DF[BR:Pip1799:03]) as described previously [14]. The TMoLCV-DF[BR:PADFM:04] DNA-B (2599 nucleotides) sequence shares 82.5% nucleotide identity with the DNA-B component of ToCMoV-Minas Gerais[Brazil:Igarape1:1996] (-MG[BR:Iga1:96; DQ336353]), while the TGVV-DF[BR:Pip1799:03] DNA-B (2531 nucleotides) shares 74.3% pairwise identity with that of ToYVSV-[Ba3]



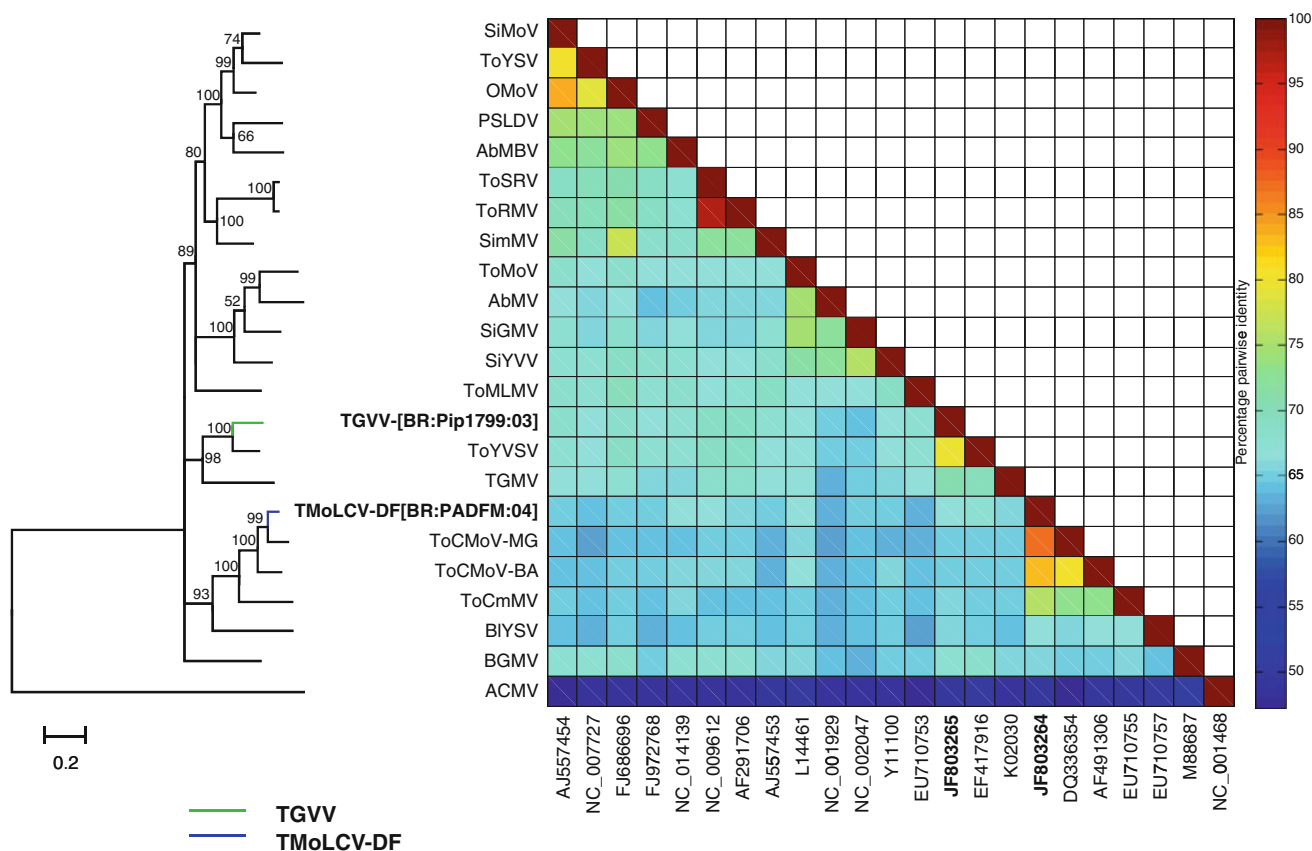
(EF417916) (Fig. 2 and Supplementary Tables S2 and S3). Analysis of the DNA-B ORFs revealed that the MP (movement protein) was highly conserved amongst the closely related Brazilian viruses used in the phylogenetic analysis (Supplementary Tables S2 and S3). The MP of isolate BR:PADFM:04 shares 93.5% pairwise amino acid identity with that of ToCMoV-BA[BR:Sea1:96], while the MP of isolate BR:Pip1799:03 shares 94.9% with that of ToYVSV-[Ba3].

All genomes had an organization typical of New World bipartite begomoviruses, with five ORFs on the DNA-A component and two ORFs on the DNA-B component. The nucleotide and deduced amino acid sequences of all ORFs of each new virus (represented by TMLCV-DF[BR:PADFM:04], TGVV-DF[BR:Pip1799:03], and ToICV-PE[BR:BSF2729:04]) were compared to representative begomoviruses from Brazil (Supplementary Tables S2-S4). The Rep (AC1) of BR:PADFM:04 and the CP (coat protein) of BR:Pip1799:03 and BR:BSF2729:04 shared the highest identity with PSLDV-[BR:LNS2:Pas:01] (86.6% amino acid

identity; FJ972767), ToYVSV-[Ba3] (96.8%) and ToRMV (94.4%), respectively.

All components (DNA-A and DNA-B) have an IR containing the conserved nonanucleotide sequence (TA-ATATT↓AC) that is typically found in the geminivirus origin of replication. The DNA-A and DNA-B components representing the isolate TMLCV-DF[BR:PADFM:04] have a common region (CR, a stretch of ~200 nucleotides with high identity between cognate DNA-A and DNA-B components of one virus species) of 165 nucleotides with 95.7% identity. The CR of the genome components of the isolate TGVV-DF[BR:Pip1799:03] is 173 nucleotides long and 94.2% identical. They have almost identical directly repeated iterons: GGGGA and GGGGT for BR:PADFM:04 and GGGGT for BR:Pip1799:03 [2], indicating that the DNA-A and DNA-B components that we have sequenced are probably cognate pairs (data not shown).

Here, tomato samples suspected of being infected with begomoviruses, collected in 2003 and 2004 from three different regions of Brazil: the northeast, central-west and



**Fig. 2** Maximum-likelihood phylogenetic tree with GTR+G4 selected as the best-fit model by RDP3 and pairwise sequence similarity matrix (determined with pairwise exclusion of alignment gaps) for selected, full-length DNA-B sequences. The same viruses

used in the DNA-A tree were used for the DNA-B tree when available. Accession numbers are shown in the tree. The scale bar indicates the number of substitution per site

southeast, were studied. The DNA-A components of these presumably bipartite begomoviruses were completely sequenced, and this confirmed the presence of various previously reported but only partially characterized begomoviruses [7, 17]. In a previous study [7], TGVV and ToSRV were predominantly found in central Brazil, whereas TMoLCV was prevalent in the northeastern region. Here, we found that TMoLCV is also fairly common in central Brazil. The TMoLCV DNA-A and DNA-B sequences are closely related to the corresponding components of ToCMoV (Figs. 1, 2).

In this paper, we have provided the full genome sequences of two of the most economically important tomato-infecting begomoviruses that were present within various geographic regions of Brazil between 2003 and 2004. Although the frequency with which new members of the genus *Begomovirus* are being discovered is decreasing, the fact that new tomato-infecting begomoviruses are still being discovered in Brazil clearly indicates that there remain undocumented begomovirus lineages. It is clear that TMoLCV, ToICV and ToCMoV are closely related. These viruses may have evolved from a common ancestor, which possibly was in the northeastern part of Brazil. ToSRV and TGVV isolates were previously reported to be the two major tomato-infecting begomoviruses in Brazil [7]. Currently, begomovirus-tolerant cultivars are widely used in Brazil, and continuous surveys will be undertaken to determine whether cultivation of these tomato genotypes will drive the emergence of resistance-breaking virus lineages.

**Acknowledgments** The authors thank Lucio Flávio Barbosa, Oneilson Medeiros de Aquino, Hamilton José Lourenço and Carolina de Mello Franco for technical assistance. AV was supported by the Carnegie Corporation of New York. This study was funded by CNPq and Embrapa. L.C.A. is sponsored by CNPq (561405/2008-5), and A.K.I.N. is a CNPq fellow.

## References

- Albuquerque LC, Martin DP, Ávila AC, Inoue-Nagata AK (2010) Tomato yellow vein streak virus, a begomovirus from Brazil. *Virus Genes* 40:140–147
- Arguëllo-Astorga GR, Ruiz-Medrano R (2001) An iteron-related domain is associated to Motif 1 in the replication proteins of geminiviruses: identification of potential interacting amino acid-base pairs by a comparative approach. *Arch Virol* 146:1465–1485
- Calegario RF, Ferreira SS, Andrade EC, Zerbini FM (2007) Characterization of Tomato yellow spot virus (ToYSV), a novel tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Braz J Agric Res* 42:1335–1343
- Castillo-Urquiza GP, Beserra JE Jr, Bruckner FP, Lima AT, Varsani A, Alfenas-Zerbini P, Zerbini MF (2008) Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in South-eastern Brazil. *Arch Virol* 153:1985–1989
- Costa AS (1976) Whitefly-transmitted plant diseases. *Ann Rev Phytopathol* 14:429–440
- Fauquet CM, Briddon RW, Brown JK, Moriones E, Stanley J, Zerbini FM, Zhou X (2008) Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Arch Virol* 153:783–821
- Fernandes FR, Albuquerque LC, Giordano LDB, Boiteux LS, de Avila AC, Inoue-Nagata AK (2008) Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes* 36:251–258
- Fernandes JJ, Carvalho MG, Andrade EC, Brommonschenkel SH, Fontes EPB, Zerbini FM (2006) Biological and molecular properties of Tomato rugose mosaic virus (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Plant Pathol* 55:513–522
- Ferreira SS, Barros DR, Almeida MR, Zerbini FM (2010) Characterization of passionfruit severe leaf distortion virus, a novel begomovirus infection passionfruit in Brazil, reveals a close relationship with tomato-infecting begomoviruses. *Plant Pathol* 59:221–230
- Flores E, Silberschmidt K, Kramer M (1960) Observações de “clorose infecciosa” das malváceas em tomateiros do campo. *Biológico* 26:65–69
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52:696–704
- Hamilton WDO, Sanders RC, Coutts RHA, Buck KW (1981) Characterization of tomato golden mosaic virus as a geminivirus. *FEMS Microbiol Lett* 11:263–267
- Higgins DG, Bleasby AJ, Fuchs R (1992) CLUSTAL V—improved software for multiple sequence alignment. *Comput Appl Biosci* 8:189–191
- Inoue-Nagata AK, Albuquerque LC, Rocha WB, Nagata T (2004) A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage  $\phi$ 29 DNA polymerase. *J Virol Methods* 116:209–211
- Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefevre P (2010) RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* 26:2462–2463
- Morales FJ (2006) History and current distribution of begomoviruses in Latin America. *Adv Virus Res* 67:127–162
- Ribeiro SG, Ambrozecius LP, Ávila AC, Bezerra IC, Calegario RF, Fernandes JJ, Lima MF, Mello RN, Rocha H, Zerbini FM (2003) Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Arch Virol* 148:281–295
- Ribeiro SG, Martin DP, Lacorte C, Simões IC, Orlandini DRS, Inoue-Nagata (2007) Molecular and biological characterization of *Tomato chlorotic mottle virus* suggests that recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses. *Phytopathology* 97:702–711
- Rojas A, Kvarneden A, Marcenaro D, Valkonen JPT (2005) Sequence characterization of Tomato leaf curl Sinaloa virus and *Tomato severe leaf curl virus*: phylogeny of New World begomoviruses and detection of recombination. *Arch Virol* 150:1281–1299
- Rojas MR, Gilbertson RL, Russell DR, Maxwell DP (1993) Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Dis* 77:340–347
- Rojas MR, Hagen C, Lucas WJ, Gilbertson RL (2005) Exploiting chinks in the plant’s armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annu Rev Phytopathol* 43:361–394
- Staden R (1996) The Staden Sequence Analysis Package. *Mol Biotechnol* 5:233–241
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596–1599

## A novel monopartite begomovirus infecting sweet potato in Brazil

Leonardo C. Albuquerque · Alice K. Inoue-Nagata ·  
Bruna Pinheiro · Simone da G. Ribeiro · Renato O. Resende ·  
Enrique Moriones · Jesús Navas-Castillo

Received: 5 March 2011 / Accepted: 30 April 2011 / Published online: 19 May 2011  
© Springer-Verlag 2011

**Abstract** The complete genome sequences of two monopartite begomovirus isolates (genus *Begomovirus*, family *Geminiviridae*) present in a single sweet potato (*Ipomoea batatas*) plant collected in São Paulo, Brazil, are presented. Based on the current taxonomic criteria for the genus *Begomovirus*, one of the isolates was shown to represent a novel species, tentatively named Sweet potato leaf curl Sao Paulo virus (SPLCSPV). The other isolate represented a new strain of sweet potato leaf curl virus, named sweet potato leaf curl virus-Sao Paulo (SPLCV-SP). The full genome sequence of the SPLCSPV isolate shared the highest nucleotide identity (87.6%) with isolates of sweet potato leaf curl Spain virus (SPLCESV). Phylogenetic and recombination analyses were used to investigate the relationships of these isolates to other monopartite *Ipomoea*-infecting begomoviruses.

