

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**UNIDADE ACADÊMICA CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – PRODUÇÃO VEGETAL E**  
**PROTEÇÃO DE PLANTAS**

**ESTRUTURA GENÉTICA DE UMA POPULAÇÃO DO BEGOMOVÍRUS *Bean*  
*golden mosaic virus* (BGMV) QUE INFECTA FAVA (*Phaseolus lunatus* L.) NO**  
**ESTADO DE ALAGOAS**

**ROBERTO RAMOS SOBRINHO**

**RIO LARGO**  
**ALAGOAS – BRASIL**  
**JULHO – 2010**

**ROBERTO RAMOS SOBRINHO**

**ESTRUTURA GENÉTICA DE UMA POPULAÇÃO DO BEGOMOVÍRUS *Bean*  
*golden mosaic virus* (BGMV) QUE INFECTA FAVA (*Phaseolus lunatus* L.) NO  
ESTADO DE ALAGOAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal e Proteção de Plantas.

Orientador: Iraíldes Pereira Assunção

Co-orientador: Gaus S. A. de Lima

**RIO LARGO  
ALAGOAS – BRASIL  
JULHO – 2010**

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

**Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale**

R175e Ramos Sobrinho, Roberto.

Estrutura genética de uma população de begomovírus *Bean golden mosaic virus* (BGMV) que infecta fava (*Phaseolus lunatus* L.) no estado de Alagoas / Roberto Ramos Sobrinho, 2010.

xi, 51f. : il., tabs. e graf.

Orientadora: Iraíldes Pereira Assunção.

Co-Orientador: Gaus Silvestre de Andrade Lima.

Dissertação (mestrado em Agronomia : Produção Vegetal e Proteção de Plantas)

– Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2010.

Bibliografia: f. 36-49.

Inclui material complementar.

1. Feijão-fava. 2. *Phaseolus lunatus*. 3. Genética. 4. Begomovírus. I. Título.

CDU: 635.654

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

### **ESTRUTURA GENÉTICA DE UMA POPULAÇÃO DO BEGOMOVÍRUS *Bean golden mosaic virus* (BGMV) QUE INFECTA FAVA (*Phaseolus lunatus* L.) NO ESTADO DE ALAGOAS**

**Roberto Ramos Sobrinho**  
**(Matrícula: 0810M11)**

Dissertação apresentada e avaliada pela banca examinadora em 22 de fevereiro de 2010, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal e Proteção de Plantas do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Unidade Acadêmica Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas.

---

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. IRAÍLDES PEREIRA ASSUNÇÃO  
CECA/UFAL (ORIENTADORA)

---

PROF. DR. GAUS SILVESTRE ANDRADE DE LIMA  
CECA/UFAL

---

PROF. DR. FRANCISCO MURILO ZERBINI JÚNIOR  
FITOPATOLOGIA/UFV

---

PROF. DR. CÍCERO CARLOS DE SOUZA ALMEIDA  
CAMPUS ARAPIRACA/UFAL

*À minha mãe, Anilza Rocha, ao meu pai José Neto e ao meu padrasto Gildásio dos Santos pelo esforço e dedicação na minha criação;*

*À minha namorada e companheira, Sheila Tavares, pela compreensão, carinho e por se fazer presente em todos os momentos de dificuldade e alegria;*

*À minha família e a todos que contribuíram de uma forma ou de outra neste trabalho.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

- *A Deus pelo dom da vida e por me dar força e sustentação durante as adversidades encontradas durante a realização deste trabalho;*
- *Aos Professores Iraíldes Pereira Assunção e Gaus Silvestre Andrade de Lima pela orientação, confiança, amizade e ensinamentos passados durante todo esse período. Sem eles nada disso seria possível;*
- *Aos Professores Francisco Murilo Zerbini Júnior e Polyane Alfenas Zerbini, por terem apostado em minha capacidade mesmo sem me conhecer (serei sempre grato);*
- *Ao Prof. Luiz Carlos Caetano pelo conhecimento imensurável transmitido, amizade, apoio, dedicação;*
- *À professora Fátima pelos ensinamentos, simplicidade e dedicação em tudo que faz, e pela pessoa maravilhosa que é;*
- *Aos meus avós, Manoel Vieira Ramos, Maria do Socorro Ramos, Antônio Rocha e Maria Helena Alves, por acreditarem e ensinarem sempre que eu podia ser mais;*
- *Aos meus irmãos pelo apoio e por estarem presentes em minha vida;*
- *A todos os meus amigos que fazem o Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Microrganismos Endofíticos do Instituto de Química e Biotecnologia;*

- *Aos meus amigos do Laboratório de Fitopatologia Molecular, Edilene, Joyce, Igor, Érica, Liliâne, Luciana, Edllaine, Wellington, Bárbara, Édipo, João, Humberto, Isadora, e em especial ao meu amigo Mariote Neto pelos ensinamentos;*
- *Aos meus amigos do Laboratório de Virologia Vegetal Molecular da Universidade Federal de Viçosa, Jorge, Alison, Renan, Antônio, Joaquim, Tatiana, Daniele, Daniela, Fábio, Carol, César, Francisco, Larissa, Fernanda, Amanda, Álvaro, e em especial à Sarah Cavalcante;*
- *Aos colegas de mestrado que cursaram disciplinas comigo, pelo apoio e amizade;*
- *A todos que fazem o Centro de Ciências Agrárias;*
- *À Fapeal pelo apoio com a bolsa de mestrado e pela orientação na confecção de todos os relatórios;*
- *Aos meus amigos e familiares, por terem suportado e entendido minha ausência e por acreditarem que não existe distância para uma verdadeira amizade.*

## SUMÁRIO

|                                                                                 |             |
|---------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Dedicatória.....</b>                                                         | <b>i</b>    |
| <b>AGRADECIMENTOS.....</b>                                                      | <b>ii</b>   |
| <b>SUMÁRIO.....</b>                                                             | <b>iv</b>   |
| <b>LISTA DE TABELAS.....</b>                                                    | <b>v</b>    |
| <b>LISTA DE FIGURAS.....</b>                                                    | <b>vi</b>   |
| <b>RESUMO.....</b>                                                              | <b>viii</b> |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                                            | <b>ix</b>   |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                                       | <b>1</b>    |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                                            | <b>4</b>    |
| 2.1. Aspectos gerais da cultura da fava.....                                    | 4           |
| 2.2. Família <i>Geminiviridae</i> .....                                         | 5           |
| 2.3. Replicação viral.....                                                      | 8           |
| 2.4. Movimento célula-a-célula e a longa distância.....                         | 9           |
| 2.5. Evolução dos geminivírus.....                                              | 10          |
| 2.6. Diversidade e estrutura genética de populações de begomovírus.....         | 11          |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                              | <b>18</b>   |
| 3.1. Material vegetal e DNA viral.....                                          | 18          |
| 3.2. Clonagem e sequenciamento dos genomas virais.....                          | 20          |
| 3.3. Comparações de sequências e análise filogenética.....                      | 22          |
| 3.4. Análise da estrutura genética da população viral.....                      | 22          |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                           | <b>23</b>   |
| 4.1. Clonagem e sequenciamento dos genomas virais.....                          | 23          |
| 4.1.1. Amplificação dos genomas virais completos.....                           | 23          |
| 4.1.2. Clonagem dos fragmentos correspondentes a uma cópia do genoma viral..... | 24          |
| 4.1.3. Caracterização molecular.....                                            | 26          |
| 4.2. Análise filogenética.....                                                  | 28          |
| 4.3. Determinação da estrutura genética da população de BGMV de fava.....       | 32          |
| <b>5. CONCLUSÕES.....</b>                                                       | <b>35</b>   |
| <b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                       | <b>36</b>   |
| <b>Material Suplementar.....</b>                                                | <b>50</b>   |



## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Lista de amostras de fava coletadas e sua procedência.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 20 |
| Tabela 2. Oligonucleotídeos internos utilizados para sequenciamento dos isolados de begomovírus.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 21 |
| Tabela 3. Lista de clones completamente sequenciados e procedência das amostras de <i>Phaseolus lunatus</i> (fava).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 27 |
| Tabela 4. Estrutura genética da população de <i>Bean golden mosaic virus</i> (BGMV) de Alagoas (municípios de Arapiraca, Atalaia, Belém, Chã Preta, Coité do Noia, Estrela de Alagoas, Maceió, Mar Vermelho, Marimbondo, Paulo Jacinto, Rio Largo, Santana do Mundaú, União dos Palmares e Viçosa), em comparação com populações de <i>Tomato yellow vein streak virus</i> (ToYVSV) e <i>Tomato common mosaic virus</i> (ToCmMV) da região Sudeste do Brasil (municípios de Coimbra, MG e Paty do Alferes, RJ). Dados referentes ao DNA-A ..... | 34 |
| Tabela S1. Isolados de begomovírus utilizados para comparação filogenética com os isolados de fava ( <i>Phaseolus lunatus</i> ).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 50 |
| Tabela S2. Porcentagem de identidade entre as sequências de nucleotídeos completa do DNA-A dos isolados de fava ( <i>Phaseolus lunatus</i> ) e outros begomovírus proximamente relacionados.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 51 |

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação esquemática do genoma de um begomovírus bissegmentado. Os círculos representam o genoma viral, composto de dois componentes (DNA-A e DNA-B) com aproximadamente 2600 nucleotídeos cada um. As setas indicam os genes virais e a direção em que ocorre a transcrição: *rep* “replication-associated protein”; *Trap* “trans-activating protein”; *ren* “replication-enhancer protein”; *cp* “coat protein”; *mp* “movement protein”; *nsp* “nuclear shuttle protein”. A ORF AC5, que se encontra presente em apenas algumas espécies também está representada..... 7
- Figura 2. Municípios do estado de Alagoas onde as amostras de fava foram coletadas..... 18
- Figura 3. Plantas de fava exibindo sintomas típicos de infecção por begomovírus observadas no município de Maceió. **A** – Planta exibindo sintoma de mosaico dourado; **B** – Planta exibindo sintomas de mosaico e deformação foliar..... 19
- Figura 4. Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) de amplicons obtidos a partir de amostras de DNA total e, submetidos à clivagem com enzima de restrição *Bam*H I. **M**, marcador de comprimento (“1 Kb plus DNA ladder”, em nucleotídeos); **1-15**, amplicons obtidos a partir da amostra coletada em: **1**, Arapiraca; **2**, Estrela de Alagoas; **3**, Recife; **4**, Coité do Noia; **5**, Belém; **6**, Marimbondo; **7**, Maceió; **8**, Mar Vermelho; **9**, Paulo Jacinto; **10**, Atalaia; **11**, União dos Palmares; **12**, Santana do Mundaú; **13**, Chã Preta; **14**, Viçosa; **15**, Rio Largo..... 23
- Figura 5. Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) de minipreparações de DNA plasmidial obtidas a partir de colônias contendo possíveis plasmídeos recombinantes. **M**, marcador de comprimento (“1 Kb plus DNA ladder”, em nucleotídeos); **1-75**, minipreparações obtidas de clones correspondentes a amostras coletas em: **1-5**, Arapiraca; **6-10**, Estrela de Alagoas; **11-15**, Viçosa; **16-20**, Coité do Noia; **21-25**, Recife; **26-30**, Belém; **31-35**, Marimbondo; **36-40**, Mar Vermelho; **41-45**, Paulo Jacinto; **46-50**, Atalaia; **51-55**, União dos Palmares; **56-60**, Santana do Mundaú; **61-65**, Chã Preta; **66-70**, Rio Largo; **71-75**, Maceió..... 24
- Figura 6. Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) da clivagem de DNA plasmidial proveniente da clonagem de componentes genômicos, com as enzimas *Hind* III (amostra de Viçosa) e *Bam*H I. **M**, marcador de comprimento (“1 Kb plus DNA ladder”, em nucleotídeos); **1-75**, clones obtidos a partir de amostras coletas em: **1-5**, Arapiraca; **6-10**, Estrela de Alagoas; **11-15**, Viçosa; **16-20**, Coité do Noia; **21-25**, Recife; **26-30**, Belém; **31-35**, Marimbondo; **36-40**, Mar Vermelho; **41-45**, Paulo Jacinto; **46-50**, Atalaia; **51-55**, União dos Palmares; **56-60**, Santana do Mundaú; **61-65**, Chã Preta; **66-70**, Rio Largo; **71-75**, Maceió..... 25

Figura 7. Padrão eletroforético em gel de agarose (1,5%) da clivagem de DNA plasmidial proveniente da clonagem de componentes genômicos com a enzima de restrição *Hae* III. **M**, marcador de comprimento (“1 Kb plus DNA ladder”, em nucleotídeos); **1-75**, DNA plasmidial dos clones correspondentes a amostras coletas em: **1-5**, Arapiraca; **6-10**, Estrela de Alagoas; **11-15**, Viçosa; **16-20**, Coité do Noia; **21-25**, Recife; **26-30**, Belém; **31-35**, Marimbondo; **36-40**, Mar Vermelho; **41-45**, Paulo Jacinto; **46-50**, Atalaia; **51-55**, União dos Palmares; **56-60**, Santana do Mundaú; **61-65**, Chã Preta; **66-70**, Rio Largo; **71-75**, Maceió..... 26

Figura 8. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento de sequências completas de nucleotídeos do DNA-A de 22 isolados de *Bean golden mosaic virus* provenientes de fava (*Phaseolus lunatus*) e outros begomovírus do Brasil. A árvore foi obtida pelo programa MEGA 4 utilizando o método Neighbor-joining com análise “bootstrap” (2000 repetições). A barra horizontal indica o valor de substituições por sítio..... 30

Figura 9. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento de sequências completas de nucleotídeos do DNA-A de 22 isolados de *Bean golden mosaic virus* provenientes de fava (*Phaseolus lunatus*). A árvore foi obtida pelo programa MEGA 4 utilizando o método Neighbor-joining com análise “bootstrap” (2000 repetições). A barra horizontal indica o valor de substituições por sítio..... 31