Geminiviruses (family *Geminiviridae*) are an important group of plant viruses with a genome consisting of one or two circular single-stranded DNA molecules of 2.6–3.0 kb packed into twinned quasi-icosahedral particles. Based on their host range, genome organization and insect vector, geminiviruses are currently classified into four genera: *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Mastrevirus* and *Topocuvirus* [15]. A number of monopartite begomoviruses infect several species of the genus *Ipomoea* within the family *Convolvulaceae* [9, 13]. Phylogenetic analysis showed that these viruses, for which the name “swepoviruses” has been proposed [2], are grouped in a monophyletic cluster, separated from the main begomovirus branches, the Old and New World groups [9]. Sweet potato (*I. batatas*) plants infected by swepoviruses are frequently symptomless, although yield losses have been reported in some varieties [8]. Because sweet potato is vegetatively propagated, accumulation of viruses can become a major constraint for its production. Swepoviruses have been described infecting sweet potato in many countries, including Peru [3], Spain [9], China [10], United States of America [6–8] and, recently, in a sweet potato germplasm bank from Brazil [13]. Over the last few years, surveys were conducted across Brazil to identify swepoviruses infecting commercial and backyard sweet potato crops. As a result, we report herein the full genome sequence of a novel monopartite begomovirus infecting sweet potato in the State of São Paulo, Brazil.

Leaf sample #SP71 from a sweet potato plant (var. Londrina) showing chlorosis and vein necrosis symptoms was collected in a commercial field at Álvares Machado, State of São Paulo (22°00'S, 51°27'W) in April 2009. Total DNA was extracted from this sample using a CTAB-based method [1], and then putative full-length begomovirus genome components were amplified by rolling-circle amplification (RCA) with  $\phi$ 29 DNA polymerase

---

L. C. Albuquerque · A. K. Inoue-Nagata · B. Pinheiro  
Embrapa Hortaliças, Km 09, BR060, Cx. Postal 218,  
Brasília, DF 70359-970, Brazil

L. C. Albuquerque · B. Pinheiro · R. O. Resende  
Universidade de Brasília,  
Brasília, DF 70910-970, Brazil

S. d. G. Ribeiro  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia,  
Parque Estação Biológica, Final Av. W3 Norte,  
Brasília, DF 70770-900, Brazil

L. C. Albuquerque · E. Moriones · J. Navas-Castillo (✉)  
Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea  
“La Mayora” (IHSM-UMA-CSIC), Consejo Superior de  
Investigaciones Científicas,  
Estación Experimental “La Mayora”,  
29750 Algarrobo-Costa, Málaga, Spain  
e-mail: jnavas@eelm.csic.es

(TempliPhi, GE Healthcare) essentially as described previously [5]. The resulting concatamers were digested with ten different restriction enzymes (*Bam*HI, *Cla*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I, *Sac*I, *Spe*I, and *Xba*I). *Bam*HI and *Sac*I restriction yielded DNA fragments of ca. 2.8 kbp, putatively corresponding to monomeric genome components. These fragments were cloned into *Bam*HI- and *Sac*I-digested pBluescript SK<sup>+</sup> (Stratagene), respectively, introduced into *E. coli* DH5 $\alpha$  by transformation and fully sequenced by Macrogen Inc. (Seoul, South Korea).

The DNA molecules isolated from sample #SP71 and cloned after digestion with *Bam*HI (GenBank accession number HQ393477) and *Sac*I (HQ393473) were 2782 and 2837 nucleotides in length, respectively. The sequences contained features typical of monopartite begomoviruses, with two open reading frames (ORFs) in the viral sense strand and four ORFs in the complementary sense strand, separated by an intergenic region containing the nonanucleotide sequence (TAATATT↓AC) conserved in the family *Geminiviridae* with a few exceptions, such as beet curly top Iran virus and Eragrosti curvula streak virus [17, 18]. Within the intergenic region, the repeated elements (iterons) located surrounding the TATA box of the replication-associated protein (Rep) ORF presented the consensus sequence core GGWGD and four iterative elements, three direct (AA ATGGTGGGA, AATTGGTGGGA and GGTGGGA) and one inverted (TCCACCAAAT), identical to those reported for sweet potato leaf curl Lanzarote virus [9].

Identities of begomovirus nucleotide sequences obtained in this work with those of representative swepoviruses were calculated after alignment with CLUSTAL V [4] (included in

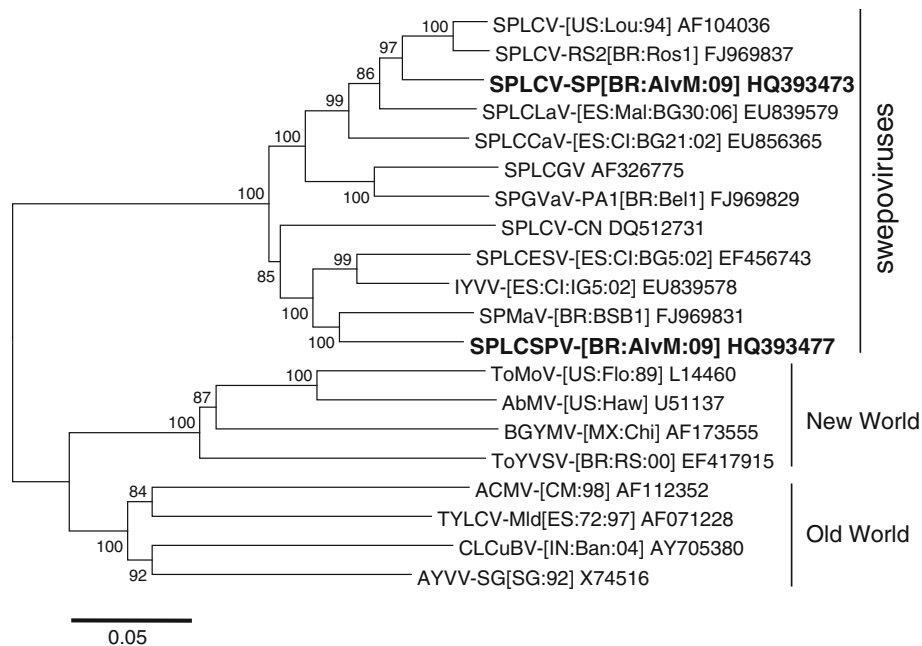
MegAlign DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) (Table 1). The sequence of clone SP71-*Bam*HI (GenBank HQ393477) showed the highest level of nucleotide sequence identity (87.6%) to that of sweet potato leaf curl Spain virus-[ES:CI:BG5:02] (GenBank EF456743), followed (86.5%) by that of sweet potato mosaic-associated virus-[BR:BSB1] (FJ969831), both of which were recently proposed to belong to novel begomovirus species in Spain and Brazil, respectively [9, 13]. The sequence of clone SP71-*Sac*I (GenBank HQ393473) was most closely related (92.2%) to that of sweet potato leaf curl virus-RS2[BR:Ros1] (FJ969837) [13]. Thus, in accordance with the current taxonomic criteria for begomovirus classification [15], the sequence from clone SP71-*Bam*HI likely corresponds to that of an isolate of a novel begomovirus species, for which we propose the name Sweet potato leaf curl Sao Paulo virus (SPLCSPV). The sequence from clone SP71-*Sac*I would correspond to that of an isolate of a new strain of sweet potato leaf curl virus. These isolates were designated sweet potato leaf curl Sao Paulo virus-[Brazil:Alvares Machado:2009] (SPLCSPV-[BR:AlvM:09]) and sweet potato leaf curl virus-Sao Paulo [Brazil:Alvares Machado:2009] (SPLCV-SP[BR:AlvM:09]), respectively.

A phylogenetic tree was constructed using Mega4 by the neighbour-joining method [16] after alignment of the most closely related swepovirus genomes (Fig. 1). The SPLCSPV-[BR:AlvM:09] sequence clustered with sweet potato mosaic-associated virus-[Brazil:Brasilia 1], while SPLCV-SP[BR:AlvM:09] was closer to sweet potato leaf curl virus-Rio Grande do Sul 2[Brazil:Rosario 1], both of which were obtained from a sweet potato germplasm bank in Brazil [13].

**Table 1** Pairwise sequence identity percentages of the complete genome sequences of SP71-*Bam*HI and SP71-*Sac*I swepovirus isolates reported here and those of representative *Ipomoea*-infecting begomoviruses

Virus	SP71 <i>Bam</i> HI	SP71 <i>Sac</i> I
Sweet potato leaf curl Sao Paulo virus-[Brazil:Alvares Machado:2009] (SP71- <i>Bam</i> HI)	100	84.2
Sweet potato leaf curl virus-Sao Paulo [Brazil:Alvares Machado:2009] (SP71- <i>Sac</i> I)	84.2	100
<i>Ipomoea</i> yellow vein virus-[Spain:Málaga:IG5:2006]	80.8	77.5
Sweet potato golden vein-associated virus-Pará [Brazil:Belém 1]	74.1	81.2
Sweet potato golden vein-associated virus-Paraíba 1 [BR:Sou1]	80.6	88.1
Sweet potato leaf curl Canary virus-[Spain:Canary Islands:BG21:2002]	75.4	85.2
Sweet potato leaf curl Georgia virus-[United States:Georgia 16]	77.6	77.1
Sweet potato leaf curl Lanzarote virus-[Spain:Málaga:BG30:2006]	79.2	89.6
Sweet potato leaf curl Spain virus-[Spain:Canary Islands: BG5:2002]	<u>87.6</u>	79.2
Sweet potato leaf curl virus-[United States:Louisiana:1994]	75.3	89.6
Sweet potato leaf curl China virus-[China:2005]	75.2	74.5
Sweet potato leaf curl virus-Rio Grande do Sul 2[Brazil:Rosario1]	75.2	<u>92.2</u>
Sweet potato mosaic-associated virus-[Brazil:Brasília1]	86.5	77.5

Acronyms and GenBank accession numbers are provided in Fig. 1. The highest percentages of nucleotide identity for SP71-*Bam*HI and SP71-*Sac*I isolates are underlined



**Fig. 1** Phylogenetic tree indicating the relationship between the complete genomes of SPLCSPV-[BR:AlvM:09] and SPLCV-SP[BR:AlvM:09] reported here (in bold) and those of representative *Ipomoea*-infecting begomoviruses. The tree was constructed by the neighbour-joining method with 1,000 bootstrap replicates using MEGA4.1 [16]. The virus used for alignment were as follows: sweet potato leaf curl virus-[United States of America:Louisiana:1994] (SPLCV-[US:Lou:94]), sweet potato leaf curl virus-Rio Grande do Sul 2 [Brazil:Rosario1] (SPLCV-RS2[BR:Ros1]), sweet potato leaf curl Lanzarote virus-[Spain:Málaga:BG30:2006] (SPLCLaV-[ES:Mal:BG30:06]), sweet potato leaf curl Canary virus-[Spain:Canary Islands:BG21:2002] (SPLCCaV-[ES:CI:BG21:02]), sweet potato leaf curl Georgia virus-[United States:Georgia 16] (SPLCGV-[US:Geo16]), sweet potato golden vein-associated virus-Pará [Brazil:Belém 1] (SPGVaV-PA[BR:Bel1]), sweet potato leaf curl China virus-[China:2005] (SPLCCNV-CN:05), sweet potato leaf curl

Spain virus-[Spain:Canary Islands: BG5:2002] (SPLCESV-[ES:CI: BG5:02]), Ipomoea yellow vein virus-[Spain:Málaga:IG5:2006] (IYVV-[ES:Mal:IG5:06]), sweet potato mosaic-associated virus-[Brazil:Brasília1] (SPMaV-[BR:BSB1]), DNA-A of representative members of the New (tomato mottle virus-[United States:Florida:1989] (ToMoV-[US:Flo:89]), Abutilon mosaic virus-[United States:Hawaii] (AbMV-[US:Hav])), bean golden yellow mosaic virus-[Mexico:Chiapas] (BGYMV-[MX:Chi]) and Old World (African cassava mosaic virus-[Cameroon:1998] (ACMV-[CM:98]), tomato yellow leaf curl virus-Mild[Spain:72:1997] ([TYLCV-Mld[ES:72:97]), cotton leaf curl Bangalore virus-[India:Bangalore:2004] (CLCuBV-[IN:Ban:04]), Ageratum yellow vein virus-Singapore[Singapore:1992] (AYVV-SG[SG:92])) begomoviruses are included. GeneBank accession numbers are shown in the tree. The scale bar indicates the number of substitution per site

The presence of isolates belonging to two different begomovirus species in a single field-grown sweet potato plant, as reported here, is an additional example of a mixed infection, which was previously shown to be frequent in this plant host [9]. This phenomenon is extremely important for virus evolution because mixed infections are the prerequisite for the occurrence of natural recombination events, which may contribute to the appearance of new begomoviruses [12, 14]. We searched for evidence of recombination (using RDP3 with default settings [11]) between the isolates described here and other swepoviruses. Our analyses showed that SPLCSPV probably contributed with genetic material (DNA fragments of  $\sim 727$  nt [ $P$ -value =  $3.0 \times 10^{-40}$ ] and  $\sim 897$  nt [ $P$ -value =  $3.0 \times 10^{-40}$ ], respectively) to the emergence of two viruses, SPLCV-SP (described here) and sweet potato golden vein-associated virus-PB1 [13].

The only previous study on swepoviruses from Brazil [13] was carried out on a collection of sweet potato

germplasm maintained *ex vitro* at Embrapa Vegetables, Brasilia. The results presented here, as part of a survey carried out on commercial crops in Brazil, support the presence of begomoviruses infecting commercial sweet potato crops and point to a complex ecological situation with a great diversity of swepoviruses present, and this diversity might increase as further studies are carried out.

**Acknowledgments** The authors thank Dr. João Bosco Carvalho Silva and Dr. Amaríllis Rós Golla for assistance on sample collection, and Lucio Flávio Barbosa and Oneilson Medeiros de Aquino for technical assistance. This study was funded by CNPq project 482005/2007-6. L.C.A. is sponsored by CNPq (561405/2008-5) and Capes/Wageningen (014/07), and R.O.R. and A.K.I.N. are CNPq fellows. The work in Spain was supported by grant GEN2006-27770-C2-2 (Ministerio de Educación y Ciencia, Spain, co-financed by FEDER) in the frame of the ERA-NET Plant Genomics project ERA-PG 040B RCA-Genomics of the 6th EU Framework Programme for Research and Technological Development (FP6).

## References

1. Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11–15
2. Fauquet CM, Stanley J (2003) Geminivirus classification and nomenclature: progress and problems. *Ann Appl Biol* 142: 165–189
3. Fuentes SL, Salazar LF (2002) First report of *Sweet potato leaf curl virus* in Peru. *Plant Dis* 87:98
4. Higgins DG, Bleasby AJ, Fuchs R (1992) CLUSTAL V—improved software for multiple sequence alignment. *Comput Appl Biosci* 8: 189–191
5. Inoue-Nagata AK, Albuquerque LC, Rocha WB, Nagata T (2004) A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage  $\phi$ 29 DNA polymerase. *J Virol Methods* 116:209–211
6. Lotrakul P, Valverde RA, Clark CA, Sim J, de La Torre R (1998) Detection of a geminivirus infecting sweet potato in the United States. *Plant Dis* 82:1253–1257
7. Lotrakul P, Valverde R (1999) Cloning of a DNA-A-like genomic component of sweet Potato leaf curl virus: nucleotide sequence and phylogenetic relationships. *Mol Plant Pathol*. <http://www.bspp.org.uk/mppol/1999/0422lotrakul/>
8. Lotrakul P, Valverde RA, Clark CA, Fauquet CM (2003) Properties of a begomovirus isolated from sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] infected with *Sweet potato leaf curl virus*. *Rev Mex Fitopatol* 21:128–136
9. Lozano G, Trenado HP, Valverde RA, Navas-Castillo J (2009) Novel begomovirus species of recombinant nature in sweet potato (*Ipomoea batatas*) and *Ipomoea indica*: taxonomic and phylogenetic implications. *J Gen Virol* 90:2550–2562
10. Luan YS, Zhang J, Liu DM, Li WL (2007) Molecular characterization of sweet potato leaf curl virus isolate from China (SPLCV-CN) and its phylogenetic relationship with other members of the Geminiviridae. *Virus Genes* 35:379–385
11. Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefevre P (2010) RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Comput Appl Biosci* 26:2462–2463
12. Padidam M, Sawyer S, Fauquet CM (1999) Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265:218–225
13. Paprotka T, Boiteux LS, Fonseca MEN, Resende RO, Jeske H, Faria JC, Ribeiro SG (2010) Genomic diversity of sweet potato geminiviruses in a Brazilian germplasm bank. *Virus Res* 149: 224–233
14. Sanz AI, Fraile A, García-Arenal F, Zhou X, Robinson DJ, Khalid S, Butt T, Harrison BD (2000) Multiple infection, recombination and genome relationships among begomovirus isolates found in cotton and other plants in Pakistan. *J Gen Virol* 81:1839–1849
15. Stanley J, Bisaro DM, Briddon RW, Brown JK, Fauquet CM, Harrison BD, Rybicki EP, Stenger DC (2005) Geminiviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (eds) *Virus taxonomy*, VIIIth report of the ICTV. Elsevier/Academic Press, London, pp 301–326
16. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596–1599
17. Varsani A, Shepherd DN, Dent K, Monjane AL, Rybicki EP, Martin DP (2009) A highly divergent South African geminivirus species illuminates the ancient evolutionary history of this family. *Virol J* 6:36
18. Yazdi HRB, Heidarnejad J, Massumi H (2008) Genome characterization and genetic diversity of beet curly top Iran virus: a geminivirus with a novel nonanucleotide. *Virus Genes* 36: 539–545

1 **Genetic diversity and recombination analysis of sweepoviruses from Brazil**

2

3 **Leonardo C. Albuquerque · Alice K. Inoue-Nagata · Bruna Pinheiro · Renato O. Resende ·**

4 **Enrique Moriones · Jesús Navas-Castillo**

5

6 L. C. Albuquerque · B. Pinheiro · A. K. Inoue-Nagata ()

7 Embrapa Vegetables, Km 09, BR060, Cx. Postal 218, Brasília, DF, CEP 70359-970, Brazil

8

9 R. O. Resende

10 Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, CEP 70.910-970, Brasília-DF,

11 Brazil

12

13 L. C. Albuquerque · E. Moriones · J. Navas-Castillo

14 Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (IHSM-UMA-CSIC),

15 Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Estación Experimental “La Mayora”, 29750

16 Algarrobo-Costa, Málaga, Spain

17

18 email: alice.nagata@embrapa.br

19

20

21 **Abstract**

22 **Background:** Monopartite begomoviruses (genus *Begomovirus*, family *Geminiviridae*) that  
23 infect sweet potato (*Ipomoea batatas*) around the world are known as sweepoviruses. Because  
24 sweet potato plants are vegetatively propagated, the accumulation of viruses can become a  
25 major constraint for root production. Mixed infections of sweepovirus species and strains can  
26 lead to recombination, which may contribute to the generation of new recombinant  
27 sweepoviruses.

28 **Results:** This study reports the full genome sequence of 34 sweepviruses sampled from a  
29 sweet potato germplasm bank and commercial fields in Brazil. These sequences were compared  
30 with others from public nucleotide sequence databases to provide a comprehensive overview of  
31 the genetic diversity and patterns of genetic exchange in sweepviruses isolated from Brazil, as  
32 well as to review the classification and nomenclature of sweepviruses in accordance with the  
33 current guidelines proposed by the *Geminiviridae* Study Group of the International Committee  
34 on Taxonomy of Viruses (ICTV). Co-infections and extensive recombination events were  
35 identified in Brazilian sweepviruses. Analysis of the recombination breakpoints detected  
36 within the sweepvirus dataset revealed that most recombination events occurred in the  
37 intergenic region (IR) and in the middle of the C1 open reading frame (ORF).

38 **Conclusions:** The genetic diversity of sweepviruses was considerably greater than previously  
39 described in Brazil. Moreover, recombination analysis revealed that a genomic exchange is  
40 responsible for the emergence of sweepvirus species and strains and provided valuable new  
41 information for understanding the diversity and evolution of sweepviruses.

42 **Keywords:** Geminivirus; begomovirus; sweet potato; *Ipomoea batatas*; Convolvulaceae

43

## 44 **Background**

45 Sweet potato (*Ipomoea batatas*, family *Convolvulaceae*) is one of the most important  
46 subsistence crops in developing countries and the third most important root crop after potato  
47 (*Solanum tuberosum*) and cassava (*Manihot esculenta*) [1]. More than 30 viruses are known to  
48 infect sweet potato and in some cases cause serious diseases in this crop [2]. Many of these  
49 viruses are monopartite begomoviruses (genus *Begomovirus*, family *Geminiviridae*).

50 The first two sweet potato begomoviruses to be characterized at the molecular level were Sweet  
51 potato leaf curl virus (SPLCV) and Sweet potato leaf curl Georgia virus (SPLCGoV), isolated in  
52 Louisiana, USA, in 1999 [3, 4]. Subsequently, begomovirus infections in sweet potato have  
53 been reported from many countries, including Peru [5], Spain [6], China [7, 8], Italy [9],



54 Uganda [10], the United States [11] and Brazil [12, 13], resulting in the description of ten  
55 additional novel species [6, 7, 10-13]. Phylogenetically, these viruses, for which the name  
56 sweepoviruses has been proposed [14], group in a monophyletic cluster that is distinct from the  
57 two main begomovirus branches, the Old and New World groups [6, 15]. In addition to sweet  
58 potato, sweepoviruses can infect other hosts such as *I. nil* or *I. setosa* [16]. The symptoms  
59 caused by sweepoviruses depend on the specific host and usually consist of leaf curling and vein  
60 yellowing, although the infection can be asymptomatic.

61 Begomoviruses are transmitted to dicotyledonous plants by the whitefly *Bemisia tabaci* and  
62 cause important yield losses in many crops worldwide [17-19]. They have small, circular,  
63 single-strand DNA genomes consisting of one (monopartite) or two (bipartite) components  
64 encapsidated in twinned icosahedral particles [20, 21]. The viral DNA-A has one (V1) or two  
65 open reading frames (ORFs - V1 and V2, in Old World begomoviruses) in the virion sense and  
66 four ORFs (C1, C2, C3 and C4) in the complementary sense, separated by an intergenic region  
67 (IR). The DNA-A encodes the viral coat protein (CP or V1) essential for viral transmission by  
68 *B. tabaci* and a V2 protein that may potentially be involved in virus accumulation, symptom  
69 development and virus movement [22, 23]. The complementary-sense strand of DNA-A  
70 encodes the replication-associated protein (Rep or C1), the transcriptional activator protein  
71 (TrAP or C2), which controls viral gene expression, the replication-enhancer protein (REN or  
72 C3), required for viral DNA replication, and C4, a suppressor of post-transcriptional gene  
73 silencing (PTGS). The DNA-B of bipartite begomoviruses encodes two proteins, the nuclear  
74 shuttle protein (NSP – BV1) and the movement protein (MP – BC1) involved in intra- and inter-  
75 cellular movement within the plant [24].

76 Because sweet potato plants are vegetatively propagated, accumulation of viruses may occur  
77 and results in the co-infection of multiple viral genomes in a single plant. Mixed infections of  
78 sweepovirus species and strains have been previously shown to be frequent in sweet potato [6,  
79 11, 13]. This phenomenon is extremely important for virus evolution because it provides  
80 opportunities for the occurrence of natural recombination events leading to extensive viral

81 diversity [25-27]. The importance of recombination to geminivirus evolution is well known [26,  
82 28, 29], and it is probably the mechanism responsible for the genetic diversification and  
83 emergence of the most agriculturally important begomovirus species [30-32]. While generating  
84 descendants with increased fitness, recombination has also been the cause of the increased  
85 genetic diversity within the begomoviruses that consequently complicates the classification of  
86 new species.

87 In this report, we present a study of the genetic diversity among sweepoviruses in Brazil. Thirty-  
88 four new complete sequences were determined. Based on these new sequences and on other  
89 sequences available in public sequence databases, the classification and nomenclature of  
90 sweepoviruses were revised in accordance with the current guidelines of the *Geminiviridae*  
91 Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). We also provide  
92 clear evidence of recombination events that may have led to the emergence of new sweepovirus  
93 strains and species.