## RESUMO

A fava (*Phaseolus lunatus*) é uma das quatro espécies do gênero *Phaseolus* exploradas comercialmente. A espécie foi domesticada na América do Sul ou Central. É uma das principais leguminosas cultivadas na região tropical e apresenta potencial para fornecimento de proteína vegetal à população. Entre as doenças mais importantes estão as viroses, principalmente aquelas ocasionadas por begomovírus (família *Geminiviridae*). As plantas infectadas apresentam um mosaico amarelo intenso e têm a produtividade drasticamente reduzida. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a estrutura genética dos begomovírus que infectam fava no estado de Alagoas, através da análise da sequência completa do DNA-A. Plantas de fava com sintomas típicos de infecção por begomovírus foram coletadas em áreas produtoras localizadas nos estados de Alagoas e Pernambuco no ano de 2005. Foi então realizada a extração de DNA, e confirmada por PCR a presença de begomovírus. Os componentes genômicos foram amplificados utilizando-se a enzima DNA polimerase do bacteriófago phi29, clivados com as enzimas de restrição *Bam*H I e *Hind* III, ligados ao vetor pBluescript KS+ e utilizados para transformação de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Os clones foram submetidos a digestão com a enzima *Hae* III e, de acordo com o padrão eletroforético observado, 22 clones (20 provenientes de amostras de Alagoas e 2 de Pernambuco) foram selecionados para sequenciamento. A análise filogenética foi realizada utilizando-se o programa MEGA 4.0 através do método “Neighbour-Joining”. A avaliação de diversidade genética foi realizada utilizando-se o programa DnaSP versão 5. Análise das 22 sequências obtidas revelou que apenas uma espécie de begomovírus estava infectando as amostras de fava, o *Bean golden mosaic virus*, apresentando entre 90% e 94% de identidade de nucleotídeos com um isolado de BGMV de soja (acesso FJ665283.1). Todas as sequências obtidas agruparam-se com isolados de BGMV de soja e feijão do Brasil, e os isolados clonados a partir da amostra de fava coletada em PE possuem um relacionamento filogenético mais próximo com o isolado de BGMV de soja do que os isolados de Alagoas. Os isolados apresentaram agrupamento filogenético de acordo com sua origem geográfica, com os isolados de BGMV de fava de PE divergindo dos de AL. A análise da população de BGMV infectando fava indicou uma alta taxa de variabilidade genética, significativamente maior que a observada para duas populações de begomovírus que infectam tomateiro no sudeste brasileiro.

**Palavras-chave:** *Phaseolus lunatus*; begomovírus; variabilidade genética.

## ABSTRACT

The lima bean (*Phaseolus lunatus*) is one of four cultivated species in the genus *Phaseolus*. The species was domesticated in South or Central America. It is one of the main cultivated legumes in the tropics and has a great potential as a source of vegetable protein to the population. Among its most important diseases are those caused by viruses, particularly by begomoviruses (family *Geminiviridae*). Infected plants display an intense yellow or golden mosaic, and have a drastically reduced yield. The objective of this work was to characterize the genetic structure of begomovirus populations infecting lima beans in the state of Alagoas, by analyzing complete DNA-A sequences. Lima bean plants with typical symptoms of begomovirus infection were collected in a number of areas around the states of Alagoas and Pernambuco during 2005. Total DNA was extracted and the presence of a begomovirus was confirmed by PCR. The viral genomic components were amplified using the DNA polymerase from phage phi29, and then cleaved with either *Bam*H I or *Hind* III. Cleaved products were ligated to the pBluescript KS+ plasmid vector and the recombinant plasmids were transformed into *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Clones were submitted to cleavage with *Hae* III and, according to the obtained restriction pattern, 22 (20 from samples collected in Alagoas, and two from samples collected in Pernambuco) were selected for sequencing. Phylogenetic analysis was carried out with MEGA 4.0 using the Neighbour-Joining method. The genetic diversity of the population was evaluated using the DnaSP program, version 5. Analysis of the 22 sequences revealed that they all belonged to a single begomovirus species, *Bean golden mosaic virus*, with 90 to 94% nucleotide sequence identity with a BGMV isolate from soybean (access number FJ665283.1). All sequences clustered with other Brazilian BGMV isolates from common bean and soybean in the phylogenetic tree, although the two isolates from Pernambuco are closer to the soybean isolate than the 20 isolates from Alagoas. Thus, the lima bean isolates clustered based on their geographical origin. Analysis of the population indicated a high degree of genetic variability, significantly higher than that observed for two begomovirus populations from tomato obtained in the southeastern region of Brazil.

**Keywords:** *Phaseolus lunatus*; begomoviruses; genetic variability.

## 1. INTRODUÇÃO

A fava (*Phaseolus lunatus*), também conhecida como feijão-lima ou feijão fava, é uma das quatro espécies do gênero *Phaseolus* explorada comercialmente (Santos et al., 2002). A espécie foi domesticada na América do Sul ou Central, ou em ambas (Zimmermann e Teixeira, 1996). É uma das principais leguminosas cultivadas na região tropical e apresenta potencial para fornecimento de proteína vegetal à população (Vieira, 1992).

No nordeste do Brasil, a fava constitui uma cultura relevante no contexto da agricultura familiar, sendo cultivada geralmente durante a estação chuvosa em consórcio com o milho. No ano de 2007 foram produzidas no Nordeste 14.925 toneladas de grãos secos de fava, numa área plantada de 33.851 ha, tendo os estados da Paraíba e Ceará como os maiores produtores. Em Alagoas a área cultivada com fava é de 580 ha com uma produção de 277 toneladas, sendo os municípios de União dos Palmares e Santana do Mundaú os que apresentam as maiores produções (IBGE, 2007).

Morfológicamente, a fava pode ser caracterizada por apresentar folhas geralmente mais escuras (mesmo depois do amadurecimento das vagens) que em outras espécies do gênero; bractéolas pequenas e pontiagudas; vagens oblongas ou recurvadas, com duas alturas distintas (ventral e dorsal), e número de sementes variando de duas a quatro (Zimmermann e Teixeira, 1996).

A utilização da fava é relativamente pequena, comparada ao feijão comum (*P. vulgaris*). Acredita-se que as principais razões para o cultivo relativamente limitado da fava sejam a tradição do consumo de feijão comum, a palatabilidade da fava e seu tempo de cocção mais longo, além da falta de variedades mais adaptadas às condições da região (Azevedo et al., 2003).

A baixa produtividade da fava pode ser atribuída ao fato de parte da produção ser oriunda de pequenos produtores, em consórcio, sem adoção de tecnologia (Santos et al., 2002), além da ocorrência de doenças. Entre as doenças mais importantes estão as viroses, principalmente aquelas ocasionadas pelo gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*). As plantas infectadas apresentam um intenso mosaico amarelo e têm a produtividade drasticamente reduzida (Faria et al., 2000).

A família *Geminiviridae* engloba vírus cujo genoma é constituído por DNA circular de fita simples, encapsidado por uma única proteína estrutural que confere a partícula uma estrutura icosaédrica geminada (Zhang et al., 2001). A família é composta pelos gêneros *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus*, definidos com base no inseto vetor, gama de hospedeiros e organização genômica. Os begomovírus são transmitidos pela mosca-branca *Bemisia tabaci* e infectam plantas dicotiledôneas (Stanley et al., 2005). Existem hoje em torno de 200 espécies de geminivírus oficialmente reconhecidas, das quais 147 pertencem ao gênero *Begomovirus*, e há em torno de 592 sequências de genomas completos depositadas em bancos de dados (Fauquet et al., 2008).

Os begomovírus podem possuir um ou dois componentes genômicos, sendo denominados begomovírus monosegmentados e bisegmentados, respectivamente. Os monosegmentados, que geralmente estão confinados ao “Velho-Mundo” (África, Ásia e Europa) frequentemente estão associados a um DNA satélite de fita simples circular denominado DNA  $\beta$ , os quais são requeridos para indução de sintomas característicos (Mansoor et al., 2003; Bridone e Stanley, 2006). Por outro lado, begomovírus encontrados no “Novo-Mundo” (Américas) possuem dois componentes denominados DNA-A e DNA-B, cada um com aproximadamente 2600 nucleotídeos. No DNA-A encontram-se as ORFs CP (AV1), Rep (AC1), TrAP (AC2), Ren (AC3) e AC4, que codificam genes envolvidos na replicação e encapsidação da progênie viral, enquanto no DNA-B encontram-se as ORFs NSP (BV1) e MP (BC1), que codificam genes responsáveis pelos movimentos intra- e intercelular, respectivamente. Ambos os componentes (DNA-A e DNA-B) são necessários para infecção sistêmica em plantas. Exceto por uma região de aproximadamente 200 nt denominada região comum (RC), os dois componentes genômicos não apresentam identidade em suas sequências. A RC inclui a origem de replicação e os promotores para a transcrição dos mRNAs virais (Lazarowitz, 1992; Sharma e Ikegami, 2008).

O método mais preciso para identificação de uma espécie de begomovírus é a determinação da sequência completa de nucleotídeos do DNA-A. O Grupo de Estudos de *Geminiviridae* do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) adotaram o critério para demarcação de espécie de begomovírus o valor mínimo de 89% de identidade de nucleotídeos entre sequências completas do DNA-A (Fauquet et al., 2008). Recentemente,

Inoue-Nagata et al. (2004) desenvolveram um método simples de clonagem de genomas completos de begomovírus utilizando amplificação por círculo rolante (RCA – *rolling-circle amplification*) seguido por monomerização com enzima de restrição e ligação ao vetor. Este método facilita os procedimentos de clonagem e sequenciamento de um grande número de isolados em um período curto de tempo, e tem permitido a realização de estudos de variabilidade genética e epidemiologia. Alguns trabalhos têm sido publicados neste sentido (Owor et al., 2007; Castillo-Urquiza, 2008; Varsani et al., 2008; Varsani et al., 2009; Harkins et al., 2009).

Existem poucas informações relacionadas à diversidade genética de populações de begomovírus infectando fava na região do Nordeste, e no Brasil em um contexto geral. Recentemente, Lopes et al. (2004) relataram pela primeira vez a ocorrência de begomovírus no estado de Alagoas. A espécie viral foi posteriormente identificada por Silva (2006), que obteve sequências correspondentes às extremidades 5' dos genes *Rep* e *Cp* e à região comum do DNA-A. A comparação com sequências disponíveis no banco de dados do NCBI revelou identidade de 91 a 94% com um isolado de *Bean golden mosaic virus* (BGMV) de feijoeiro, proveniente do estado de Goiás e caracterizado por Faria e Maxwell (1999). Tal isolado é apontado por esses autores como o representante tipo da espécie no Brasil.

Devido ao conhecimento da alta frequência de recombinação que ocorre entre diferentes espécies de begomovírus, pode-se questionar o uso de pequenos fragmentos genômicos para comparações entre espécies. De fato, Fauquet et al. (2003) propuseram que somente as sequências completas do DNA-A devem ser consideradas para análises comparativas na identificação de espécies.

Este trabalho teve como objetivo caracterizar a diversidade genética dos begomovírus que infectam fava (*Phaseolus lunatus*) no estado de Alagoas, através da sequência completa do DNA-A, fornecendo informações que podem contribuir para o melhor entendimento da biologia de populações virais, e auxiliar os programas de melhoramento genético da cultura.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Aspectos gerais da cultura de fava (*Phaseolus lunatus*)

A fava (*Phaseolus lunatus* L.), também conhecida como feijão-fava ou feijão-lima, é cultivada na América do Norte, na América do Sul, na Europa, no leste e oeste da África e no sudeste da Ásia (Baudoin, 1988).

A fava é uma cultura amplamente distribuída através da América Tropical, encontrada especialmente em solos de baixa fertilidade das áreas úmidas (Yagui et al., 2003). Originária da América Central e do Sul, sua domesticação parece ter ocorrido em ambos os locais (Sauer, 1993; Zimmermann e Teixeira, 1996). A primeira domesticação teria ocorrido no noroeste da América do Sul e produziu uma grande variabilidade desta espécie. Evidências para essa domesticação vieram de um sítio arqueológico Peruano (Caverna Guitarrero), onde foram encontrados grãos de fava que dataram de 6500 a.C., 1000 anos antes que os grãos de feijão (*P. vulgaris*) fossem encontrados na mesma região. As variedades Sieva Bean, Butter Bean e Baby Lima Bean foram originadas da segunda domesticação, a qual teria ocorrido na América Central, provavelmente na Guatemala, embora existam evidências arqueológicas no México, onde os grãos dataram de 800 d. C. (Sauer, 1993).

A fava é uma leguminosa pertencente à família Fabaceae. Esta é uma das maiores famílias botânicas, de ampla distribuição geográfica e de importância econômica por apresentar espécies produtoras de alimentos como a soja (*Glycine max*), ervilha (*Pisum sativum*), alfafa (*Medicago sativa*) e feijão (*P. vulgaris*) (McClellan et al., 2005).

De acordo com Castineiras (1991), são reconhecidos três grupos de fava baseados na forma e peso de 100 sementes, denominados “papas” (sementes pequenas, com 35 a 55 g para 100 sementes), “sieva” (sementes médias e planas, com 50 a 70 g para 100 sementes) e “big lima” (sementes grandes, com 70 a 110 g para 100 sementes). No Brasil, estudos para distinguir variedades de fava através de dados morfológicos avaliam caracteres como hábito de crescimento, comprimento e largura das vagens, comprimento, largura e espessura das sementes, peso de 100 sementes, coloração do hipocótilo, da flor e

da semente (branca, amarela, vermelha, violeta, preta e rajada) (Yagui et al., 2003; Santos et al., 2002).

A caracterização de acessos de fava também pode ser realizada por marcadores moleculares. Em trabalhos realizados com marcadores microssatélites, foi observada a divisão dos acessos em dois grupos: Mesoamericano (provenientes do Iraque, Nigéria, El Salvador, Brasil, México, Belize, Guatemala, Costa Rica, Peru, Colômbia e Argentina) e Andino (provenientes da Zâmbia, Peru e Equador) (Lioi e Galasso, 2002). Fofana et al. (1997) e Caicedo et al. (1999) também observaram essa divisão utilizando marcadores RAPD e AFLP.