## 94 **Results**

### 95 **Sequence analysis of full-length sweepovirus genomes**

96 The complete nucleotide sequence of 34 cloned isolates (GenBank accessions HQ393442 to  
97 HQ393472 and HQ393474 to HQ393476) corresponding to putative full-length sweepovirus  
98 genomes was determined from the sweet potato Embrapa germplasm bank (SPEGB) and from  
99 commercial field samples. All genomes (ranging from 2779 to 2843 nucleotides) had the typical  
100 organization of monopartite begomoviruses with two ORFs in the virion sense (V1 and V2) and  
101 four ORFs in the complementary sense (C1, C2, C3 and C4). All sequences contained the  
102 conserved nonanucleotide sequence 5'-TAATATT↓AC-3' and four iterative elements (iterons,  
103 short repeated sequences important for the replication process; Additional File 1), three direct (I,  
104 II and III) and one inverted (IV), with the core consensus sequence GGWGD located around the  
105 TATA box [33]. The iteron-related domain (IRD) in the N-terminal region of the replication-  
106 associated protein (Rep IRD) was also identified [34]. Sequences were identified that contain

107 three novel iterons (GGTGGG, TATGGGTGGA and CCCACCTAAT) and three Rep IRDs  
108 (MATPKRFRIS, MAPPNRFKIQ and MPRAGRNLN) that differ from those previously  
109 described by Lozano *et al.* [6] and Zhang and Ling [11] for sweepoviruses (Additional File 1).  
110 The 34 sequences determined here were compared with the sequences of 67 sweepovirus  
111 isolates obtained from sequence databases (Table 2 and Additional File 2). Each isolate was  
112 named following the standard nomenclature for begomoviruses (Table 1; see Additional File 2  
113 for complete isolate names). Based on the current guidelines proposed by the ICTV  
114 *Geminiviridae* Study Group [35, 36], two isolates belong to the same species if the overall  
115 nucleotide identity is >89%. The isolates described in this study belong to three species, Sweet  
116 potato leaf curl virus (SPLCV), Sweet potato golden vein virus (SPGVV) (the term "associated"  
117 was eliminated from the previous name, sweet potato golden vein-associated virus, following  
118 the standard begomovirus naming recommendation) and Sweet potato leaf curl Spain virus  
119 (SPLCESV), with the percentage of nucleotide identity ranging from 92.2-98.4% within each  
120 species. Twenty-one of the isolates belong to three novel strains (the demarcation threshold for  
121 distinguishing different strains of a species is 89-94% nucleotide identity [36]) of SPLCV and  
122 SPGVV named SPLCV-Brazil (SPLCV-BR), SPLCV-Pernambuco (SPLCV-PE) and SPGVV-  
123 Rondonia (SPGVV-RO). The other isolates are variants of SPLCV-United States (SPLCV-US),  
124 SPGVV-Paraíba (SPGVV-PB) and SPLCESV. The isolates of SPGVV and SPLCESV were  
125 found only in the SPEGB, whereas SPLCV isolates were found in both the SPEGB and  
126 commercial field samples. The samples from São Paulo state were infected by both SPLCV-US  
127 and SPLCV-Sao Paulo (SPLCV-SP) isolates. However, the samples from the States of  
128 Pernambuco, Paraíba and Rio Grande do Sul were shown to be infected by SPLCV-PE (Table  
129 1). Interestingly, we identified co-infection in six samples (#171, #184, #325, #337, #346 and  
130 #370) from the SPEGB, whereas all of the samples from commercial fields were apparently  
131 infected by a single species/strain, as suggested by the uniformity of the clones obtained from  
132 these samples (Table 1).

### 133 **Taxonomic and phylogenetic analysis of sweepoviruses**

134 Pairwise comparisons using Clustal V were performed using the sequences determined here and  
135 all full-length sweepovirus sequences available in the databases. It is worth noting that a few  
136 sweepovirus isolates were likely misclassified according to the taxonomic criteria for  
137 geminivirus classification [36] (the proposed new names are shown in Table 2 and Additional  
138 File 2). These isolates were SPLCV-Ceara[Brazil:Fortaleza1] (SPLCV-CE[BR:For1],  
139 FJ969832), SPLCV-Rio Grande do Sul1[Brazil:Tavares1] (SPLCV-RS1[BR:Tav1], FJ969833)  
140 [12], Sweet potato golden vein-associated virus-[United States:Mississippi:1b-3:07] (SPGVaV-  
141 [US:MS:1B-3], HQ333143) [11], SPGVaV-Para[Brazil:Belem1] (SPGVaV-PA[BR:Bel1],  
142 FJ969829) [12] and Ipomoea yellow vein virus-[Spain:Malaga:IG1:2006] (IYVV-  
143 [ES:Mal:IG1:06], EU839576) [6]. The genome of isolate SPLCV-CE[BR:For1] shares <89%  
144 nucleotide identity with all other begomovirus sequences (Additional File 2), and in accordance  
145 with the cut-off point of 89% identity established for species separation within the genus  
146 *Begomovirus* [35], it most likely belongs to a new species, proposed here as Sweet potato leaf  
147 curl Brazil virus (SPLCBRV). The isolate SPLCV-RS1[BR:Tav1] shares >90% identity with  
148 SPLCLaV isolates, and we therefore proposed it be classified as Sweet potato leaf curl  
149 Lanzarote virus-Brazil[BR:RS:Tav1:07] (SPLCLaV-BR[BR:RS:Tav1:07]). The IYVV-  
150 [ES:Mal:IG1:06] sequence shared <89% identity with IYVV-[Spain:1998] and all other  
151 begomovirus sequences; it is therefore suggested that it be classified as a new species named  
152 Ipomoea yellow vein Malaga virus-[ES:Mal:IG1:06] (IYVMaV-[ES:Mal:IG1:06]). In addition,  
153 based on the nucleotide sequence identities found (Additional File 2), we propose that the  
154 isolates SPGVaV-[United States:Mississippi:1B-3] (SPGVaV-[US:MS:1B-3], HQ333143),  
155 SPGVaV-[Brazil:Belém1] (SPGVaV-PA[BR:Bel1], FJ969829) and Merremia leaf curl virus-  
156 [Puerto Rico:N1] (DQ644561) be classified as strains of Merremia leaf curl virus (MerLCuV),  
157 specifically MerLCuV-US[US:MS:1B-3:07], MerLCuV-BR[BR:PA:Bel1:07] and MerLCuV-  
158 PR[PR:N1:06], respectively.

159 In the UPGMA phylogenetic tree (Figure 1), the sweepovirus sequences were consistently  
160 grouped in accordance with the proposed species/strain classification and were separated from

161 both the Old and New World begomoviruses as was expected from the pairwise nucleotide  
162 identity analysis (Additional File 2).

### 163 **Recombination analysis**

164 We searched for evidence of recombination in an alignment of all 101 complete sweepovirus  
165 sequences. Different methods were used for recombination breakpoint prediction and provided  
166 strong evidence for at least 13 recombination events spread across 19 of 101 analyzed genomes  
167 (Figure 2). Remarkably, following the adopted criteria (detectable by seven different analytical  
168 methods and recombined fragments with  $\geq 97\%$  nucleotide identity with parental sequences),  
169 most recombination events were detected among the isolates from the SPEGB. Eight  
170 recombination patterns were detected for sequences reported in this work, while five were found  
171 in the previously published sweepovirus sequences. The recombination breakpoints were  
172 detected between the intergenic region (IR) and V1 (events 1, 2, and 5); V1 and C2/C3 (event  
173 3); C1 and C1 (event 4), V1 and C2 (event 6), V1 and C1 (event 7); V2 and C2/C3 (event 9);  
174 C1/C4 and V1/V2 (event 12) and C1 and IR (events 8, 10, 11, and 13) (Figure 2). After analysis  
175 with the RDP3 program, the recombination events detected for the sequences reported in this  
176 study (events 1-8, Figure 2A, 2B) were tested using the SimPlot program (Figure 3). Every  
177 event identified by the RDP3 program was confirmed by Simplot. SPLCV-US[BR:RO:OPO:08]  
178 (HQ393453) appeared to be a recombinant (recombination points detected at nucleotide (nt)  
179 positions 37 and 1006) of the putative parental-like strains SPLCV-SP[BR:SP:AlvM:09]  
180 (HQ393476) and SPLCV-BR[BR:RO:OPO:08] (HQ393455) (Figure 3A). Among the isolates  
181 from the SPLCV-BR strain, SPLCV-BR[BR:BA:Uru:08] (HQ393442) contained three  
182 recombination events (event 2, breakpoints at nucleotide positions 58-523; event 3, nt positions  
183 955-1325 and event 4, nt positions 1926-2614), three putative parental-like strains: SPGVV-  
184 RO[BR:BA:Uti:08] (HQ393447), SPLCV-US[BR:RO:OPO:08] (HQ393453) and an unknown  
185 sequence (Figure 3B). For the SPLCV-BR isolates [BR:BA:CA:08] and [BR:RO:Cac:08], two  
186 recombinant events were detected (event 2, nt positions 45-541 and event 4, nt positions 1926-  
187 2614), whereas SPLCV-BR[BR:RO:OPO:08] contained only event 2 (Figure 2B). The isolate  
188 SPLCESV-[BR:RO:Cac:08] (HQ393458) was identified as a recombinant (between nt positions

189 994-2770) of SPLCV-BR[BR:BA:CA:08] (HQ393445) and SPLCESV-[BR:BA:Uti:08]  
190 (HQ393448) (Figure 3C). When SPGVV-PB[BR:BA:CA:08] (HQ393444) was used as a query  
191 sequence, a recombinant break point (event 6, nt positions 698-1589) with two putative  
192 parental-like viruses, SPLCESV-[BR:RO:Cac:08] and SPLCV-US[BR:PA:08] (HQ393450)  
193 (Figure 3D) was identified. In contrast, when SPGVV-RO[BR:RO:Cac:08] (HQ393459) was  
194 used as a query sequence, a recombinant break point at nt positions 581-1727 (event 7) was  
195 identified with two putative parental-like viruses, SPLCESV-[BR:RO:Cac:08] and an unknown  
196 sequence (Figure 3E). The remaining four SPGVV-RO sequences contained the same  
197 recombination event observed for SPGVV-RO[BR:RO:Cac:08] (Figure 2B). Finally, when the  
198 analysis was performed for SPLCV-SP[BR:SP:PP:09] (HQ393476), two different  
199 recombination points (at nt positions 24-2007) and two putative parental strains, SPLCV-  
200 US[BR:RS:Ros1:07] (FJ969837) and SPLCSPV-[BR:SP:AlvM:09] (HQ393477), were detected  
201 (Figure 3F).

## 202 **Discussion**

203 RCA (rolling circle amplification) has greatly facilitated the cloning of geminivirus genomes.  
204 This is especially true for sweet potato samples, as DNA extraction is difficult due to the high  
205 polysaccharide content [37]. Because RCA-based methods may start from a low amount of  
206 template DNA, sample dilution is sufficient to avoid the harmful effects of contaminating  
207 substances. In total, 34 complete sweepovirus genomes were isolated from sweet potato samples  
208 collected from a sweet potato germplasm bank (SPEGB) and commercial fields across four  
209 Brazilian states. Based on ICTV guidelines [36], the isolates belong to new strains of SPLCV  
210 [38] ( strains SPLCV-BR and SPLCV-PE), and of SPGVV [12] (strain SPGVV-RO), and 13  
211 other isolates are considered to be variants of SPLCV-US [38], SPLCV-SP [13] and SPLCESV  
212 [6].

213 A thorough pairwise comparison of all of the sweepovirus sequences available in the databases  
214 along with the 34 sequences reported here was performed, and it appeared that four viral isolates  
215 were not appropriately classified; hence, their classification was reviewed according to ICTV

216 guidelines. We found that the isolates described as SPLCV-CE [12] and IYVV-[ES:IG1] [6]  
217 would be better classified as novel species, suggested here as Sweet potato leaf curl Brazil virus  
218 (SPLCBRV) and Ipomoea yellow vein Malaga virus (IYVMaV), respectively. Additionally, the  
219 SPLCV-RS1 isolate [12] may be classified as a new strain of SPLCLaV [6], and the name  
220 Sweet potato leaf curl Lanzarote virus-Brazil (SPLCLaV-BR) is proposed. Thus, it is suggested  
221 that all SPLCLaV isolates from Spain be classified as SPLCLaV-ES. Similarly, the isolates  
222 designated as SPGVaV-[US:MS:1B-3], SPGVaV-PA[BR:Bel1] and Merremia leaf curl virus-  
223 [PR:N1] (MeLCV-[PR:N1]) would be better renamed Merremia leaf curl virus-[US:MS:1B-  
224 3:07] (MerLCuV-US-[US:MS:1B-3:07]), MerLCuV-BR[BR:PA:Bel1:07] and MerLCuV-  
225 [PR:N1:06], respectively. Additionally, we suggest eliminating the term “associated” from the  
226 virus names, as symptom expression was not studied for any of the species. Finally, it was  
227 concluded that 44 of 67 sequences should be designated as strains (Table 2). This result clearly  
228 illustrates the complexity of sweepovirus taxonomy and nomenclature. Therefore, a set of  
229 modifications is suggested for updating the sweepovirus nomenclature and facilitating the  
230 interpretation of sweepovirus phylogenetic analysis (Table 2 and Figure 1).

231 The phylogenetic analysis demonstrated that the sweepovirus diversity found in the SPEGB  
232 samples is higher than in samples collected from commercial fields. In the SPEGB samples  
233 (n=10), three species (SPLCV, SPGVV and SPLCESV), five strains (SPLCV-US, SPLCV-BR,  
234 SPLCV-PE, SPGVV-PB and SPGVV-RO) and 11 recombinants were found, while in  
235 commercial fields (n=11), only one species (SPLCV) and three different strains (SPLCV-US,  
236 SPLCV-SP and SPLCV-PE) were observed. Moreover, co-infections were found solely in the  
237 SPEGB samples, although they have been shown to be frequent in field samples from other  
238 countries [6, 11]. This could be explained by the vegetative propagation of sweet potato that  
239 favors viral accumulation in the roots, the maintenance of many sweet potato entries collected  
240 throughout Brazil and abroad in the same confined greenhouse, and the presence of whiteflies  
241 (*Bemisia tabaci*) in the germplasm bank facilities. Of the approximately 1400 entries in the  
242 SBEGB, nine are from Argentina, the USA, Paraguay, Japan and Spain, and 173 were received

243 from the International Potato Center (CIP), Peru, as supposedly virus-free *in vitro* seedlings.  
244 The seedlings were maintained “in vivo” for at least three years, and this might have resulted in  
245 the natural spread of the begomoviruses present in some plants, thus enabling recombinations to  
246 occur. Virus-free plants or seeds will be produced to reduce the negative effect of virus infection  
247 for the breeding program.