No Brasil, apesar de cultivada em todos os estados e de apresentar capacidade de adaptação mais ampla que o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), o cultivo da fava ainda tem pouca relevância. Acredita-se que as principais razões para o cultivo relativamente limitado sejam a maior tradição de consumo do feijão comum, o paladar da fava e o seu tempo de cocção mais longo. A importância econômica e social se deve principalmente à sua rusticidade em regiões semi-áridas do Nordeste brasileiro, o que possibilita prolongar a colheita em período seco (Azevedo et al., 2003).

## **2.2. Família *Geminiviridae***

Vírus incluídos na família *Geminiviridae* são caracterizados pela morfologia icosaédrica da partícula e genoma composto de um ou dois componentes genômicos de DNA fita simples. A família é dividida em quatro gêneros de acordo com o inseto vetor, gama de hospedeiro, organização do genoma e relacionamento filogenético (Stanley et al., 2005). O gênero *Mastrevirus* inclui vírus com um componente genômico, transmitidos por cigarrinhas (Homoptera: Cicadellidae). Eles codificam três ou quatro proteínas e infectam plantas monocotiledôneas. Economicamente, o *Maize streak virus* (MSV), espécie-tipo, causa a mais devastadora doença do milho na África Sub Sahariana, resultando em perdas de até 100% (Thottappilly, 1992). O gênero *Curtovirus* inclui vírus com um componente, transmitidos por cigarrinhas (Homoptera: Cicadellidae) de forma circulativa não-propagativa a espécies dicotiledôneas. O DNA viral codifica seis ou sete proteínas dependendo da espécie viral. A espécie-tipo é o *Beet curly top virus* (BCTV). O gênero

*Topocuvirus* contém uma única espécie, o *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV), com um componente genômico e transmitido pela cigarrinha *Micrutalis malleifera* (Homoptera: Auchenoryncha) a espécies dicotiledôneas. O genoma codifica seis proteínas (Briddon et al., 1996), as quais são relacionadas com as dos curtovírus. O gênero *Begomovirus* inclui espécies com um ou dois componentes genômicos, que são transmitidos a espécies dicotiledôneas pela mosca-branca *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) de forma circulativa não-propagativa. A espécie-tipo é o *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV).

Patossistemas incluindo begomovírus monossegmentados estão restritos ao “Velho Mundo” (Europa, Ásia e África). Dois componentes cognatos não possuem identidade significativa entre suas sequências, exceto em uma região denominada região comum (RC), onde está localizada a origem de replicação (Hanley-Bowdoin et al., 1999). Uma exceção é o *Cabbage leaf Curl virus* (CLCV), que apresenta apenas 80% de identidade entre as sequências das RCs do DNA-A e DNA-B (Hill et al., 1998).

Espécies de begomovírus que possuem um componente genômico estão frequentemente associadas a um DNA satélite circular de fita simples, denominado DNA  $\beta$ . Este DNA aumenta o nível de replicação do vírus auxiliar em algumas plantas hospedeiras (Briddon et al., 2001). O DNA  $\beta$  contém um único gene,  $\beta C1$ , que codifica uma proteína importante para a expressão de sintomas (Jose e Ramakrishnan, 2003; Cui et al., 2004; Saunders et al., 2004; Qian e Zhou, 2005; Saeed et al., 2005), e que funciona como supressora de silenciamento gênico pós-transcricional (Briddon et al., 2001; Briddon et al., 2003; Bull et al., 2004; Cui et al. 2005; Gopal et al. 2007; Kon et al. 2007, revisado por Sharma e Ikegami, 2008). A proteína  $\beta C1$  interage com uma proteína ubiquitina-conjugante denominada SIUBC3, e esta interação está correlacionada com a expressão dos sintomas da infecção viral. Em plantas de *N. tabacum* e *N. benthamiana* expressando  $\beta C1$ , o nível de proteínas poliubiquitinadas é menor que em plantas tipo-selvagem, sugerindo que a indução dos sintomas seja consequência da regulação negativa do sistema ubiquitina (proteassoma) (Eini et al., 2009).

O DNA-A de begomovírus bissegmentados (Figura 1) codifica quatro proteínas: a proteína associada à replicação (Rep, “replication-associated protein”), cuja função é reconhecer e se ligar à origem de replicação e iniciar a síntese de DNA viral via mecanismo

de círculo rolante (Fontes et al., 1992; Orozco et al., 1997); uma proteína transativadora da transcrição dos genes *cp* e *nsp* (TrAP, “trans-activating protein”) e que também atua como supressora de silenciamento (Voinnet et al., 1999); uma proteína acessória que aumenta os níveis de acúmulo de DNA viral (Ren, “replication-enhancer protein”) (Sunter et al., 1990; Pedersen e Hanley-Bowdoin, 1994); e a proteína capsial, responsável pela encapsidação do genoma viral e essencial para transmissão pelo inseto vetor ( Briddon et al., 1990; Hofer et al., 1997). Alguns begomovírus codificam a proteína AC4, que também está envolvida na supressão de silenciamento gênico (Vanitharani et al., 2004). Uma ORF adicional denominada AC5 está presente em algumas espécies de begomovírus. Esta ORF está totalmente inserida na sequência do gene *cp*, porém em orientação inversa e em outra fase de leitura. A função do produto da ORF AC5 foi estudada apenas para o *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV) (Kheyr-Pour et al., 2000). Nesse estudo, mutações que inativaram a ORF AC5 não acarretaram nenhuma modificação fenotípica no vírus.

O DNA-B codifica uma proteína de movimento célula-a-célula (MP, “movement protein”) responsável pelo aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas, (Noueiry et al., 1994) e a proteína NSP (“nuclear shuttle protein”) responsável pelo transporte do DNA viral através dos poros nucleares (Noueiry et al., 1994; Sanderfoot et al., 1996).

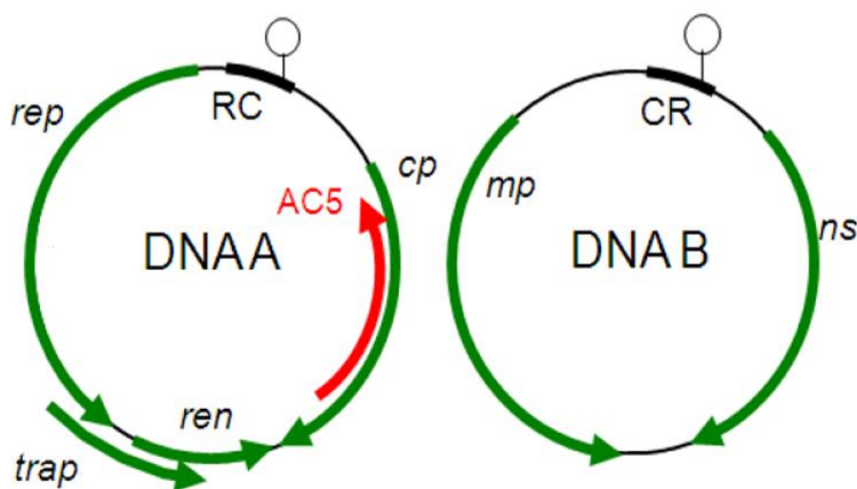


Figura 1. Representação esquemática do genoma de um begomovírus bissegmentado. Os círculos representam o genoma viral, composto de dois componentes (DNA-A e DNA-B) com aproximadamente 2600 nucleotídeos cada um. As setas indicam os genes virais e a direção em que ocorre a transcrição: *rep* “replication-associated protein”; *Trap* “trans-activating protein”; *ren* “replication-enhancer protein”; *cp* “coat protein”; *mp* “movement protein”; *nsp* “nuclear shuttle protein”. A ORF AC5, que se encontra presente em apenas algumas espécies também está representada.

### 2.3. Replicação viral

Ao entrar na célula, o DNA viral é transportado até o núcleo onde é convertido em uma molécula de DNA fita dupla denominada forma replicativa (RF), que servirá de molde para a síntese de fitas de DNA contendo várias cópias de genoma viral (concatâmeros), via mecanismo de círculo rolante. A maneira como esta conversão ocorre não é conhecida, mas evidências indiretas indicam que ela é realizada por fatores do hospedeiro (Stanley, 1995).

A única proteína viral essencial à replicação dos begomovírus é a proteína Rep. Esta proteína de aproximadamente 41 KDa possui várias atividades bioquímicas, incluindo propriedade de ligação a DNA de fita simples e dupla, clivagem e ligação do DNA em sequências específicas, hidrólise de ATP, e iniciação do mecanismo de replicação por círculo rolante (revisado por Hanley-Bowdoin et al., 1999).

A origem de replicação está localizada na região intergênica, comum entre os dois componentes genômicos. Nesta região está localizada uma sequência repetida e invertida composta predominantemente por guanina e citosina, que forma uma estrutura conservada (“structurally-conserved element”, SCE) em forma de grampo, com uma alça contendo a sequência conservada 5'-TAATATT↓AC-3, encontrada em todos os geminivírus (Orozco e Hanley-Bowdoin, 1996). É neste nonanucleotídeo que ocorre a clivagem pela proteína Rep, que inicia o processo de replicação por círculo rolante. A proteína Rep atua como uma endonuclease sítio-específico com requerimento de estrutura e de sequência (Laufs et al., 1995; Orozco e Hanley-Bowdoin, 1998). Na região comum encontram-se também sequências específicas para a ligação da proteína Rep (Fontes et al., 1992; Fontes et al., 1994) e regiões promotoras da RNA polimerase II, responsável pela transcrição dos genes virais.

O sítio de ligação de Rep ao DNA viral está localizado entre a caixa TATA do gene *rep* e a SCE (Orozco e Hanley-Bowdoin, 1998), sendo constituído por duas repetições diretas e uma repetição invertida de quatro ou cinco nucleotídeos (Gutierrez, 1999). O reconhecimento pela proteína Rep é considerado vírus-específico (Arguello-Astorga et al., 1994; Harrison e Robinson, 1999; Ramos et al., 2003), de modo que Rep só inicia a replicação de DNAs cognatos.

## 2.4. Movimento célula-a-célula e a longa distância

A infecção sistêmica da planta depende não somente da replicação viral na célula inicialmente infectada, mas também da capacidade do vírus de mover-se célula-a-célula até atingir o sistema vascular, de onde é transportado via floema para tecidos com demanda por fotoassimilados (Dawson e Hilf, 1992; Carrington et al., 1996; Gilbertson e Lucas, 1996; Nelson e Van Bel, 1997).

Inicialmente, o DNA viral presente no núcleo de uma célula infectada deverá ser transportado para o citoplasma, função desempenhada pela proteína NSP. Uma vez no citoplasma, o DNA viral é transportado através dos plasmodesmas até a célula adjacente com auxílio da proteína MP. Dessa forma, para que o transporte de DNA viral célula-a-célula ocorra, as duas proteínas de movimento codificadas pelo DNA-B devem atuar de forma cooperativa (Sanderfoot e Lazarowitz, 1995; 1996).

A proteína MP possui todas as propriedades de uma proteína de movimento “clássica” (Lucas, 2006): aumento do limite de exclusão passivo dos plasmodesmas, movimento célula-a-célula na ausência de DNA ou de qualquer outra proteína viral, ligação a ácidos nucléicos (neste caso, DNA) e transporte de DNA célula-a-célula (Noueiry et al., 1994; Sanderfoot e Lazarowitz, 1995; Rojas et al., 1998). No caso de mastrevírus, curtovírus e begomovírus monossegmentados, a proteína capsidial (CP) é essencial para o movimento a longa distância pelos feixes vasculares. No caso do *Tomate yellow leaf Curl virus* (TYLCV), um begomovírus monossegmentado, as proteínas V1 e C4 são responsáveis pelo movimento núcleo-citoplasma e célula-a-célula, respectivamente (Rojas et al., 2005). Raras exceções, como o begomovírus bissegmentado *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), são capazes de infectar sistemicamente alguns hospedeiros mesmo na ausência do DNA-B cognato (Galvão et al., 2003; Fontenelle et al., 2007).

## 2.5. Evolução dos geminivírus

Os geminivírus podem ter evoluído a partir de um replicon primitivo de DNA extracromossomal presente em procariotos ou em ancestrais primitivos das plantas (revisado por Rojas et al., 2005). Evidências indiretas, como características conservadas com as proteínas iniciadoras da replicação de replicons de procariotos e eucariotos contemporâneos (Ilyina e Koonin, 1992; Campos-Olivas et al., 2002), presença de mRNAs policistrônicos, e a capacidade dos geminivírus de replicarem em *Agrobacterium tumefaciens* (Ridgen et al., 1996; Selt et al., 2002), apóiam esta hipótese. Durante a co-evolução com seus hospedeiros, estes replicons de DNA teriam adquirido novos genes por meio de recombinação com o DNA do hospedeiro ou com outros replicons (revisado por Rojas et al., 2005).

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

consequência do isolamento geográfico e adaptação ao hospedeiro (Zhou et al., 2003; Rojas et al., 2005).

Membros do gênero *Curtovirus* seriam derivados de antigos eventos de recombinação entre mastrevírus e begomovírus, resultando na aquisição da CP de um mastrevírus ancestral transmitido por cigarrinha, ao passo que um begomovírus teria contribuído com os genes associados à replicação (Rybichi, 1994; Padidam et al., 1995). Outro evento de recombinação foi identificado para o TPCTV, único membro do gênero *Topocuvirus*. O sequenciamento do genoma completo desse vírus demonstrou que sua sequência é totalmente distinta de todos os outros geminivírus. Além disso, verificou-se que esse vírus surgiu após recombinação entre um curtovírus ancestral e outro vírus que não possuía semelhança com nenhum outro geminivírus, o que sugere que outros geminivírus, não relacionados com vírus pertencentes aos quatro gêneros atualmente reconhecidos, podem estar presentes no campo (Briddon et al., 1996).

## **2.6. Diversidade e estrutura genética de populações de begomovírus**

Populações de geminivírus, incluindo os begomovírus, possuem um elevado grau de diversidade genética. A ocorrência de eventos frequentes de recombinação (Padidam et al., 1999), a ocorrência de pseudo-recombinação entre vírus com genoma bissegmentado (Andrade et al., 2006), e a alta taxa de evolução molecular (Duffy e Holmes, 2008; 2009) contribuem para esse elevado grau de diversidade. Diversos estudos já foram realizados como objetivo de investigar a estrutura genética de populações de geminivírus em diversos hospedeiros e em diferentes regiões geográficas. Recentemente, com o advento de técnicas de amplificação do genoma viral completo (“rolling circle amplification”, RCA) (Inoue-Nagata et al., 2004), novas possibilidades foram criadas para a análise de populações virais em escala genômica (Haible et al., 2006), e alguns trabalhos nesse sentido já foram publicados (Owor et al., 2007; Castillo-Urquiza, 2008; Varsani et al., 2008; Varsani et al., 2009; Harkins et al., 2009).

Mutação, recombinação e pseudo-recombinação são as principais fontes de variabilidade genética de vírus em plantas (Garcia-Arenal et al., 2003; Seal et al., 2006). Sob diferentes condições de seleção, como presença de um efeito gargalo (população



inicial pequena do vírus, período curto de aquisição pelo vetor), transferências sucessivas entre hospedeiros sem emprego do vetor, e inoculação em plantas resistentes, isolados de MSV apresentaram alta frequência de mutação, da ordem de  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  (Isnard et al., 1998). Resultados similares foram obtidos num experimento controlado de análise da taxa de variabilidade genética do begomovírus *Tomato yellow leaf Curl China virus* (TYLCCNV) onde foi encontrada uma frequência média de mutação de  $3,5 \times 10^{-4}$  e  $5,3 \times 10^{-4}$  após 60 dias de infecção em *N. benthamiana* e tomateiro, respectivamente (Ge et al., 2007). Taxas de mutação para o TYLCV foram estimadas em  $2,88 \times 10^{-4}$  subs/sítio/ano para o genoma completo (Duffy e Holmes, 2008). A região que codifica a proteína capsidial apresentou uma taxa maior ( $4,63 \times 10^{-4}$  subs/sítio/ano) e a região intergênica (não codificadora) apresentou uma taxa ainda maior ( $1,56 \times 10^{-4}$  subs/sítio/ano). Entretanto, as mutações observadas foram na maioria sinônimas, sugerindo que as altas taxas de mutação observadas refletem mais uma rápida dinâmica mutacional do que uma frequência de evolução adaptativa (Duffy e Holmes, 2008). Taxas de mutação para o *East african cassava mosaic virus* (EACMV) foram estimadas em  $1,6 \times 10^{-3}$  e  $1,33 \times 10^{-4}$  subs/sítio/ano para o DNA-A e DNA-B, respectivamente (Duffy e Holmes, 2009). A região que codifica a proteína capsidial apresentou uma taxa de  $1,37 \times 10^{-3}$  subs/sítio/ano e a região que codifica a proteína associada à replicação apresentou uma taxa de  $1,24 \times 10^{-3}$  subs/sítio/ano. Para as regiões codificadoras do DNA-B, ao ORFs BV1 e BC1 apresentaram taxas de  $2,77 \times 10^{-4}$  e  $3,45 \times 10^{-4}$ , respectivamente. Contudo os autores validaram essas altas taxas apenas para o DNA-A e a ORF AV1.

Mutantes para a proteína Rep do TGMV e do CaLCuV que não permitem a interação com a proteína pRB, inoculados em protoplastos de fumo e em plantas *N. benthamiana*, apresentaram até 100% de frequência de reversão da mutação, evidenciando a capacidade de populações de geminivírus de evoluir rapidamente para alterar mudanças deletérias em seu genoma (Arguello-Astorga et al., 2007). As frequências de mutação e as taxas de substituição de nucleotídeos observadas para geminivírus apresentam valores similares aos verificados para vírus de RNA (Jenkins et al. 2002), apesar da expectativa de que fossem menores devido à utilização da maquinaria de replicação do hospedeiro, que permiti corrigir as incorporações incorretas de nucleotídeos, aumentando a fidelidade da replicação (Duffy e Holmes, 2008; 2009). É possível que os geminivírus não utilizem os

mecanismos de correção de erro da síntese de DNA do hospedeiro, permitindo a incremento das taxas de mutação de forma que mutações não deletérias sejam mantidas (Sanz et al., 1999).

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

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

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

A existência de dois componentes genômicos na maioria dos begomovírus promove um mecanismo alternativo, conhecido como pseudo-recombinação, pelo qual a troca de material genético pode ocorrer sem necessidade de recombinação intermolecular,

ocorrendo apenas a troca de componentes genômicos entre dois vírus distintos (Gilbertson et al., 1993b; Sung e Coutts, 1995; revisado por Rojas et al., 2005; Andrade et al., 2006). A ocorrência natural de pseudo-recombinantes no campo foi verificada no México, em tomateiros infectados pelo *Chino del tomate virus* (CdTV) (Paplomatas et al., 1994).

Experimentos com pseudo-recombinação são ferramentas úteis no estudo de funções de genes e podem revelar relações filogenéticas, como é o caso da mistura de componentes genômicos do *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) e o *Bean golden mosaic virus* (BGMV), que possuem identidade inferior a 75% em suas sequências de nucleotídeos e não formam pseudo-recombinantes infecciosos (Gilbertson et al., 1993a). Por outro lado, pseudo-recombinantes formados a partir da mistura de componentes genômicos de dois isolados de BGYMV mostraram-se infecciosos. Quando inoculada, a mistura formada a partir de DNA-A do isolado da Guatemala (BGYMV-GA) e DNA-B do isolado da República Dominicana (BGYMV-DR) foi capaz de induzir os mesmos sintomas apresentados pelos parentais, enquanto o pseudo-recombinante recíproco induziu sintomas atenuados e tardios. Esses resultados demonstram que geminivírus com regiões comuns suficientemente similares podem formar pseudo-recombinantes infecciosos, mas ressaltam que frequentemente os pseudo-recombinantes recíprocos apresentam diferenças na eficiência de replicação e infecção sistêmica (Faria et al., 1994). Esse fato foi também observado para o ACMV (Stanley, 1995) e TGMV (Von Arnim e Stanley, 1992).

A especificidade da ligação da proteína Rep aos iterons é considerada a principal determinante da formação de pseudo-recombinantes viáveis entre diferentes espécies/estirpes de begomovírus (Arguello-Astorga et al., 1994; Eagle et al., 1994; Fontes et al., 1994a; Chatterji et al., 1999; Andrade et al., 2006; Bull et al., 2007). Outro fator importante é a conservação da sequência de aminoácidos da proteína Rep, especialmente os três aminoácidos que estariam envolvidos diretamente na ligação aos iterons (Arguello-Astorga e Ruiz-Medrano, 2001). A variabilidade de pseudo-recombinantes indica que fatores envolvidos na replicação e movimento são intercambiáveis entre espécies altamente relacionadas, ou entre estirpes de uma mesma espécie. A assimetria entre pseudo-recombinantes recíprocos indica que a pseudo-recombinação entre begomovírus é um fenômeno complexo que envolve interações entre fatores do vírus e do hospedeiro (Hill et al., 1998).

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

Pseudo-recombinantes produzidos entre o DNA-A do *Tomato mottle virus* (ToMoV) e o DNA-B do *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV), embora infecciosos, apresentaram acúmulo reduzido do DNA-B e induziram sintomas atenuados em *N. benthamiana* (Gilbertson et al., 1993b; Hou e Gilbertson, 1996). Entretanto, após três passagens mecânicas sucessivas nesse hospedeiro, os sintomas tornaram-se idênticos aos produzidos pelo ToMoV e o nível do DNA-B tornou-se igual ao do DNA-A. A análise das regiões comuns dos DNAs-A e -B do pseudo-recombinante comprovou a ocorrência de recombinação intermolecular na região comum do BDMV, que foi substituída quase que totalmente pela região comum do DNA-A do ToMoV (Hou e Gilbertson, 1996). Assim, o DNA-B passou a ser reconhecido com 100% de eficiência pela proteína Rep do ToMoV. Esse resultado evidencia a importância da pseudo-recombinação na evolução de geminivírus e em sua adaptação a novos hospedeiros.

A formação de pseudo-recombinantes viáveis não depende somente da relação filogenética e conservação dos iterons, já que pseudo-recombinantes infecciosos foram formados entre o DNA-A do TGMV e o DNA-B do *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), que possuem iterons distintos. Além disso, a assimetria na formação do pseudo-

recombinante recíproco sugere que a proteína Rep do TGMV tem maior versatilidade em termos de reconhecimento de componentes de DNA heterólogos comparada à do ToYSV (Andrade et al., 2006).

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

Diversos trabalhos realizados ao longo das décadas de 1990 e 2000 avaliaram a estrutura populacional de begomovírus infectando mandioca na África Sub-Sahariana e no Sub-Continente Indiano. Nos países dessas regiões, a mandioca pode ser infectada por sete espécies de begomovírus (Fauquet e Fargette, 1990; Fargette et al., 1993; Legg e Raya, 1993) (curiosamente, não existem relatos de begomovírus que infectam mandioca no Brasil, o centro de origem e diversidade genética desta cultura). Os estudos realizados demonstraram um elevado grau de variabilidade genética da população viral em diversos países. A ocorrência frequente de infecções mistas facilita a ocorrência de pseudo-recombinação e recombinação, e em pelo menos dois casos foi demonstrada a emergência de novas espécies como consequência direta desses mecanismos (Zhou et al., 1997; Fondong et al., 2000).

Na Tanzânia, todas as sete espécies de begomovírus que infectam mandioca já foram relatadas (Ndunguru et al., 2005). Diversos eventos de recombinação foram detectados entre as estirpes TZ1 e TZ7 do *East African cassava mosaic Cameron virus* (EACMCV). A análise de sequências indicou que as duas estirpes têm a mesma origem local e, portanto, não foram introduzidas recentemente. A variabilidade genética da

população viral foi analisada também com base no DNA-B, o que também indicou a existência de diversos eventos de recombinação. Os resultados indicam que a região central do continente africano é um centro de diversidade genética begomovírus (Ndunguru et al., 2005).

Além dos begomovírus que infectam a mandioca, a África também é o centro de origem dos mastrevírus que infectam gramíneas (Palmer e Rybicki, 1998). Um estudo recente utilizando RCA analisou a estrutura genética da população viral em Uganda, um dos países mais afetados pelo estriado do milho causado pelo MSV (Owor et al., 2007). Amostras foram coletadas em 155 locais cobrindo todo o país. Inicialmente, fragmentos do genoma viral foram amplificados via PCR e a variabilidade foi analisada por meio de PCR-RFLP. Um total de 49 variantes foram identificadas a partir de 391 isolados virais. A partir dessas 49 variantes, um total de 62 genomas completos foram sequenciados, e uma origem recombinante foi demonstrada para 52 desses genomas. Entretanto, um único recombinante, denominado MSV-A(1)UgIII, estava presente em infecção simples em mais de 60% das amostras infectadas em todo o país. Os autores concluem que, embora a ocorrência de recombinação entre mastrevírus seja tão ou mais frequente em comparação com os begomovírus, o MSV deve estar sujeito a gargalos que limitam a variabilidade genética das populações naturais.

Castillo-Urquiza (2008) estudando duas populações de begomovírus que infectam tomate, *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) e *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV) na região Sudeste do Brasil (municípios de Coimbra, MG e Paty do Alferes, RJ) observou alta variabilidade genética nestas populações, sendo maior na população de ToCmMV. Demonstrou ainda que entre subpopulações de ToCmMV em Coimbra e Paty de Alferes há maior variabilidade na subpopulação localizada em Coimbra.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Material vegetal e DNA viral

As análises foram realizadas a partir do DNA extraído de amostras de fava coletadas por Silva (2006) nos estados de Alagoas (municípios de Arapiraca, Atalaia, Belém, Chã Preta, Coité do Noia, Estrela de Alagoas, Maceió, Mar Vermelho, Marimbondo, Paulo Jacinto, Rio Largo, Santana do Mundaú, União dos Palmares e Viçosa) e Pernambuco (município de Recife) no ano de 2005 (Figuras 2 e 3; Tabela 1), o DNA estava armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

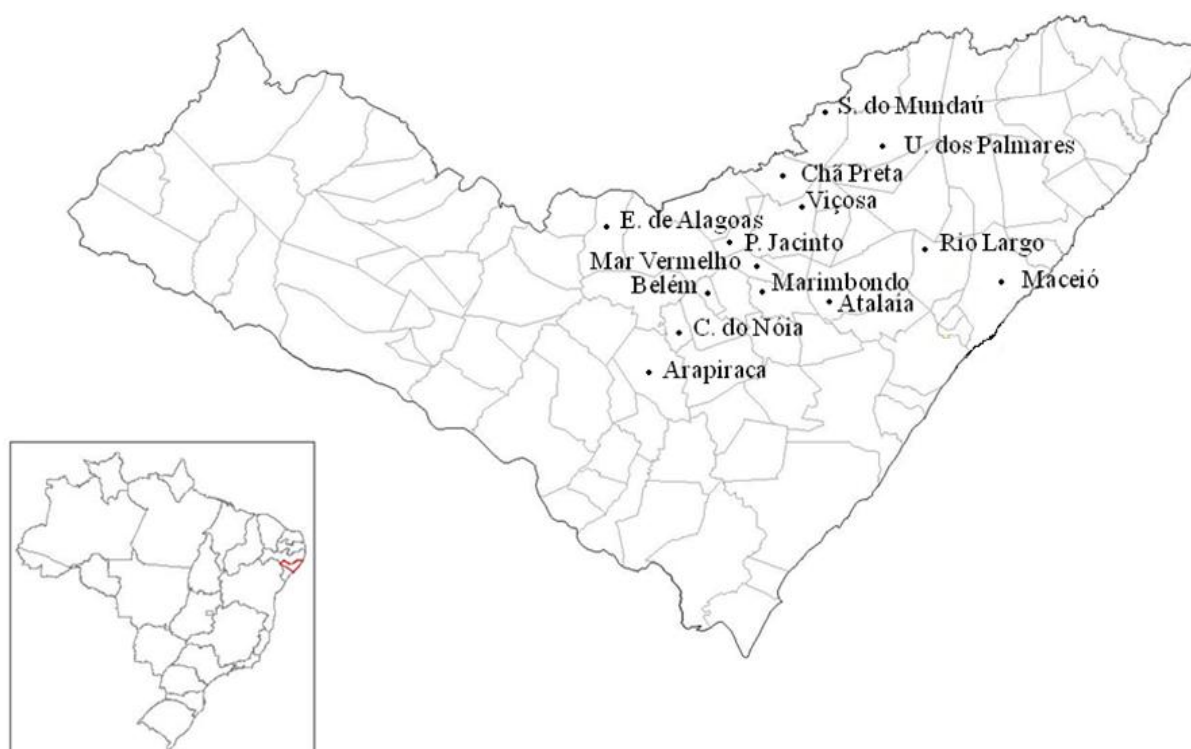


Figura 2. Municípios do estado de Alagoas onde as amostras de fava foram coletadas.