248 Patterns of inter-species/strain geminivirus recombination and a number of hot- and cold-spots  
249 have been described among members of the genus *Begomovirus* [32, 39-41]. We therefore  
250 analyzed the recombination breakpoints detected within the sweepovirus dataset and a number  
251 of recombination events were identified. In some cases (Figure 3A, C, D and F), the  
252 recombinants appeared to be the result of recent recombination events because a low mutation  
253 rate was observed in this region (data not shown). Most of the recombination breakpoints occur  
254 in the IR (detected between nt positions 2770 and 96) and in the middle of the C1 ORF  
255 (between nt positions 2000 and 2250) (Figure 2A). Similarly, three recombination breakpoints  
256 (events 1, 3 and 5) were identified next to the end of the V1 ORF (Figure 2A). These results are  
257 consistent with those obtained from geminivirus recombination analyses, which show that the  
258 Rep, the IR and the interface between ORFs V1 and C3 are recombination hot-spots [29, 40, 42,  
259 43]. Lefeuvre *et al.* [40] also described the presence of a recombination cold-spot within the V2  
260 ORF and the third quarter of the V1 ORF of begomoviruses; here, however, we detected the  
261 occurrence of recombination breakpoints in the first half of the V1 ORF. Some sweepovirus  
262 recombination events have been previously described [6, 11], and most were confirmed in our  
263 study (events 9-13, Figure 2). The detection of similar recombination patterns agrees with the  
264 recent hypothesis that the recombination sites are non-randomly distributed along the  
265 geminivirus genome [29, 39, 44]. The observed recombination patterns are most likely due to  
266 the existence of regions with higher biochemical and biophysical predisposition and with  
267 tolerance for recombination. The experimental generation of recombinants has shown that the  
268 IR and V1/C3 interface is a recombination hot-spot [43], and this can be explained by the fact  
269 that recombinants derived from recombination breakpoints that occur outside the genes are



270 generally more viable than those occurring within the genes [29]. In addition to sequence  
271 homology, secondary structural features might also favor the occurrence of recombination [43].  
272 In our case, we detected a number of recombination breakpoints in the Rep and this was also  
273 observed among other geminiviruses [26, 29, 45].

## 274 **Conclusions**

275 Our study shows that the genetic diversity of sweepoviruses both in the SPEGB and commercial  
276 crops in Brazil is considerably greater than previously reported by Paprotka *et al.* [12] and  
277 highlights the importance of recombination in the evolution of these viruses. These results  
278 indicate that recombination events are apparently responsible for the emergence of sweepovirus  
279 strains and species, although alterations in host range, cell tropism, viral symptoms and  
280 pathogenicity remain to be elucidated. Recently, the generation of the first infectious clone of a  
281 sweepovirus, SPLCLaV, was described [16], which is especially important as it opens the  
282 possibility of understanding the various aspects of pathogenicity as well as its potential use in  
283 breeding virus-resistant sweet potatoes. Studies on viral diversity in particular regions provide  
284 important information enabling recommendations for viral control strategies and are essential  
285 for identifying species/strains from which to select isolates for screening tests for resistant  
286 germplasm. Finally, studies on viral diversity are necessary for comprehending how  
287 sweepovirus diversification results from propagative material exchange within the country. The  
288 ‘in vivo’ maintenance of vegetatively propagated plants in a germplasm bank has proven to be a  
289 risky strategy because it may enable or accelerate the generation of new species/strains that can  
290 spread to nature if isolation conditions are not sufficient to maintain the collection free of insect  
291 vectors.

292

## 293 **Methods**

### 294 **Collection of leaf samples and DNA extraction**

295 Sweet potato leaf samples showing a variety of symptoms, including vein thickening, chlorosis,  
296 curling, mottling and distortion, were collected from the sweet potato germplasm bank of  
297 Embrapa Vegetables (Brasilia-DF, Brazil) (SPEGB) and commercial fields across four Brazilian  
298 states (Table 1). Total DNA was extracted following the protocol described by Doyle and Doyle  
299 [46].

### 300 **Cloning strategy**

301 Circular geminiviral DNA was amplified by rolling-circle amplification (RCA) using  $\phi$ -29  
302 DNA polymerase (TempliPhi kit, GE Healthcare) as described by Inoue-Nagata *et al.* [47].  
303 RCA products were digested with a set of restriction enzymes (BamHI, EcoRI, EcoRV, HindIII,  
304 KpnI, PstI, SacI, SacII, SpeI and XbaI) to identify unique sites for cloning the full-length  
305 genomes (~2.8 kb). The restricted fragments corresponding to putative full-length monomer  
306 genomes were cloned into the vector pBluescript SK(+) (Stratagene, California, USA) and fully  
307 sequenced at Macrogen Inc. (Seoul, South Korea). One to two enzymes were finally selected for  
308 cloning the viral genomes present in each sample (Table 1).

### 309 **Genetic diversity**

310 Pairwise nucleotide identity comparisons were calculated using Clustal V [48] (included in  
311 MegAlign DNASTAR Inc., Madison, WI, USA). As recommended by the ICTV *Geminiviridae*  
312 Study Group, viruses with nucleotide identity between full-genome sequences of <89% were  
313 considered as distinct species, while those with <94% were considered distinct strains of the  
314 same species [36].

### 315 **Phylogenetic analysis**

316 Full genome sequences from 34 virus isolates obtained from 21 samples analyzed in this study  
317 (Table 1) and the 67 complete sweepvirus sequences available in public sequence databases  
318 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) as of October 2011 (Table 2) were aligned using Muscle [49].  
319 The phylogenetic relationships were inferred using UPGMA with 1,000 bootstrap replicates,

320 and the evolutionary distances were calculated using the p-distances method implemented in  
321 MEGA 5 [50].

### 322 **Recombination analysis**

323 All sweepovirus sequences used in this study (Table 2) were aligned using Muscle with default  
324 settings [49], and the detection of potential recombinant sequences, the identification of likely  
325 parental sequences and the localization of possible recombination breakpoints were performed  
326 using RDP [51], GENCONV [26], BOOTSCAN [52], MAXICHI [53], CHIMAERA [54],  
327 SiScan [55] and 3SEQ [56] methods implemented in the RDP3 program [57]. Default settings  
328 were used throughout. Only those potential recombination events detected using all of the  
329 methods described above and involving fragments sharing  $\geq 97\%$  sequence identity with their  
330 parental sequences were considered. Putative recombination events were analyzed with the  
331 SimPlot program [58] using the putative recombinant sequence as a query.

### 332 **Competing interests**

333 The authors declare that they have no competing interests.

### 334 **Author's contributions**

335 LCA and BP performed the experiments. LCA, AKIN, ROR, EM and JN-C were involved in  
336 data analysis. JN-C provided overall direction and experimental design. LCA, AKIN, ROR, EM  
337 and JN-C wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### 338 **Acknowledgements**

339 The authors wish to thank Dr. João Bosco Carvalho Silva, Dr. Simone da Graça Ribeiro and Dr.  
340 Amaríllis Rós Golla for assistance with sample collection and Dr. Arvind Varsani for critically  
341 reading the manuscript. In Brazil, this study was funded by CNPq project 304079/2009-0. The  
342 work in Spain was partially performed within the frame of the network 111RT0433 from  
343 Fundación CYTED. JN-C and EM are members of the Research Group AGR-214, partially  
344 funded by the Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía, Spain (co-

345 financed by FEDER-FSE). LCA is sponsored by CNPq (561405/2008-5), and Capes, and ROR  
 346 and AKIN are CNPq fellows.

347

## 348 **References**

- 349 1. **FAO Statistical Databases** [<http://faostat.fao.org/>]
- 350 2. Clark CA, Davis JA, Abad JA, Cuellar WJ, Fuentes S, Kreuze JF, Gibson RW, Mukasa  
 351 SB, Tugume AK, Tairo FD, Valkonen JPT: **Sweetpotato Viruses: 15 Years of**  
 352 **Progress on Understanding and Managing Complex Diseases.** *Plant Dis* 2012,  
 353 **96:168-185.**
- 354 3. Lotrakul P, Valverde RA: **Cloning of a DNA-A-like genomic component of sweet**  
 355 **potato leaf curl virus: nucleotide sequence and phylogenetic relationships.**  
 356 *Molecular Plant Pathology Online*  
 357 1999:<http://www.bspp.org.uk/mppol/1999/0422lotrakul/index.htm>
- 358 4. Lotrakul P, Valverde RA, Clark CA, Fauquet CM: **Properties of a begomovirus**  
 359 **isolated from sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) infected with Sweet potato**  
 360 **leaf curl virus.** *Revista Mexicana de Fitopatología* 2003, **21:128-136.**
- 361 5. Fuentes S, Salazar LF: **First report of Sweet potato leaf curl virus in Peru.** *Plant Dis*  
 362 2003, **87:98-98.**
- 363 6. Lozano G, Trenado HP, Valverde RA, Navas-Castillo J: **Novel begomovirus species of**  
 364 **recombinant nature in sweet potato (*Ipomoea batatas*) and *Ipomoea indica*:**  
 365 **taxonomic and phylogenetic implications.** *J Gen Virol* 2009, **90:2550-2562.**
- 366 7. Luan YS, Zhang J, Liu DM, Li WL: **Molecular characterization of sweet potato leaf**  
 367 **curl virus isolate from China (SPLCV-CN) and its phylogenetic relationship with**  
 368 **other members of the Geminiviridae.** *Virus Genes* 2007, **35:379-385.**
- 369 8. Luan YS, Zhang J, An LJ: **First report of Sweet potato leaf curl virus in China.** *Plant*  
 370 *Dis* 2006, **90:1111.**
- 371 9. Briddon RW, Bull SE, Bedford ID: **Occurrence of Sweet potato leaf curl virus in**  
 372 **Sicily.** *Plant Pathology* 2006, **55:286-286.**
- 373 10. Wasswa P, Otto B, Maruthi MN, Mukasa SB, Monger W, Gibson RW: **First**  
 374 **identification of a sweet potato begomovirus (sweepovirus) in Uganda:**  
 375 **characterization, detection and distribution.** *Plant Pathology* 2011, **60:1030-1039.**
- 376 11. Zhang SC, Ling KS: **Genetic diversity of sweet potato begomoviruses in the United**  
 377 **States and identification of a natural recombinant between Sweet potato leaf curl**  
 378 **virus and Sweet potato leaf curl Georgia virus.** *Arch Virol* 2011, **156:955-968.**
- 379 12. Paprotka T, Boiteux LS, Fonseca MEN, Resende RO, Jeske H, Faria JC, Ribeiro SG:  
 380 **Genomic diversity of sweet potato geminiviruses in a Brazilian germplasm bank.**  
 381 *Virus Res* 2010, **149:224-233.**
- 382 13. Albuquerque LC, Inoue-Nagata AK, Pinheiro B, Ribeiro Sda G, Resende RO, Moriones  
 383 E, Navas-Castillo J: **A novel monopartite begomovirus infecting sweet potato in**  
 384 **Brazil.** *Arch Virol* 2011, **156:1291-1294.**
- 385 14. Fauquet CM, Stanley J: **Geminivirus classification and nomenclature: progress and**  
 386 **problems.** *Ann Appl Biol* 2003, **142:165-189.**
- 387 15. Briddon R, Patil B, Bagewadi B, Nawaz-ul-Rehman M, Fauquet C: **Distinct**  
 388 **evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite**  
 389 **begomoviruses.** *BMC Evol Biol* 2010, **10:97.**
- 390 16. Trenado HP, Orfílio AF, Márquez-Martín B, Moriones E, Navas-Castillo J:  
 391 **Sweepoviruses cause disease in sweet potato and related *Ipomoea* spp.: fulfilling**