Figura 3. Plantas de fava exibindo sintomas típicos de infecção por begomovírus observadas no município de Maceió. **A** – Planta exibindo sintoma de mosaico dourado; **B** – Planta exibindo sintomas de mosaico e deformação foliar.



Tabela 1. Lista de amostras de fava coletadas e sua procedência.

| <b>Nº da<br/>Amostra</b> | <b>Data de coleta</b> | <b>Local de coleta</b>  |
|--------------------------|-----------------------|-------------------------|
| 1                        | 2005                  | Arapiraca – AL          |
| 2                        | 2005                  | Estrela de Alagoas – AL |
| 3                        | 2005                  | Viçosa – AL             |
| 4                        | 2005                  | Recife – PE             |
| 5                        | 2005                  | Coité do Noia – AL      |
| 6                        | 2005                  | Belém – AL              |
| 7                        | 2005                  | Marimbondo – AL         |
| 8                        | 2005                  | Mar Vermelho – AL       |
| 9                        | 2005                  | Paulo Jacinto – AL      |
| 10                       | 2005                  | Atalaia – AL            |
| 11                       | 2005                  | União dos Palmares – AL |
| 12                       | 2005                  | Santana do Mundaú – AL  |
| 13                       | 2005                  | Chã Preta – AL          |
| 14                       | 2005                  | Rio Largo – AL          |
| 15                       | 2005                  | Maceió – AL             |

### 3.2. Clonagem e sequenciamento dos genomas virais

Os componentes genômicos presentes nas amostras foram amplificados utilizando-se a enzima DNA polimerase do bacteriófago phi29 de acordo com o método descrito por Inoue-Nagata et al. (2004). Alíquotas das amplificações foram submetidas, individualmente, a clivagens com as enzimas de restrição *Hind* III (amostra de Viçosa-AL) e *Bam*H I (todas as demais amostras), para linearizar o genoma. Os produtos das reações foram então analisados em gel de agarose a 0,7% corado com brometo de etídeo (5 µg/mL) e visualizado sob luz UV. Alíquotas das reações de clivagem contendo fragmentos de ~2600 nucleotídeos, correspondente a uma cópia de cada componente genômico, foram utilizadas para ligação ao vetor pBluescript KS+ (Stratagene) previamente linearizado com

a mesma enzima e defosforilado. O produto da reação de ligação foi utilizado para transformação de células ultracompetentes de *Escherichia coli* estirpe DH5α pelo método de choque térmico (Sambrook, et al., 2001). Colônias contendo os possíveis plasmídeos recombinantes foram repicadas para meio LB líquido contendo ampicilina e incubadas a 37°C sob agitação orbital de 250 rpm durante 12h. Após incubação, as culturas foram submetidas à extração de DNA plasmidial pelo método de lise alcalina (Sambrook, et al., 2001). O DNA obtido foi submetido à clivagem com a mesma enzima utilizada para a clonagem, e o padrão eletroforético em gel de agarose a 0,7% utilizado para confirmação da clonagem. Amostras onde a clonagem foi confirmada foram submetidas a uma digestão com a enzima *Hae* III (enzima de corte frequente), e o padrão eletroforético utilizado para seleção dos clones a serem completamente sequenciadas pela Macrogen, Inc. (Seul, Coréia do Sul). A primeira rodada de sequenciamento foi realizada com os oligonucleotídeos M13 Forward e Reverse. Para sequenciamento do genoma completo foram desenhados oligonucleotídeos internos (Tabela 2). As sequências foram montadas utilizando-se o programa DNAMAN versão 6 (Lynnon Biosoft Corporation).

Tabela 2. Oligonucleotídeos internos utilizados para sequenciamento dos isolados de begomovírus.

| Oligonucleotídeo               | Clones                                                                                                                                                           |
|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PF01 – 5' GTCCATAGGAGTGCC 3'   | RRS1-F, RRS2-F, RRS5-R, RRS6-F, RRS8-F, RRS11-F, RRS12-R, RRS14-F, RRS15-F, RRS18-R, RRS20-F, SH1-F, SH3-R, SH4-F, SH5-R, SH11-F, SH13-R, SH14-R, SH16-R, SH17-R |
| PF02 – 5' GCAATCCAGGTGAAGG 3'  | RRS9-F, RRS10-R                                                                                                                                                  |
| PF03 – 5' GTGTACCCCGATTGAGC 3' | RRS9-R, RRS10-F                                                                                                                                                  |
| PF04 – 5' GTGGGACCCTAATGC 3'   | RRS1-R, RRS2-R, RRS5-F, RRS6-R, RRS8-R, RRS11-R, RRS12-F, RRS14-R, RRS15-R, RRS18-F, RRS20-R, SH1-R, SH3-F, SH4-R, SH5-F, SH11-R, SH13-F, SH14-F, SH16-F         |
| PF05 – 5' GGCCCCTTCACCTGG 3'   | SH17-F                                                                                                                                                           |

### 3.3. Comparações de sequências e análise filogenética

As sequências correspondentes ao DNA-A dos isolados de begomovírus foram analisadas a fim de identificar as ORFs presentes no genoma viral, utilizando-se o programa ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>). As sequências de aminoácidos deduzidas de cada proteína foram comparadas com sequências de outras espécies de begomovírus utilizando-se o algoritmo BLASTp (Altschul et al., 1990), e as sequências de nucleotídeos foram comparadas utilizando-se o algoritmo BLASTn. Com base nas sequências de nucleotídeos, alinhamentos múltiplos foram obtidos com o programa Clustal W (Thompson et al., 1994), e árvores filogenéticas foram construídas utilizando-se o programa MEGA 4.0 (Kumar et al., 2004) através do método “Neighbour-Joining” incluindo análise “bootstrap” com 2000 repetições. Os alinhamentos e as árvores filogenéticas incluíram os isolados obtidos de fava e algumas espécies de begomovírus já relatadas no Brasil (Tabela S1).

### 3.4. Análise da estrutura genética da população viral

Foram quantificados os principais descritores de variabilidade genética: número de sítios polimórficos, número total de mutações ( $\eta$ ), número médio de diferenças de nucleotídeos ( $k$ ), diversidade nucleotídica ( $\pi$ ), número de haplótipos, diversidade haplotípica ( $H_d$ ), Teta-W ( $S$ ) e Teta- $(\eta)$ . A análise foi realizada utilizando-se o programa DnaSP versão 5 (Rozas et al., 2009). Os resultados foram comparados com dados referentes a populações de *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) e *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV) da região Sudeste do Brasil (municípios de Coimbra, MG e Paty do Alferes, RJ) (Castillo-Urquiza, 2008).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Clonagem e sequenciamento dos genomas virais

#### 4.1.1. Amplificação dos genomas virais completos

O DNA viral de todas as amostras foi amplificado via RCA. Um fragmento de comprimento superior a 12.000 nucleotídeos (nt), correspondente ao multímero linear contendo várias cópias do genoma viral, foi observado para cada reação (dados não mostrados).

Fragmentos de aproximadamente 2.600 nt, correspondentes a uma cópia dos componentes genômicos virais, foram observados após as reações de clivagem dos produtos de RCA com as enzimas de restrição *Hind* III (dados não mostrados) e *Bam*H I (Figura 4). A enzima *Bam*H I não foi capaz de clivar os componentes genômicos presentes na amostra de Viçosa (Figura 4).

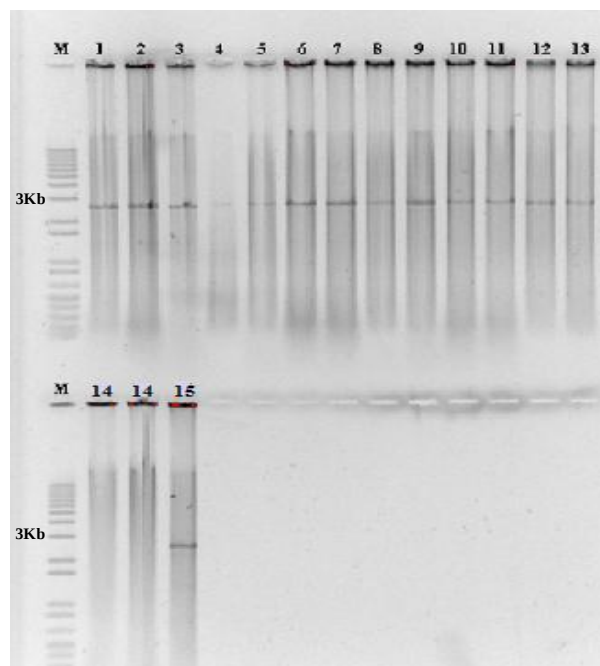


Figura 4. Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) de amplicons obtidos a partir de amostras de DNA total e, submetidos à clivagem com enzima de restrição *Bam*H I. **M**, marcador de comprimento (“1 Kb plus DNA ladder”, em nucleotídeos); **1-15**, amplicons obtidos a partir da amostra coletada em: **1**, Arapiraca; **2**, Estrela de Alagoas; **3**, Recife; **4**, Coité do Noia; **5**, Belém; **6**, Marimbondo; **7**, Maceió; **8**, Mar Vermelho; **9**, Paulo Jacinto; **10**, Atalaia; **11**, União dos Palmares; **12**, Santana do Mundaú; **13**, Chã Preta; **14**, Viçosa; **15**, Rio Largo.

#### 4.1.2. Clonagem dos fragmentos correspondentes a uma cópia do genoma viral

Os fragmentos de 2600 nt foram utilizados para clonagem em vetor pKS+. O DNA extraído a partir das colônias de *E. coli* apresentou plasmídeos com comprimento de aproximadamente 5.500 nt, correspondentes ao vetor plasmidial contendo o componente genômico completo, em todos os casos (Figura 5).

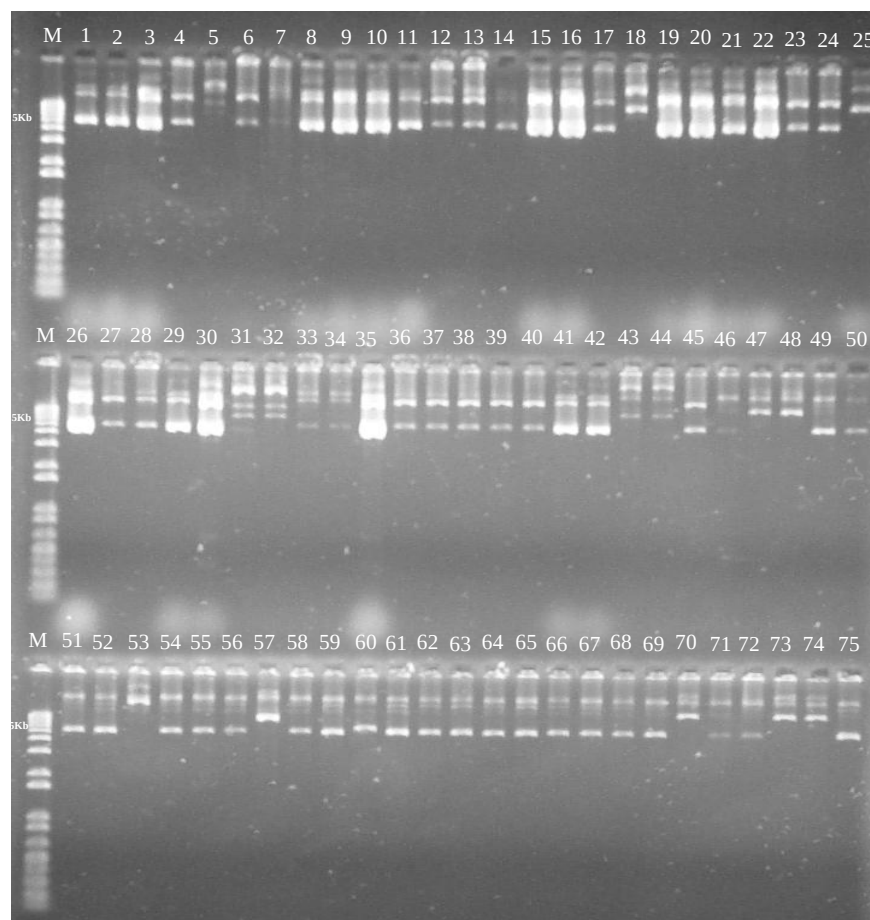


Figura 5. Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) de minipreparações de DNA plasmidial obtidas a partir de colônias contendo possíveis plasmídeos recombinantes. **M**, marcador de comprimento (“1 Kb plus DNA ladder”, em nucleotídeos); **1-75**, minipreparações obtidas de clones correspondentes a amostras coletas em: **1-5**, Arapiraca; **6-10**, Estrela de Alagoas; **11-15**, Viçosa; **16-20**, Coité do Noia; **21-25**, Recife; **26-30**, Belém; **31-35**, Marimbondo; **36-40**, Mar Vermelho; **41-45**, Paulo Jacinto; **46-50**, Atalaia; **51-55**, União dos Palmares; **56-60**, Santana do Mundaú; **61-65**, Chã Preta; **66-70**, Rio Largo; **71-75**, Maceió.