- 392 **Koch's postulates for a divergent group in the genus *Begomovirus*. *PLoS ONE***  
 393 **2011, 6:e27329.**
- 394 17. Banks GK, Bedford ID, Beitia FJ, Rodriguez-Cerezo E, Markham PG: **A novel**  
 395 **geminivirus of *Ipomoea indica* (*Convolvulaceae*) from southern Spain. *Plant Dis***  
 396 **1999, 83:486.**
- 397 18. Clark CA, Hoy MW: **Effects of common viruses on yield and quality of beauregard**  
 398 **sweet potato in Louisiana. *Plant Dis* 2006, 90:83-88.**
- 399 19. Valverde RA, Clark CA, Valkonen JPT: **Viruses and virus disease complexes of**  
 400 **sweetpotato. *Plant Viruses* 2007, 1:116-126.**
- 401 20. Rojas MR, Hagen C, Lucas WJ, Gilbertson RL: **Exploiting chinks in the plant's**  
 402 **armor: Evolution and emergence of geminiviruses. *Annu Rev Phytopathol* 2005,**  
 403 **43:361-394.**
- 404 21. Stanley J, Bisaro DM, Briddon RW, Brown JK, Fauquet CM, Harrison BD, Rybicki EP,  
 405 Stenger DC: **Family *Geminiviridae*. In *Virus Taxonomy Classification and***  
 406 ***Nomenclature of Viruses Eighth Report of the International Committee on the***  
 407 ***Taxonomy of Viruses*. Edited by Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U,**  
 408 **Ball LA. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2005: 301-326**
- 409 22. Harrison BD: **Advances in geminivirus research. *Annu Rev Phytopathol* 1985, 23:55-**  
 410 **82.**
- 411 23. Padidam M, Beachy RN, Fauquet CM: **The role of AV2 ("Precoat") and coat protein**  
 412 **in viral replication and movement in tomato leaf curl geminivirus. *Virology* 1996,**  
 413 **224:390-404.**
- 414 24. Noueiry AO, Lucas WJ, Gilbertson RL: **Two proteins of a plant DNA virus**  
 415 **coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell* 1994, 76:925-932.**
- 416 25. Briddon RW, Bedford ID, Tsai JH, Markham PG: **Analysis of the nucleotide sequence**  
 417 **of the treehopper-transmitted geminivirus, *Tomato pseudo-curly top virus*, suggests**  
 418 **a recombinant origin. *Virology* 1996, 219:387-394.**
- 419 26. Padidam M, Sawyer S, Fauquet CM: **Possible emergence of new geminiviruses by**  
 420 **frequent recombination. *Virology* 1999, 265:218-225.**
- 421 27. Sanz AI, Fraile A, Garcia-Arenal F, Zhou X, Robinson DJ, Khalid S, Butt T, Harrison  
 422 BD: **Multiple infection, recombination and genome relationships among**  
 423 **begomovirus isolates found in cotton and other plants in Pakistan. *J Gen Virol***  
 424 **2000, 81:1839-1849.**
- 425 28. Umaharan P, Padidam M, Phelps RH, Beachy RN, Fauquet CM: **Distribution and**  
 426 **diversity of geminiviruses in Trinidad and Tobago. *Phytopathology* 1998, 88:1262-**  
 427 **1268.**
- 428 29. Lefeuvre P, Martin DP, Hoareau M, Naze F, Delatte H, Thierry M, Varsani A, Becker  
 429 N, Reynaud B, Lett JM: **Begomovirus 'melting pot' in the south-west Indian Ocean**  
 430 **islands: molecular diversity and evolution through recombination. *J Gen Virol***  
 431 **2007, 88:3458-3468.**
- 432 30. Monci F, Sanchez-Campos S, Navas-Castillo J, Moriones E: **A natural recombinant**  
 433 **between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato***  
 434 ***yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming**  
 435 **prevalent in Spanish populations. *Virology* 2002, 303:317-326.**
- 436 31. Garcia-Andres S, Monci F, Navas-Castillo J, Moriones E: **Begomovirus genetic**  
 437 **diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: Evidence for the presence**  
 438 **of a new virus species of recombinant nature. *Virology* 2006, 350:433-442.**
- 439 32. Owor BE, Martin DP, Shepherd DN, Edema R, Monjane AL, Rybicki EP, Thomson JA,  
 440 Varsani A: **Genetic analysis of maize streak virus isolates from Uganda reveals**  
 441 **widespread distribution of a recombinant variant. *J Gen Virol* 2007, 88:3154-3165.**
- 442 33. Arguello-Astorga GR, Guevara-Gonzalez RG, Herrera-Estrella LR, Rivera-Bustamante  
 443 RF: **Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative**  
 444 **elements: A model for replication. *Virology* 1994, 203:90-100.**
- 445 34. Argüello-Astorga GR, Ruiz-Medrano R: **An iteron-related domain is associated to**  
 446 **Motif 1 in the replication proteins of geminiviruses: identification of potential**

- 447 **interacting amino acid-base pairs by a comparative approach. *Arch Virol* 2001,  
448 **146**:1465-1485.**
- 449 35. Fauquet CM, Bisaro DM, Briddon RW, Brown JK, Harrison BD, Rybicki EP, Stenger  
450 DC, Stanley J: **Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family**  
451 ***Geminiviridae*, and an updated list of begomovirus species.** *Arch Virol* 2003,  
452 **148**:405-421.
- 453 36. Fauquet CM, Briddon RW, Brown JK, Moriones E, Stanley J, Zerbini M, Zhou X:  
454 **Geminivirus strain demarcation and nomenclature.** *Arch Virol* 2008, **153**:783-821.
- 455 37. Varadarajan G, Prakash C: **A rapid and efficient method for the extraction of total**  
456 **DNA from the sweet potato and its related species.** *Plant Molecular Biology*  
457 *Reporter* 1991, **9**:6-12.
- 458 38. Lotrakul P, Valverde RA, Clark CA, Sim J, De La Torre R: **Detection of a geminivirus**  
459 **infecting sweet potato in the United States.** *Plant Dis* 1998, **82**:1253-1257.
- 460 39. Prasanna HC, Rai M: **Detection and frequency of recombination in tomato-infecting**  
461 **begomoviruses of South and Southeast Asia.** *Virology Journal* 2007, **4**:111.
- 462 40. Lefevre P, Lett JM, Reynaud B, Martin DP: **Avoidance of protein fold disruption in**  
463 **natural virus recombinants.** *PLoS Pathogens* 2007, **3**:e181.
- 464 41. Patil BL, Fauquet CM: **Cassava mosaic geminiviruses: actual knowledge and**  
465 **perspectives.** *Mol Plant Pathol* 2009, **10**:685-701.
- 466 42. Lefevre P, Lett JM, Varsani A, Martin DP: **Widely conserved recombination**  
467 **patterns among single-stranded DNA viruses.** *J Virol* 2009, **83**:2697-2707.
- 468 43. Garcia-Andres S, Tomas DM, Sanchez-Campos S, Navas-Castillo J, Moriones E:  
469 **Frequent occurrence of recombinants in mixed infections of tomato yellow leaf**  
470 **curl disease-associated begomoviruses.** *Virology* 2007, **365**:210-219.
- 471 44. Jeske H, Luetgemeier M, Preiss W: **DNA forms indicate rolling circle and**  
472 **recombination-dependent replication of *Abutilon mosaic virus*.** *EMBO Journal*  
473 2001, **20**:6158-6167.
- 474 45. Varsani A, Shepherd DN, Monjane AL, Owor BE, Erdmann JB, Rybicki EP,  
475 Peterschmitt M, Briddon RW, Markham PG, Oluwafemi S, et al: **Recombination,**  
476 **decreased host specificity and increased mobility may have driven the emergence**  
477 **of *Maize streak virus* as an agricultural pathogen.** *J Gen Virol* 2008, **89**:2063-2074.
- 478 46. Doyle JJ, Doyle JL: **A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf**  
479 **tissue.** *Phytochemical Bulletin* 1987, **19**:11-15.
- 480 47. Inoue-Nagata AK, Albuquerque LC, Rocha WB, Nagata T: **A simple method for**  
481 **cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi29 DNA**  
482 **polymerase.** *J Virol Methods* 2004, **116**:209-211.
- 483 48. Higgins DG, Bleasby AJ, Fuchs R: **Clustal V - improved software for multiple**  
484 **sequence alignment.** *Computer Applications in the Biosciences* 1992, **8**:189-191.
- 485 49. Edgar RC: **MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high**  
486 **throughput.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**:1792-1797.
- 487 50. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S: **MEGA5: Molecular**  
488 **evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance,**  
489 **and maximum parsimony methods.** *Mol Biol Evol* 2011, **28**:2731-2739.
- 490 51. Martin DP, Rybicki EP: **RDP: detection of recombination amongst aligned**  
491 **sequences.** *Bioinformatics* 2000, **15**:562-563.
- 492 52. Martin DP, Posada D, Crandall KA, Williamson CA: **A modified bootscan algorithm**  
493 **for automated identification of recombinant sequence and recombination**  
494 **breakpoints.** *AIDS Res Hum Retrovir* 2005, **21**:98-102.
- 495 53. Smith JM: **Analyzing the mosaic structure of genes.** *J Mol Evol* 1992, **34**:126-129.
- 496 54. Posada D, Crandall KA: **The effect of recombination on the accuracy of phylogeny**  
497 **estimation.** *J Mol Evol* 2002, **54**:396-402.
- 498 55. Gibbs MJ, Armstrong JS, Gibbs AJ: **Sister-Scanning: a Monte Carlo procedure for**  
499 **assessing signals in recombinant sequences.** *Bioinformatics* 2000, **16**:573-582.
- 500 56. Boni MF, Posada D, Feldman MW: **An exact nonparametric method for inferring**  
501 **mosaic structure in sequence triplets.** *Genetics* 2007, **176**:1035-1047.

- 502 57. Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefevre P: **RDP3: a flexible and**  
503 **fast computer program for analyzing recombination.** *Bioinformatics* 2010, **26** 2462-  
504 2463.
- 505 58. Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, Ingersoll R,  
506 Sheppard HW, Ray SC: **Full-length *Human immunodeficiency virus type 1* genomes**  
507 **from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype**  
508 **recombination.** *J Virol* 1999, **73**:152-160.
- 509  
510  
511  
512  
513  
514  
515  
516  
517  
518  
519  
520  
521  
522  
523  
524  
525  
526  
527  
528  
529

## 530 **Legends**

531 **Figure 1: UPGMA phylogenetic tree based on a multiple alignment of the complete**  
 532 **sequences of the sweepoviruses described in this work (in bold) and those available in**  
 533 **public sequence databases.** Branches were bootstrapped with 1,000 replications. Acronyms are  
 534 described in Table 2. Representative sequences are included for New World (L14460, Tomato  
 535 mottle virus: ToMoV-[US:Flo:89]; U51137, Abutilon mosaic virus: AbMV-[US:Haw];  
 536 AF173555, Bean golden yellow mosaic virus: BGYMV-[MX:Chi]; and EF417915, Tomato  
 537 yellow vein streak virus: ToYVSV-[BR:Ba3]) and Old World begomoviruses (AF112352,  
 538 African cassava mosaic virus: ACMV-[CM:98]; AY705380, Cotton leaf curl Burewala virus:  
 539 CLCuBuV-[IN:Ban:04]; X74516, AYVV-SG[SG:92]; and AF071228, Tomato yellow leaf curl  
 540 virus: TYLCV-Mdl[ES:72:97]). The scale bar indicates the number of substitutions per site.  
 541 Bootstrap values >50% are indicated.

542 **Figure 2: Schematic representation of recombination events (A) and details of the**  
 543 **recombination breakpoints (B) detected in sweepoviruses.** The genome organization of a  
 544 typical sweepovirus is shown at the top of the figure. Each genome is represented by an open  
 545 box, colored according to the isolate. Numbers indicate recombination events described in B. R,  
 546 G, B, M, C, S and T indicate detection by RDP, GENCONV, BOOTSCAN, MAXCHI,  
 547 CHIMAERA, SISCAN and 3SEQ methods, respectively, with the presented highest p-value  
 548 being that determined by the method indicated in **bold** type.

549 **Figure 3: Evidence of recombination events in Brazilian sweepoviruses (A) SPLCV-**  
 550 **US[BR:RO:OPO:08], (B) SPLCV-BR[BR:BA:Uru:08], (C) SPLCESV-[BR:RO:Cac:08], (D)**  
 551 **SPGVV-PB[BR:BA:CA:08], (E) SPGVV-RO[BR:RO:Cac:08] and (F) SPLCV-**  
 552 **SP[BR:SP:PP:09].** SimPlot analyses were performed with full genome sequence alignments  
 553 using the Window 200bp, Step 20bp, GapStrip on Kimura (2-parameter) method.  
 554 Recombination points are shown by vertical lines.



555 **Additional File 1: Iterative elements [I, II and III direct (virion-sense) and IV inverted**  
556 **(complementary-sense) repeats] and corresponding iteron-related domains in the 5'-**  
557 **terminal regions of the Rep gene (Rep IRD) of sweepoviruses.** Presumed iteron sequences  
558 are colored as follows, blue for the IYVV, SPLCV-ES and SPLCV-IT group; pink for SPLCV-  
559 US[Lou:24]; yellow for SPLCLaV; and green for SPLCESV. The three iterative elements and  
560 the three different Rep IRDs present in this study are shown in **bold**.

561 **Additional File 2: Sweepovirus information:** Complete names and color representations of the  
562 pairwise sequence identity percentages (calculated with Clustal V, included in MegAlign-  
563 DNASTAR) of the complete genome sequences of sweepovirus isolates reported here and those  
564 available in the public sequence databases. The isolates present in this study are shown in **bold**.