As amostras de DNA plasmidial foram submetidas à clivagem com a mesma enzima utilizada para a clonagem, observou-se fragmentos de aproximadamente 3.000 nt, correspondente ao vetor plasmidial, e 2.600 nt, correspondente ao componente genômico, confirmando-se assim o processo de clonagem do componente viral completo (Figura 6).

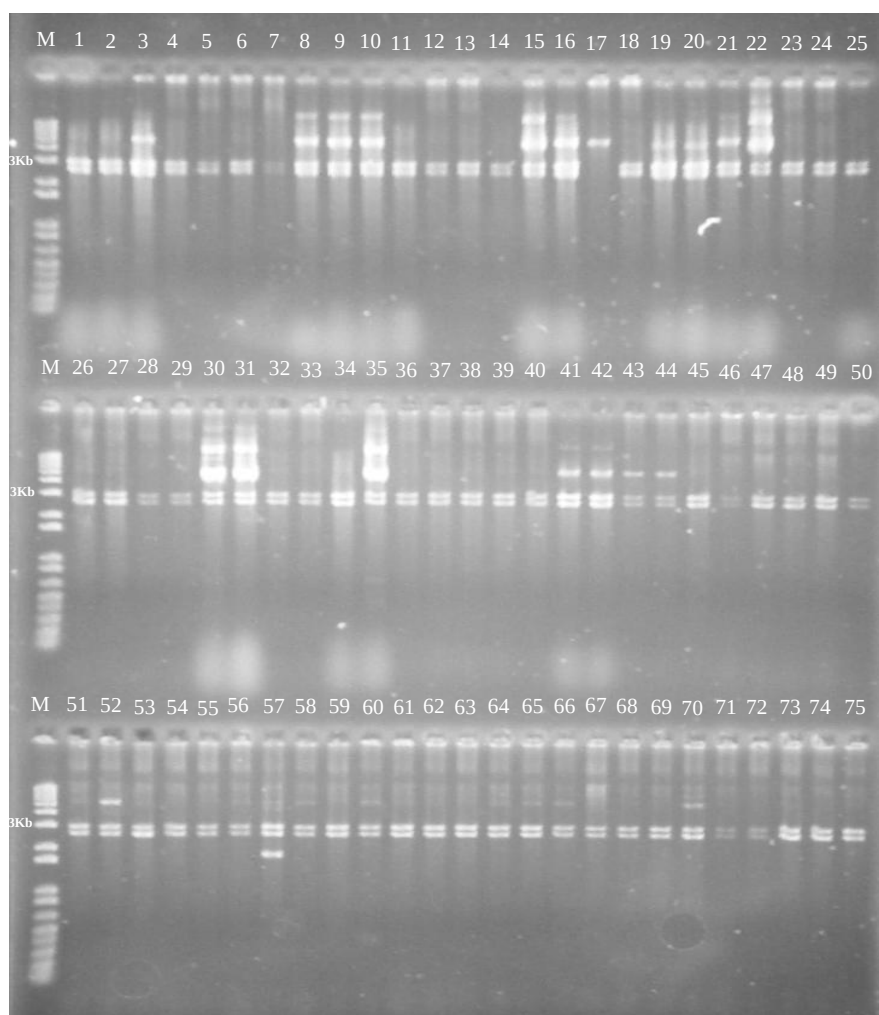


Figura 6. Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) da clivagem de DNA plasmidial proveniente da clonagem de componentes genômicos, com as enzimas *Hind* III (amostra de Viçosa) e *Bam*H I. **M**, marcador de comprimento ("1 Kb plus DNA ladder", em nucleotídeos); **1-75**, clones obtidos a partir de amostras coletas em: **1-5**, Arapiraca; **6-10**, Estrela de Alagoas; **11-15**, Viçosa; **16-20**, Coité do Noia; **21-25**, Recife; **26-30**, Belém; **31-35**, Marimondo; **36-40**, Mar Vermelho; **41-45**, Paulo Jacinto; **46-50**, Atalaia; **51-55**, União dos Palmares; **56-60**, Santana do Mundaú; **61-65**, Chã Preta; **66-70**, Rio Largo; **71-75**, Maceió.

### 4.1.3. Caracterização molecular

Os clones foram submetidos a digestão com a enzima *Hae* III, e de acordo com o padrão eletroforético observado foram selecionados 22 clones (abrangendo todos os pontos de coleta) para serem completamente sequenciados (Figura 7, Tabela 3).

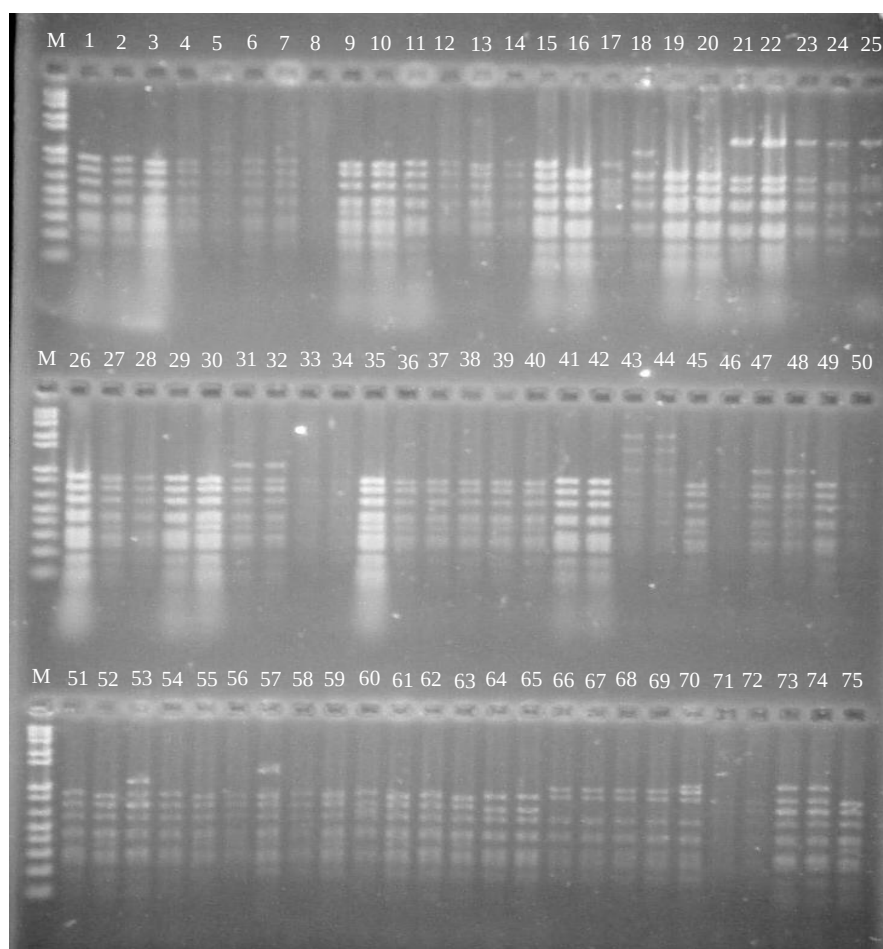


Figura 7. Padrão eletroforético em gel de agarose (1,5%) da clivagem de DNA plasmidial proveniente da clonagem de componentes genômicos com a enzima de restrição *Hae* III. **M**, marcador de comprimento (“1 Kb plus DNA ladder”, em nucleotídeos); **1-75**, DNA plasmidial dos clones correspondentes a amostras coletas em: **1-5**, Arapiraca; **6-10**, Estrela de Alagoas; **11-15**, Viçosa; **16-20**, Coité do Noia; **21-25**, Recife; **26-30**, Belém; **31-35**, Marimbondo; **36-40**, Mar Vermelho; **41-45**, Paulo Jacinto; **46-50**, Atalaia; **51-55**, União dos Palmares; **56-60**, Santana do Mundaú; **61-65**, Chã Preta; **66-70**, Rio Largo; **71-75**, Maceió.

Tabela 3. Lista de clones completamente sequenciados e procedência das amostras de *Phaseolus lunatus* (fava).

| Clones     | Isolados                              | Nº da Amostra | Procedência (Município) |
|------------|---------------------------------------|---------------|-------------------------|
| 1, 2       | BR:ARP1:05, BR:ARP2:05                | 1             | Arapiraca – AL          |
| 6, 7       | BR:ETA1:05, BR:ETA2:05                | 2             | Estrela de Alagoas – AL |
| 13         | BR:VIC:05                             | 3             | Viçosa – AL             |
| 17, 18     | BR:CNO1:05, BR:CNO2:05                | 5             | Coité do Noia – AL      |
| 23, 24     | BR:REC1:05, BR:REC2:05                | 4             | Recife – PE             |
| 27         | BR:BEL:05                             | 6             | Belém – AL              |
| 31         | BR:MRB:05                             | 7             | Marimbondo – AL         |
| 40         | BR:MAV:05                             | 8             | Mar Vermelho – AL       |
| 43         | BR:PJA:05                             | 9             | Paulo Jacinto – AL      |
| 47, 48, 49 | BR:ATA1:05, BR:ATA2:05,<br>BR:ATA3:05 | 10            | Atalaia – AL            |
| 53         | BR:UNP:05                             | 11            | União dos Palmares – AL |
| 59, 60     | BR:STM1:05, BR:STM2:05                | 12            | Santana do Mundaú – AL  |
| 61         | BR:CHP:05                             | 13            | Chã Preta – AL          |
| 69         | BR:RLA:05                             | 14            | Rio Largo – AL          |
| 73         | BR:MAC:05                             | 15            | Maceió – AL             |

A análise das sequências dos 22 clones indicou a presença de apenas uma espécie de begomovírus, *Bean golden mosaic virus*, pois os clones correspondentes às amostras de Alagoas (20 clones) e Recife, PE (2 clones) apresentaram de 90% a 94% de identidade de nucleotídeos (Tabela S2) com um isolado de BGMV de soja (FJ665283), respectivamente, ultrapassando o limite para designação de uma mesma espécie para o gênero *Begomovirus*, que é de 89% de identidade de nucleotídeos, conforme estabelecido por Fauquet et al. (2008). Todos os clones correspondiam ao DNA-A, no qual foram identificadas as ORFs *cp* (251 aa), *rep* (361 aa), *ren* (132 aa), *trap* (129 aa) e AC4 (87 aa para os clones provenientes da amostra de Recife, e 85 aa para os clones provenientes das amostras de Alagoas). Estes resultados estão de acordo com os relatados por Silva (2006), que



identificou pela primeira vez a presença de BGMV infectando fava nos estados de Alagoas e Pernambuco. BGMV também foi encontrado infectando fava em Sergipe (Oliveira et al., 2005). Faria e Maxwell (1999), trabalhando com 20 isolados de begomovírus provenientes de seis estados brasileiros (Bahia, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraná e São Paulo), de plantas de feijoeiro (*P. vulgaris*) coletadas em 1991, 1995 e 1996, identificaram todos os isolados como BGMV. Os resultados obtidos neste trabalho comprovam que BGMV está amplamente distribuído na cultura da fava no estado de Alagoas. O mesmo não pode ser afirmado para o estado de Pernambuco visto que o número de amostras analisadas foi pequeno.

O mosaico dourado do feijoeiro causado pelo BGMV é uma das principais doenças dessa cultura, que tem dificultado ou mesmo inviabilizado a produção de feijão em várias regiões do Brasil (Aragão et al., 2004). Esta doença foi descrita por Costa em 1965 como uma doença que inicialmente não teria importância econômica, ocorrendo no estado de São Paulo (Costa, 1965). No início dos anos 70, as plantações de feijoeiro nos estados de São Paulo, Paraná e Minas Gerais foram severamente atingidas pela doença. A extensão das perdas em condições de campo fica em torno de 40 a 85% podendo atingir até 100% (Gálvez e Molaes, 1989). A ampla distribuição do BGMV, infectando fava, observada neste trabalho pode ser explicada pela alta capacidade de disseminação do inseto vetor (Ambrozevicius et al., 2002) e, pelo fato de *B. tabaci* estar presente no Brasil a bastante tempo, foi detectada pela primeira vez em 1928, e ser capaz de colonizar com sucesso hospedeiras leguminosas como fava (Oliveira et al., 2001).

#### **4.2. Análise filogenética**

Para determinar o relacionamento filogenético dos isolados de BGMV encontrados em Alagoas e em Recife (PE) com outros isolados de begomovírus, foram construídas árvores filogenéticas baseadas nas sequências do DNA-A (Figuras 8 e 9). Todas as sequências obtidas a partir das amostras coletadas agruparam-se com BGMV de soja e feijão do Brasil, conforme esperado com base na identificação de todos os 22 isolados como BGMV.

Também de acordo com os resultados obtidos pelas comparações de sequências, a análise filogenética mostrou que os dois isolados de BGMV clonados a partir da amostra de fava coletada em Recife (PE), possuem um relacionamento filogenético mais próximo com o isolado de BGMV de soja (acesso FJ665283) do que os isolados de Alagoas.

Os isolados apresentaram divisão filogenética de acordo com localização geográfica, ou seja, os clones obtidos das amostras de Alagoas e Pernambuco divergiram, sugerindo a existência de subdivisão da população. Dado este fato, a análise da estrutura genética da população viral excluiu os isolados de Recife. A divisão filogeográfica da população de BGMV em fava pode ser explicada em parte devido ao fato de este vírus não ser transmitido via sementes, a forma de propagação desta cultura.

Esta divisão filogenética segundo localização geográfica é comum em geminivírus como observado anteriormente por diversos autores (Martin et al., 2001; Castillo-Urquiza, 2008; Varsani et al., 2009).