**Table 1: Origins of the 34 sweepovirus isolates used in this study**

Sample Origin	Sample	Enzyme	Species	Strain[Isolate]	Acronym	Accession No	
SPEGB <sup>a</sup>	#167	EcoRV	SPLCV <sup>b</sup>	United States[Brazil:Bahia:Cruz das Almas1:2008]	SPLCV-US[BR:BA:CA1:08]	HQ393443	
SPEGB	#171	SacI		United States[Brazil:Bahia:Cruz das Almas2:2008]	SPLCV-US[BR:BA:CA2:08]	HQ393446	
SPEGB	#293	EcoRV		United States[Brazil:Para:2008]	SPLCV-US[BR:PA:08]	HQ393450	
SPEGB	#325	SacI		United States[Brazil:Rondonia:Porto Velho:2008]	SPLCV-US[BR:RO:PV:08]	HQ393451	
SPEGB	#337	EcoRV		United States[Brazil:Rondonia:Ouro Preto do Oeste:2008]	SPLCV-US[BR:RO:OPO:08]	HQ393453	
Sao Paulo	#SP12	BamHI		United States[Brazil:Sao Paulo:Alfredo Marcondes1:2009]	SPLCV-US[BR:SP:AM1:09]	HQ393471	
Sao Paulo	#SP12	SacI		United States[Brazil:Sao Paulo:Alfredo Marcondes2:2009]	SPLCV-US[BR:SP:AM2:09]	HQ393472	
Sao Paulo	#SP88	BamHI		United States[Brazil:Sao Paulo:Alfredo Marcondes3:2009]	SPLCV-US[BR:SP:AM3:09]	HQ393474	
Sao Paulo	#SP130	BamHI		United States[Brazil:Sao Paulo:Alfredo Marcondes4:2009]	SPLCV-US[BR:SP:AM4:09]	HQ393475	
Sao Paulo	#SP140	BamHI		Sao Paulo[Brazil:Sao Paulo:Presidente Prudente:2009]	SPLCV-SP[BR:SP:PP:09]	HQ393476	
SPEGB	#134	SpeI		Brazil[Brazil:Bahia:Urucuca:2008]	SPLCV-BR[BR:BA:Uru:08]	HQ393442	
SPEGB	#171	BamHI		Brazil[Brazil:Bahia:Cruz das Almas:2008]	SPLCV-BR[BR:BA:CA:08]	HQ393445	
SPEGB	#235	BamHI		Brazil[Brazil:Sergipe:Riachao:2008]	SPLCV-BR[BR:SE:Ria:08]	HQ393449	
SPEGB	#337	SacI		Brazil[Brazil:Rondonia:Ouro Preto do Oeste:2008]	SPLCV-BR[BR:RO:OPO:08]	HQ393455	
SPEGB	#370	SacI		Brazil[Brazil:Rondonia:Cacoal:2008]	SPLCV-BR[BR:RO:Cac:08]	HQ393460	
SPEGB	#346	EcoRV		Pernambuco[Brazil:Rondonia:Porto Velho:2008]	SPLCV-PE[BR:RO:PV:08]	HQ393456	
Paraiba	#PB82	SacI		Pernambuco[Brazil:Paraiba:Pedras de Fogo:2008]	SPLCV-PE[BR:PB:PF:08]	HQ393461	
Pernambuco	#PE49	BamHI		Pernambuco[Brazil:Penambuco:Camocin de São Félix1:2008]	SPLCV-PE[BR:PE:CSF1:08]	HQ393462	
Pernambuco	#PE49	SacI		Pernambuco[Brazil:Pernambuco:Camocin de São Félix2:2008]	SPLCV-PE[BR:PE:CSF2:08]	HQ393463	
Rio Grande do Sul	#RS9	BamHI		Pernambuco[Brazil:Rio grande do Sul:Mariana Pimentel1:2009]	SPLCV-PE[BR:RS:MP1:09]	HQ393464	
Rio Grande do Sul	#RS9	SacI		Pernambuco[Brazil:Rio Grande do Sul:Mariana Pimentel2:2009]	SPLCV-PE[BR:RS:MP2:09]	HQ393465	
Rio Grande do Sul	#RS24	SacI		Pernambuco[Brazil:Rio Grande do Sul:Mariana Pimentel4:2009]	SPLCV-PE[BR:RS:MP4:09]	HQ393466	
Rio Grande do Sul	#RS29	BamHI		Pernambuco[Brazil:Rio Grande do Sul:Mariana Pimentel5:2009]	SPLCV-PE[BR:RS:MP5:09]	HQ393467	
Rio Grande do Sul	#RS33	BamHI		Pernambuco[Brazil:Rio Grande do Sul:Mariana Pimentel6:2009]	SPLCV-PE[BR:RS:MP6:09]	HQ393468	
Rio Grande do Sul	#RS52	BamHI		Pernambuco[Brazil:Rio Grande do Sul:Mariana Pimentel7:2009]	SPLCV-PE[BR:RS:MP7:09]	HQ393469	
Rio Grande do Sul	#RS52	SacI		Pernambuco[Brazil:Rio Grande do Sul:Mariana Pimentel3:2009]	SPLCV-PE[BR:RS:MP3:09]	HQ393470	
SPEGB	#171	BamHI		SPGVV <sup>c</sup>	Paraiba[Brazil:Bahia:Cruz das Almas:2008]	SPGVV-PB[BR:BA:CA:08]	HQ393444
SPEGB	#184	SacI			Rondonia[Brazil:Bahia:Utinga:2008]	SPGVV-RO[BR:BA:Uti:08]	HQ393447
SPEGB	#325	SacI			Rondonia[Brazil:Rondonia:Porto Velho1:2008]	SPGVV-RO[BR:RO:PV1:08]	HQ393452
SPEGB	#337	EcoRV			Rondonia[Brazil:Rondonia:Ouro Preto do Oeste:2008]	SPGVV-RO[BR:RO:OPO:08]	HQ393454
SPEGB	#346	EcoRV			Rondonia[Brazil:Rondonia:Porto Velho2:2008]	SPGVV-RO[BR:RO:PV2:08]	HQ393457
SPEGB	#370	BamHI			Rondonia[Brazil:Rondonia:Cacoal:2008]	SPGVV-RO[BR:RO:Cac:08]	HQ393459
SPEGB	#184	SpeI		SPLCESV <sup>d</sup>	[Brazil:Bahia:Utinga:2008]	SPLCESV-[BR:BA:Uti:08]	HQ393448
SPEGB	#370	BamHI			[Brazil:Rondonia:Cacoal:2008]	SPLCESV-[BR:RO:Cac:08]	HQ393458

<sup>a</sup> Sweet potato Embrapa Germplasm Bank<sup>b</sup> Sweet potato leaf curl virus<sup>c</sup> Sweet potato golden vein virus<sup>d</sup> Sweet potato leaf curl Spain virus

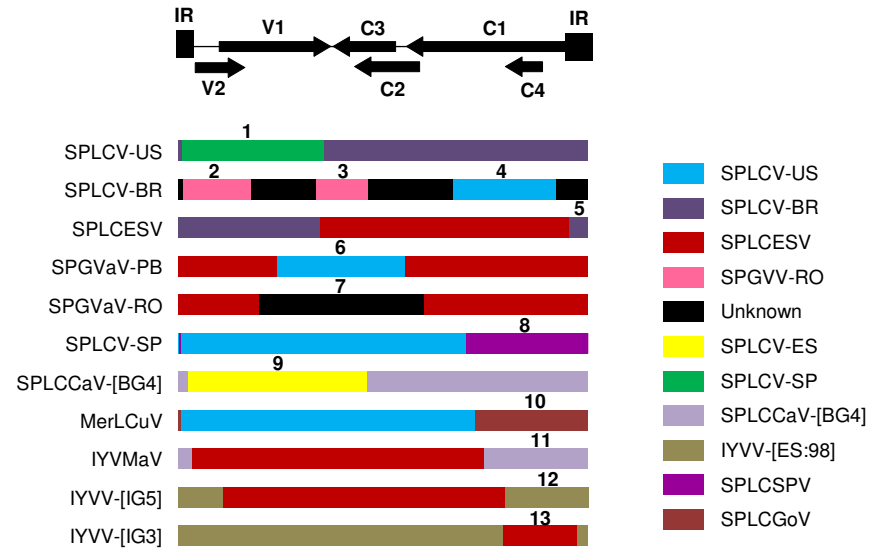
Table 2: Sweepvirus sequences used in this study

Species-strain	Accession No	Available database (GenBank)	Origin	Reference	Acronym suggested in this study <sup>a</sup>
SPLCV-US	FJ969834	SPLCV-RS2[BR:Est1]	Brazil	Paprotka et al., 2010	SPLCV-US[BR:RS:Est1:07]
	FJ969837	SPLCV-RS2[BR:Ros1]	Brazil	Paprotka et al., 2010	SPLCV-US[BR:RS:Ros1:07]
	FJ969835	SPLCV-RS2[BR:Mac1]	Brazil	Paprotka et al., 2010	SPLCV-US[BR:RS:Mac1:07]
	FJ969836	SPLCV-RS2[BR:Poa1]	Brazil	Paprotka et al., 2010	SPLCV-US[BR:RS:Poa1:07]
	HM754641	SPLCV-[Haenam1]	South Korea	GenBank	SPLCV-US[KR:Hae1:09]
	HM754637	SPLCV-[Yeojuo 507]	South Korea	GenBank	SPLCV-US[KR:Yeo507:09]
	FJ560719	SPLCKrV-[J-508]	South Korea	GenBank	SPLCV-US[KR:Yeo:08]
	HM754639	SPLCV-[Haenam532]	South Korea	GenBank	SPLCV-US[KR:Hae532:09]
	HM754638	SPLCV-[Haenam 519-3]	South Korea	GenBank	SPLCV-US[KR:Hae519:09]
	HM754635	SPLCV-[Yeojuo 388]	South Korea	GenBank	SPLCV-US[KR:Yeo388:09]
	HM754636	SPLCV-[Nonsan 445-2]	South Korea	GenBank	SPLCV-US[KR:Non445-2:09]
	HM754634	SPLCV-[Chungju 263]	South Korea	GenBank	SPLCV-US[KR:Chu263:09]
	HM754640	SPLCV-[Haenam 618-2]	South Korea	GenBank	SPLCV-US[KR:Hae618:09]
	AF104036	SPLCV-US[US:Lou:94]	USA	Lotrakul & Valverde, 1999	SPLCV-US[US:Lou:94]
	FJ176701	SPLCV-[Eastern China]	China	GenBank	SPLCV-US[CN:Jia:08]
	AB433788	SPLCV-[Japan:Kyoto:1998]	Japan	GenBank	SPLCV-US[JR:Kyo:98]
	HQ333141	SPLCV-[US:MS:WS1-4]	USA	Zhang & Ling, 2011	SPLCV-US[US:MS:WS1-4:07]
	HQ333142	SPLCV-[US:MS:WS3-8]	USA	Zhang & Ling, 2011	SPLCV-US[US:MS:WS3-8:07]
HQ333140	SPLCV-[US:MS:4B-14]	USA	Zhang & Ling, 2011	SPLCV-US[US:MS:4b-14:07]	
HQ333139	SPLCV-[US:MS:1B-1A]	USA	Zhang & Ling, 2011	SPLCV-US[US:MS:1b-1a:07]	
SPLCV-CN	EU267799	SPLCV-[RL7]	China	GenBank	SPLCV-CN[CN:Yn:RL7:06]
	FN806776	SPLCV-[Y338]	China	GenBank	SPLCV-CN[CN:Yn338:09]
	EU253456	SPLCV-[RL31]	China	GenBank	SPLCV-CN[CN:Yn:RL31:07]
SPLCV-SP	HQ393473	SPLCV-SP[BR:AlvM:09]	Brazil	Albuquerque et al., 2011	SPLCV-SP[BR:SP:AlvM:09]
SPLCV-JP	AB433787	SPLCV-[Japan:Kumamoto:1998]	Japan	GenBank	SPLCV-JP[JR:Kum:98]
	AB433786	SPLCV-[Japan:Miyazaki:1996]	Japan	GenBank	SPLCV-JP[JR:Miy:96]
SPLCV-SC	HQ333138	SPLCV-[US:SC:646B-11]	USA	Zhang & Ling, 2011	SPLCV-SC[US:SC:646-B11:06]
	HQ333137	SPLCV-[US:SC:634-7]	USA	Zhang & Ling, 2011	SPLCV-SC[US:SC:634-7:06]
	HQ333135	SPLCV-[US:SC:377-23]	USA	Zhang & Ling, 2011	SPLCV-SC[US:SC:377-23:06]
	HQ333136	SPLCV-[US:SC:634-2]	USA	Zhang & Ling, 2011	SPLCV-SC[US:SC:634-2:06]
SPLCV-PR	DQ644563	SPLCV-[N4]	Puerto Rico	GenBank	SPLCV-PR[PR:Me-N4:06]
	DQ644562	SPLCV-[PR80-N2]	Puerto Rico	GenBank	SPLCV-PR[PR:80-N2:06]
SPLCV-Fu	FJ515898	SPLCV-[Fp-3]	China	Yang et al., 2009	SPLCV-Fu[CN:Fj:Fp3:07]
	FJ515897	SPLCV-[Fp-2]	China	Yang et al., 2009	SPLCV-Fu[CN:Fj:Fp2:07]
	FJ515896	SPLCV-[Fp-1]	China	Yang et al., 2009	SPLCV-Fu[CN:Fj:Fp1:07]
SPLCV-ES	EU856364	SPLCV-ES[ES:CI:BG12:02]	Spain	Lozano et al., 2009	SPLCV-ES[ES:CI:BG12:02]
	EF456744	SPLCV-ES[ES:CI:BG6:02]	Spain	Lozano et al., 2009	SPLCV-ES[ES:CI:BG6:02]
	EU856366	SPLCV-ES[ES:CI:BG13:02]	Spain	Lozano et al., 2009	SPLCV-ES[ES:CI:BG13:02]
SPLCV-IT	AJ586885	SPLCV-IT[IT:Sic:02]	Italy	Briddon et al., 2005	SPLCV-IT[IT:Sic:02]
SPLCLaV-BR	FJ969833	SPLCV-RS1[BR:Tav1]	Brazil	Paprotka et al., 2010	SPLCLaV-BR[BR:RS:Tav1:07]
SPLCLaV-ES	EF456746	SPLCLaV-[ES:CI:BG27:02]	Spain	Lozano et al., 2009	SPLCLaV-ES[ES:CI:BG27:02]
	EU839579	SPLCLaV-[ES:Mal:BG30:06]	Spain	Lozano et al., 2009	SPLCLaV-ES[ES:Mal:BG30:06]
SPLCBeV	FN432356	SPLCBV-[India:West Bengal:2008]	India	GenBank	SPLCBeV-[IN:WB:08]
SPLCBRV	FJ969832	SPLCV-CE[BR:For1]	Brazil	Paprotka et al., 2010	SPLCBRV-[BR:CE:For1:07]
SPLCCaV	EF456742	SPLCCaV-[ES:CI:BG4:02]	Spain	Lozano et al., 2009	SPLCCaV-[ES:CI:BG4:02]
	EF456745	SPLCCaV-[ES:CI:BG7:02]	Spain	Lozano et al., 2009	SPLCCaV-[ES:CI:BG7:02]
	EU856365	SPLCCaV-[ES:CI:BG21:02]	Spain	Lozano et al., 2009	SPLCCaV-[ES:CI:BG21:02]
	FJ529203	SPLCCaV-[ES:CI:BG25:02]	Spain	Lozano et al., 2009	SPLCCaV-[ES:CI:BG25:02]
SPLCShV	EU309693	SPLCV	China	GenBank	SPLCShV-[CN:Sha:07]
SPLCGoV	AF326775	SPLCGV-[16]	USA	Lotrakul et al., 2003	SPLCGoV-[US:Geo:16]
MerLCuV-US	HQ333143	SPGVaV-[US:MS:1B-3]	USA	Zhang & Ling, 2011	MerLCuV-US[US:MS:1B-3:07]
MerLCuV-BR	FJ969829	SPGVaV-PA[BR:Bel1]	Brazil	Paprotka et al., 2010	MerLCuV-BR[BR:PA:Bel1:07]
MerLCuV-PR	DQ644561	MeLCV-[PR:N1]	Puerto Rico	GenBank	MerLCuV-PR[PR:N1:06]
IYVMaV	EU839576	IYVV-[ES:Mal:IG1:06]	Spain	Lozano et al., 2009	IYVMaV-[ES:Mal:IG1:06]
IYVV	EU839578	IYVV-[ES:Mal:IG5:06]	Spain	Lozano et al., 2009	IYVV-[ES:Mal:IG5:06]
	AJ132548	IYVV-[ES:98]	Spain	Banks et al., 1999	IYVV-[ES:98]
	EU839577	IYVV-[ES:Mal:IG3:06]	Spain	Lozano et al., 2009	IYVV-[ES:Mal:IG3:06]
SPLCSPV	HQ393477	SPLCSPV-[BR:AlvM:09]	Brazil	Albuquerque et al., 2011	SPLCSPV-[BR:SP:AlvM:09]
SPMV	FJ969831	SPMaV-[BR:BSB1]	Brazil	Paprotka et al., 2010	SPMV-[BR:BSB1:07]
SPLCSCV	HQ333144	SPLCSCV-[US:SC:648B-9]	USA	Zhang & Ling, 2011	SPLCSCV-[US:SC:648-B9:06]
SPLCUV	FR751068	SPLCUV-[UG:KAMP:08]	Uganda	Wasswa et al., 2011	SPLCUV-[UG:KAMP:08]
	EF456741	SPLCESV-[ES:CI:BG1:02]	Spain	Lozano et al., 2009	SPLCESV-[ES:CI:BG1:02]
	EF456743	SPLCESV-[ES:CI:BG5:02]	Spain	Lozano et al., 2009	SPLCESV-[ES:CI:BG5:02]
SPLCESV	FJ151200	SPLCESV-[ES:Mal:IG2:06]	Spain	Lozano et al., 2009	SPLCESV-[ES:Mal:IG2:06]
	SPGVV-PB	FJ969830	SPGVaV-PB1[BR:Sou1]	Brazil	Paprotka et al., 2010
SPLCCNV	DQ512731	SPLCV-[CN]	China	Luan et al., 2007	SPLCCNV-[CN:05]
	JF736657	SPLCV-B3	China	GenBank	SPLCCNV-[CN:Zhe:10]

<sup>a</sup>Complete names of the viruses are shown in Additional File 2



A



B

Event	Recombinant	Major Parent (% identity)	Minor Parent (% identity)	Breakpoints		Methods	P-value
				Begin (ORF)	End (ORF)		
1	SPLCV-US[BR:RO:OPO:08]	SPLCV-BR[BR:OPO:08] (99.9)	SPLCV-SP[BR:AlvM:09] (99.8)	37 (IR)	1006 (V1)	RGBMCST	2.8 x10 <sup>-19</sup>
2	SPLCV-BR[BR:BA:Uru:08]	Unknown	SPGVV-RO[BR:BA:Uti:08] (>97.4)	58 (IR)	523 (V1)	RGBMCST	7.6 x10 <sup>-09</sup>
	SPLCV-BR[BR:BA:CA:08]			45 (IR)	541 (V1)		
	SPLCV-BR[BR:RO:Cac:08]			58 (IR)	524 (V1)		
3	SPLCV-BR[BR:BA:Uru:08]	Unknown	SPGVV-RO[BR:BA:Uti:08] (99.2)	45 (IR)	541 (V1)	RGBMCST	2.7 x10 <sup>-23</sup>
	SPLCV-BR[BR:BA:Uru:08]			955 (V1)	1325 (C2/C3)		
	SPLCV-BR[BR:BA:CA:08]						
4	SPLCV-BR[BR:BA:Uru:08]	Unknown	SPLCV-US[BR:RO:OPO:08] (99.6)	1926 (C1)	2614 (C1)	RGBMCST	1.1 x10 <sup>-38</sup>
	SPLCV-BR[BR:BA:CA:08]						
	SPLCV-BR[BR:RO:Cac:08]						
5	SPLCESV-[BR:RO:Cac:08]	SPLCESV-[BR:BA:Uti:08] (97.8)	SPLCV-BR[BR:BA:CA:08] (99.4)	2770 (IR)	994 (V1)	RGBMCST	6.7 x10 <sup>-41</sup>
6	SPGVV-PB[BR:BA:CA:08]	SPLCESV-[BR:RO:Cac:08] (99.3)	SPLCV-US[BR:PA:08] (100)	698 (V1)	1589 (C2)	RGBMCST	2.6 x10 <sup>-48</sup>
7	SPGVV-RO[BRRO:Cac08]	SPLCESV-[BR:RO:Cac:08] (99.6)	Unknown	581 (V1)	1727 (C1)	RGBMCST	6.1 x10 <sup>-50</sup>
	SPGVV-RO[BR:RO:PV2:08]						
	SPGVV-RO[BR:RO:OPO:08]						
	SPGVV-RO[BR:BA:Uti:08]						
8	SPGVV-RO[BR:SE:PV1:08]	SPLCV-US[BR:RS:Ros1:07] (99.8)	SPLCSPV-[BR:SP:AlvM:09] (99.7)	2007 (C1)	24 (IR)	RGBMCST	4.7 x10 <sup>-47</sup>
	SPLCV-SP[BR:SP:PP:09]						
	SPLCV-SP[BR:SP:PP:09]						
9	SPLCCaV-[ES:CI:BG4:06]	SPLCCaV-[ES:CI:BG25:02] (99.8)	SPLCV-ES[ES:CI:BG6:02] (99.8)	84 (V2)	1349 (C2/C3)	RGBMCST	2.4 x10 <sup>-15</sup>
10	MerLCuV-US[US:MS:1B-3:07]	SPLCV-US[US:MS:WS1-4:07] (97.5)	SPLCGoV-[US:Geo16] (97.3)	2081 (C1)	13 (IR)	RGBMCST	3.2 x10 <sup>-34</sup>
11	IYVMaV-[ES:Mal:IG1:06]	SPLCESV-[ES:Mal:IG2:06] (99.7)	SPLCCaV-[ES:CI:BG4:02] (97.4)	2186 (C1)	96 (IR)	RGBMCST	5.7 x10 <sup>-61</sup>
12	IYVV[ES:Mal:IG5:06]	SPLCESV-[ES:CI:BG5:02] (98.8)	IYVV-[ES:98] (97)	2247 (C1/C4)	325 (V1/V2)	RGBMCST	1.6 x10 <sup>-37</sup>
13	IYVV-[ES:Mal:IG3:06]	IYVV-[ES:98] (98.8)	SPLCESV-[ES:CI:BG5:02] (99)	2230 (C1/C3)	2748 (IR)	RGBMCST	2.8 x10 <sup>-48</sup>

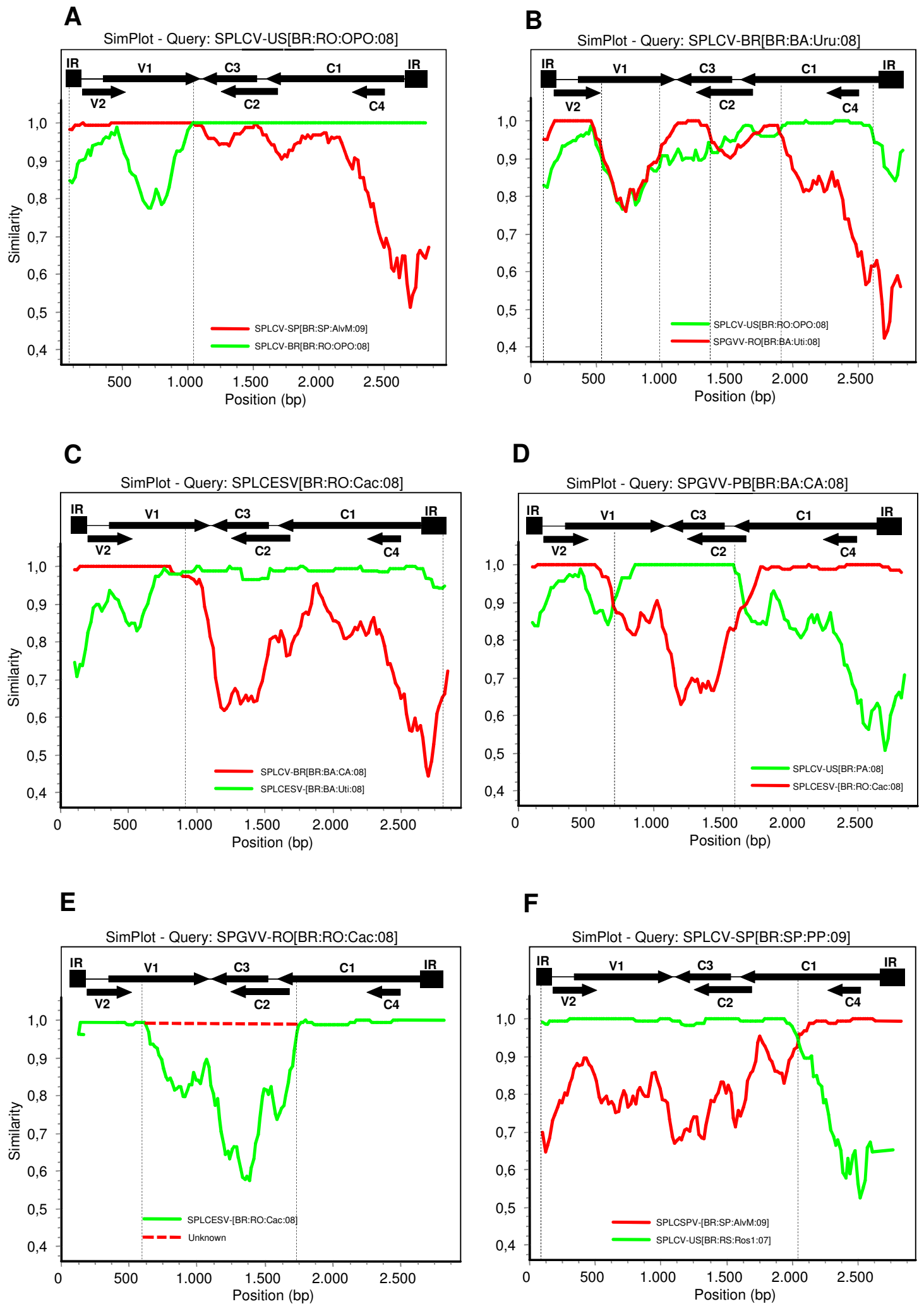


Figure 3

**Additional files provided with this submission:**

Additional file 1: Additional file 1.pdf, 19K

<http://www.virologyj.com/imedia/8607847396704757/supp1.pdf>

Additional file 2: Additional file 2.pdf, 49K

<http://www.virologyj.com/imedia/7362340767047572/supp2.pdf>