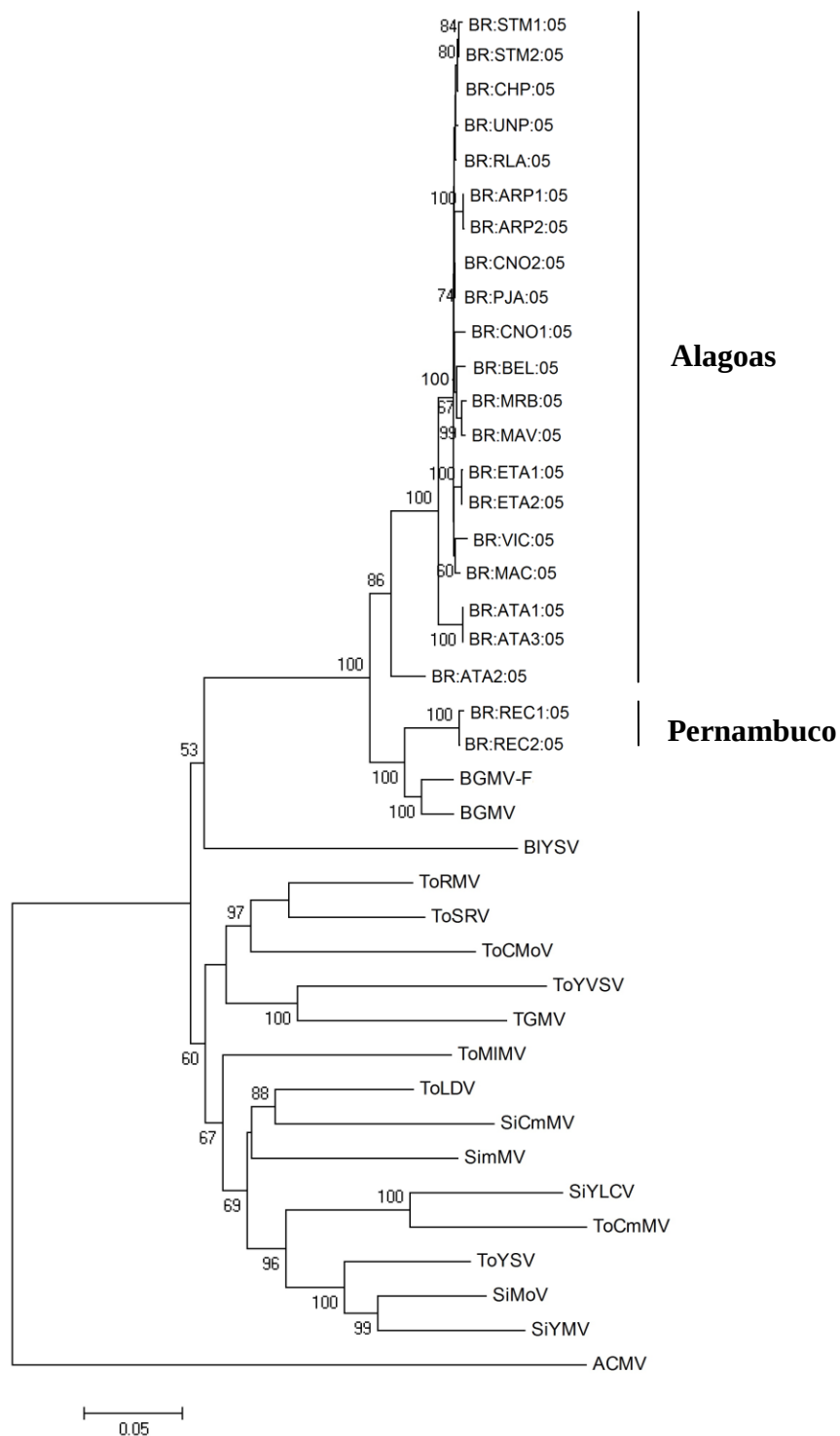


Figura 8. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento de sequências completas de nucleotídeos do DNA-A de 22 isolados de *Bean golden mosaic virus* provenientes de fava (*Phaseolus lunatus*) e outros begomovírus do Brasil. A árvore foi obtida pelo programa MEGA 4 utilizando o método Neighbor-joining com análise “bootstrap” (2000 repetições). A barra horizontal indica o valor de substituições por sítio.

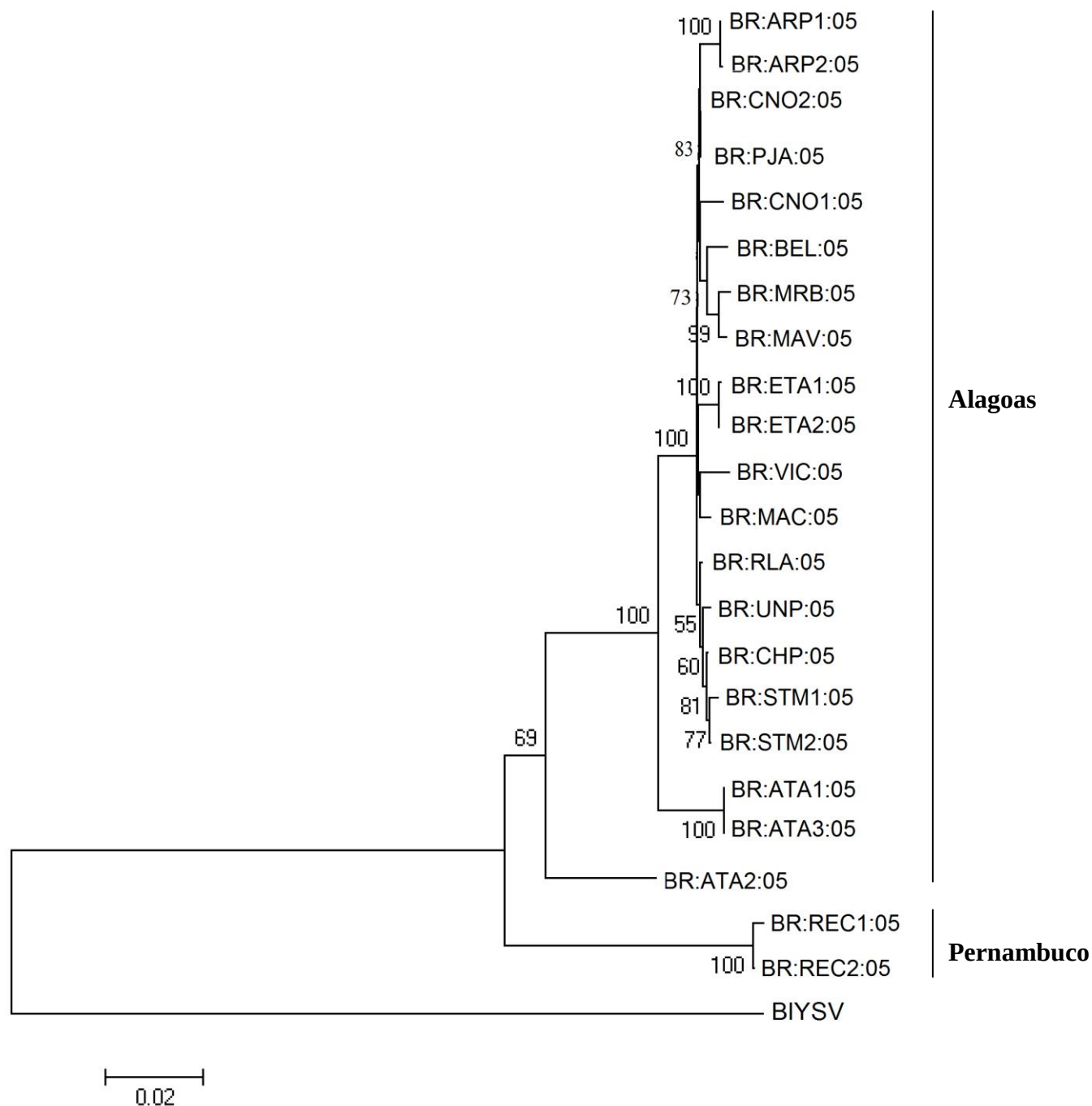


Figura 9. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento de sequências completas de nucleotídeos do DNA-A de 22 isolados de *Bean golden mosaic virus* provenientes de fava (*Phaseolus lunatus*). A árvore foi obtida pelo programa MEGA 4 utilizando o método Neighbor-joining com análise “bootstrap” (2000 repetições). A barra horizontal indica o valor de substituições por sítio.

### 4.3. Determinação da estrutura genética da população de BGMV de fava

As 20 sequências correspondentes aos clones de BGMV provenientes de amostras de Alagoas foram utilizadas para caracterizar a população viral infectando fava. Comparando-se esta população com outras duas populações de begomovírus infectando tomate, *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) e *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV) da região Sudeste do Brasil (municípios de Coimbra, MG e Paty do Alferes, RJ, respectivamente), observa-se que a população de BGMV apresenta maior variabilidade genética, representada por maiores valores de sítios polimórficos, número total de mutações, diversidade nucleotídica, número médio de diferenças de nucleotídeos, diversidade haplotípica, taxa de mutação de sítios segregantes (Theta-W) e taxa de mutações (Theta-Eta) em relação às populações de ToYVSV e ToCmMV (Tabela 4).

Os resultados de Silva (2006) indicavam uma alta variabilidade genética entre isolados de BGMV de fava, com base no padrão de restrição do DNA viral com endonucleases. A maior variabilidade genética dos isolados de BGMV de fava (*P. lunatus*), em relação a isolados de espécies que infectam o tomateiro, pode ser devido à base genética dos hospedeiros, pois o tomateiro vem sendo constantemente melhorado para resistência contra vírus, enquanto a fava não tem uma base genética tão estreita, já que esta não tem sido objeto de intensos estudos de melhoramento genético. Pode ser também devido ao fato de as populações do patógeno BGMV e da planta hospedeira *P. lunatus* estarem em processo de co-evolução a muito mais tempo que os patossistemas de begomovírus infectando tomateiro, gerando assim maior variabilidade genética na população de BGMV em fava, visto que *B. tabaci* biótipo A, a qual ocorria originalmente no Brasil, até 1992 quando foi introduzido o biótipo B (Melo, 1992), e aquele colonizar hospedeiras leguminosas como fava com grande eficiência, porém não hospedeiras solanáceas como o tomateiro. Os vírus infectando tomateiro passaram a ter contato com seu hospedeiro apenas a partir da introdução do biótipo B.

A análise de sequências de nucleotídeos de vírus emergentes demonstrou que fatores como replicação, recombinação e pseudo-recombinação contribuem para a evolução de begomovírus (Andrade et al., 2006; Racheed et al., 2006; Duffy e Holmes, 2008; 2009) e, diversos trabalhos têm indicado um elevado grau de diversidade genética em populações

de begomovírus, contudo não há trabalhos relatando estrutura genética de begomovírus infectando leguminosas (Faria e Maxwell, 1999; Ambrozevicius et al., 2002; Assunção, et al., 2006; Silva, 2006; Cotrim et al., 2007; Castillo-Urquiza, 2008).

Tabela 4. Estrutura genética da população de *Bean golden mosaic virus* (BGMV) obtidos de plantas de fava (*Phaseolus lunatus*) em Alagoas (municípios de Arapiraca, Atalaia, Belém, Chã Preta, Coité do Noia, Estrela de Alagoas, Maceió, Mar Vermelho, Marimondo, Paulo Jacinto, Rio Largo, Santana do Mundaú, São João, União dos Palmares e Viçosa), em comparação com populações de *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) e *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV) da região Sudeste do Brasil (municípios de Coimbra, MG e Paty do Alferes, RJ). Dados referentes ao DNA-A.

| População        | Número de sequências | Número de sítios polimórficos | Número total de mutações | No. médio de dif. de nucleotídeos (k) | Diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) | Número de haplótipos | Diversidade haplotípica (Hd) | Theta-W (S) | Theta-eta |
|------------------|----------------------|-------------------------------|--------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|----------------------|------------------------------|-------------|-----------|
| BGMV (Alagoas)   | 20                   | 251                           | 265                      | 40.321                                | 0.0154                             | 18                   | 0.989                        | 0.0271      | 0.0295    |
| ToYVSV (Coimbra) | 31                   | 50                            | 50                       | 5.247                                 | 0.0021                             | 25                   | 0.985                        | 0.0049      | 0.0049    |
| ToCmMV (Total)   | 24                   | 103                           | 104                      | 35.257                                | 0.0142                             | 20                   | 0.975                        | 0.0108      | 0.0109    |
| ToCmMV (Paty)    | 11                   | 11                            | 11                       | 2.000                                 | 0.0008                             | 8                    | 0.891                        | 0.0015      | 0.0015    |
| ToCmMV (Coimbra) | 13                   | 92                            | 93                       | 24.782                                | 0.0097                             | 12                   | 0.987                        | 0.0116      | 0.0117    |

## 5. CONCLUSÕES

Foi confirmada uma alta incidência de begomovírus, pois 100% das amostras de fava coletadas apresentaram-se positivas pela análise de PCR.

Apenas uma espécie viral foi encontrada infectando *Phaseolus lunatus*, o *Bean golden mosaic virus*, mostrando uma ampla distribuição desse vírus nos cultivos de fava em Alagoas.

Os isolados de BGMV agruparam-se por localização geográfica na análise filogenética: os isolados de Recife (PE) foram filogeneticamente mais próximos de um isolado de BGMV de soja em comparação aos isolados de Alagoas.

A população de BGMV infectando fava apresentou uma alta taxa de variabilidade genética, significativamente maior do que de populações de begomovírus que infectam tomateiro no sudeste brasileiro.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahlquist P. RNA-Dependent RNA Polymerases, Viruses, and RNA Silencing. *Science* 296, 1270, 2002.
- Ambrozevicius, L.P., Calegario, R.F., Fontes, E.P.B. Carvalho, M.G. e Zerbini, F.M. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v.27, p.372-377. 2002.
- Andrade, E. C., Manhani, G.G., Alfenas, P.F., Calegario, R.F., Fontes, E.P. e Zerbini, F.M. *Tomato yellow Sport virus*, a tomato-infecting begomovirus from Brazil with a close relationship to viruses from *Sida* sp. Forms pseudorecombinants with begomovirus from tomato but not from *Sida*. *Journal of General Virology*, v.87, p.3687-3696. 2006.
- Aragão, F. J. L. e Faria, J. C. Obtenção de feijoeiro resistente ao vírus do mosaico dourado. Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia e Embrapa Arroz e Feijão. Brasília, 13 p, 2004. (Disponível em: [www.cnpaf.embrapa.br](http://www.cnpaf.embrapa.br), acesso 10 de julho de 2009).
- Arguello-Astorga, G., Ascencio-Ibanez, J.T., Dallas, M.B., Orozco, B.M. e Hanley-Bowdoin, L. High frequency reversion of geminivirus replication protein mutants during infection. *Journal of Virology*. 2007.
- Arguello-Astorga, G., Herrera-Estrella, L. e Rivera-Bustamante, R. experimental and theoretical definition of geminivirus origin of replication. *Plant Molecular Biology*, v.26, p.553-556. 1994.
- Assunção, I.P., Listik, A.F., Barros, M.C.S., Amorim, E.P.R., Silva, S.J.C., Izael, O. S., Ramalho-Neto, C.E. e Lima, G.S.A. Diversidade Genética de *Begomovirus* que Infectam Plantas Invasoras na Região Nordeste. *Planta Daninha*, Viçosa-MG, v. 24, n. 2, p. 239-244, 2006.
- Awadalla, P. The evolutionary genomics of pathogen recombination. *Nature Reviews Genetics*, v.4, p.50-60. 2003.

- Bedford, I.D., Briddon, R.W., Brown, J.K., Rosell, R.C. e Markham, P.G. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographical regions. *Annals of Applied Biology*, v.125, p.311-325. 1994.
- Bedford, I.D., Briddon, R.W., Markham, P.G., Brown, J.K., Rosell, R.C. *Bemisia tabaci*-biotype characterisation and the threat of this whitefly species to agriculture. In: Brighton Crop Protection Conference-Pests and Diseases. BritishCrop Protection Council.
- Brasileiro, A. C. M. & Carneiro, V. T. de C. Manual de transformação genética de plantas. Embrapa-Cenargen, p. 309, 1998.
- Briddon RW, Stanley J. Subviral agents associated with plant single stranded DNA viruses. *Virology* 344:198–210, 2006.
- Briddon, R.W. Cotton leaf curl disease, a multicomponent begomovirus complex. *Molecular Plant Pathology*, v.4, p.427-434. 2003.
- Briddon, R.W., Bedford, I.D., Tsai, J.H. e Markham, P.G. Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, tomato pseudo-curly top virus, suggests a recombinant origin. *Virology*, v.219, p.387-394. 1996.
- Briddon, R.W., Bull, S.E., Amin, I., Idris, A.M., Mansoor, S., Bedford, I.D., Dhawan P., Rishi, N., Siwatch, S.S., abdel-Salam, A.M., Brown, J.K., Zafar, Y. e Markham, P.G. Diversity of DNA beta, a satellite molecular associated with some monopartite begomoviruses. *Virology*, v.312, p.106-121. 2003.
- Briddon, R.W., Mansoor, S., Bedford, I.D., Pinner, M.S., Saunders, K., Stanley, J., Zafar, Y., Malik, K.A. e Markham, P.G. Identification of dna components required for induction of cotton leaf curl disease. *Virology*, v.285, p.234-243. 2001.
- Briddon, R.W., Pinner, M.S., Stanley, J. e Markham, P.G. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology*, v.177, p.85-94. 1990.

- Bull, S. E., Briddon, R. W., Sserubombwe, W. S., Ngugi, K., Markham, P. G. & Stanley, J. Genetic diversity and phylogeography of cassava mosaic viruses in Kenya. *Journal General of Virology*, 87, 3053–3065. 2006.
- Bull, S.E., Tsai, W.S., Briddon, R.W., Markham, P.G., Stanley, J. e Green, S.K. Diversity of begomovirus DNA beta satellites of non-malvaceous plant in east and south east Asia. *Archives of Virology*, v.149, p.1193-1200. 2004.
- Carrington, J. C., Kasschau, K. D., Mahajan, S. K., and Schaad, M. C. Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *Plant Cell* 8:1669-1681. 1996.
- Castillo-Urquiza, G.P., Beserra Jr., J.E.A., Bruckner, F.P., Lima, A.T.M., Varsani, A., Alfenas-Zerbini, P. & Zerbini, F.M. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Archives of Virology* DOI: 10.1007/s00705-008-0172-0. 2008.
- Catillo-Urquiza, G.P., Beserra Junior, J.E.A., Alfenas-Zerbini, P., Varsani, A., Lima, A.T.M., Barros, D.R. e Zerbini, F.M. Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato in Paty do Alferes, Rio de Janeiro state, Brazil. *Virus Reviews and Research*, v.12, p.223. 2007.
- Costa, A.S. Three whitefly-transmitted virus diseases of beans in São Paulo, Brazil. *Plant Protection Bulletin* 13: 121-130. 1965.
- Cotrim, M.A., Krause-Sakate, R., Narita, N., Zerbini, F.M. e Pavan, M.A. Diversidade genética de begomovirus em cultivo de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. *Summa Phytopathologica*, v.33, p.300-303. 2007.
- Cui, X. & Zhou, X. AC2 and AC4 proteins of *Tomato yellow leaf curl China virus* and *Tobacco curly shoot virus* mediate suppression of RNA silencing. *Chinese Science Bulletin*, p. 2607—2612 Vol. 49 No. 24, 2004.
- Dawson, W. O., and Hilf, M. E. Host-range determinants of plant viruses. *Annual Review. Plant Physiology. Plant Molecular Biology*. 43:527-557. 1992.

- Duffy, S. e Holmes, E. C. Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). *J. Virol.* 82, p. 957–965. 2008.
- Duffy, S. e Holmes, E. C. Validation of high rates of nucleotide substitution in geminiviruses: phylogenetic evidence from *East African cassava mosaic viruses*. *Journal of General Virology*, 90, p. 1539–1547. 2009.
- Eini, O., Akbar S.A. B., Dogra, S., Dry, I. B., Randles, J. W. e Rezaian, M. A. Identification of sequence elements regulating promoter activity and replication of a monopartite begomovirus-associated DNA b satellite. *Journal of General Virology*, 90, 253–260, 2009.
- Faria, J. C. e Maxwell, D. P. Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. *Phytopathology*. v. 89, p. 262-268, 1999.
- Faria, J. C.; Bezerra, I. C.; Zerbini, F. M.; Ribeiro, S. G. e Lima, M. F. Situação atual das geminiviroses no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*. 25:125-137. 2000.
- Faria, J.C. e Zerbini, F. M. Família *Geminiviridae*: Taxonomia, replicação e movimento. In: (Luz, W. C; Fernandes, J. M; Prestes, A. M; e Picinini, E. C.) *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. Passo Fundo: RAPP, 2000. v. 8, p. 27-57. 2000.
- Faria, J.C. Souza-Dias, J.A.C., Slack, S. e Maxwell, D.P. A new geminivirus associated with tomato in the State of São Paulo, Brazil. *Plant disease*, v.81, p.423. 1997.
- Farnham, UK, pp. 1235–1240. 1992.
- Fauquet, C. M.; Briddon, R. W.; Brown, J. K.; Moriones, E.; Stanley, J.; Zerbini, M. e Zhou, X. Geminivirus stain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology*. v. 153, p. 783-821, 2008.

- Fondong VN, Pita JS, Rey ME, de Kochko A, Beachy RN, Fauquet CM: Evidence of synergism between *African cassava mosaic virus* and a new double-recombinant geminivirus infecting cassava in Cameroon. *Journal General of Viroogyl*, 81:287-297. 2000.
- Fontenelle, M.R., Luz, D.F., Gomes, A.P., Florentino, L.H., Zerbini, F.M. e Fontes, E.P. Functional analysis of the naturally recombinant DNA-A of the bipartite begomovirus tomato chlorotic mottle vírus. *Virus Research*, v.126, p.262-267. 2007.
- Fontes, E.P.B., Eagle, P.A., Sipe, P.S., Luckow, V.A. e Hanley-Bowdoin, L. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. *Journal of Biological Chemistry*, v.269, p.8459-8465. 1994.
- Fontes, E.P.B., Luckow, V.A e Hanley-Bowdoin, L. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. *Plant Cell*, v.4, p.597-608. 1992.
- Galvão, R.M., Fernandes, A.V., Almeida, J.D., Alfenas, P.F., Andrade, E.C. e Fontes, E.P.B. Molecular characterization of two new tomato-infecting geminiviruses and the Sida-infecting geminiviruses complex from Brazil. *International Workshop on Bemisia and geminiviral diseases*. San Juan – Puerto Rico, 1998.
- Gálvez, G.E.; Morales, F.J. Withfly-transmitted viruses. In : Schwartz, H.F. e PASTOR-CORRALES, M.A. (Ed.) *Bean production problems in the tropics*. 2 ed. Cali, CIAT, p.379-406, 1989.
- Garcia-Arenal, F., Fraile, A. e Malpica, J.M. Variation and evolution of plant virus populations. *International Microbiology*, v.6, p.225-232. 2003.
- Ge, L., Zhang, J., Zhou, X. e Li, H. Genetic structure and population variability of *Tomato yellow leaf curl China virus*, *Journal of Virology*, v.81, p.5902-5907. 2007.
- Gilbertson, R. L., and Lucas, W. J. How do viruses traffic on the vascular highway? *Trends Plant Science*. 1:260-267. 1996.

- Gilbertson, R.L., Faria, J.C., Ahlquist, P. e Maxwell, D.P. Genetic diversity geminiviruses causing *Bean golden mosaic virus* disease: the nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of a Brazilian isolate of bean golden mosaic geminivirus. *Phytopathology*, v.83, p.709-715. 1993a.
- Gilbertson, R.L., Hidayat, S.H., Paplomatas, E.J., Rojas, M.R., Hou, Y.-H e Maxwell, D.P. pseudorecombination between infectious cloned DNA components of tomato mottle and bean dwarf mosaic geminiviruses. *Journal of General Virology*, v.74, p.23-31. 1993b.
- Gopal P.; Kumar P. P.; Sinilal B.; Jose J.; Yadunandam A.; Usha R. Differential roles of C4 and bC1 in mediating suppression of post-transcriptional gene silencing: evidence for transactivation by the C2 of Bendi yellow vein mosaic virus, a monopartite begomovirus. *Virus Res* 123:9–18, 2007.
- Gutierrez, C. Geminivirus DNA replication. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.56, p.313-329. 1999.
- Haible, D., Kober, S. e Jeske, H. Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. *Journal of Virological Methods*, v.135, p.9-16. 2006.
- Hanley-Browdoin, L., Settlege, S.B., Orozco, B.M., Nagar, S. e Robertson, D. Geminivirus: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.18, p.71-106. 1999.
- Harkins, G. W. et al. Dating the origins of the maize-adapted strain of maize streak virus, MSV-A. *Journal of General Virology*, 90, 3066–3074, 2009.
- Harrison, B.D. e Robinson, D.J. Natural genomic and antigenic variation in white-fly transmitted geminiviruses (begomoviruses). *Annual Review of Phytopathology*, v.39, p.369-398. 1999.
- Harrison, B.D., Liu, Y.L., Khalid, S., Hameed, S., Otim Nape, G.W. e Robinson, D.J. Detection and relationships of cotton leaf curl virus and allied whitefly-transmitted geminiviruses occurring in Pakistan. *Annals of Applied Biology*, v.130, p.61-75. 1997.

- Hill, J.E., Strandberg, J.O., Hiebert, E. e Lazarowitz, S.G. Asymmetric infectivity of pseudorecombinants of cabbage leaf curl virus and squash leaf curl virus: Implications for bipartite geminivirus evolution and movement. *Virology*, v.250, p.283-292. 1998.
- Hofer, P., Bedford, I.D., Markham, P.G., Jeske, H. e Frischmuth, T. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. *Virology*, v.236, p.288-295. 1997.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Produção Agrícola Municipal – Cereais, Leguminosas e Oleaginosas. Rio de Janeiro, 2007, disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas>, acesso em 15 de outubro de 2009.
- Ilyina, T.V. e Koonin, E.V. Conserved sequence motifs in the initiator protein for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes and archaeobacteria. *Nucleic Acids Research*, v.20, p.3279-3285. 1992.
- Inoue-Nagata, A. K.; Albuquerque, L. C.; Rocha, W. B. e Nagata, T. A simple method for cloning of the complete begomovirus using the bacteriophage phi 29 DNA polymerase. *Journal of Virological Methods*. 116:209-211, 2004.
- Isnard, M., Granier, M., Frutos, R., Reynaud, B. e Peterschmitt, M. Quasispecies nature of three maize streak virus isolates obtained through different modes of selection from a population used to assess response to infection of maize cultivars. *Journal of Virology*, v.79, p.3090-3099. 1998.
- Jenkins, G.M., Rambaut, A., Pybus, O.G. e Holmes, E.C. Rates of molecular evolution in RNA viruses: A quantitative phylogenetic analysis. *Journal of Molecular Evolution*, v.54, p.156-165. 2002.
- Kon T.; Sharma P.; Ikegami M. Suppressor of RNA silencing encoded by the monopartite tomato leaf curl Java begomovirus. *Arch Virol* 152:1273–1282, 2007.
- Laufs, J., Schumacher, S., Geisler, N., Jupin, I. e Gronenborn, B. Identification of the nicking tyrosine of geminivirus Rep protein. *FEBS Letters*, v.377, p.258-262. 1995a.

- Laufs, J., Traut, W., Heyraud, F., Matzeit, G., Rogers, S.G., Schell, J. e Gronenborn, B. *In vitro* cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of *Tomato yellow leaf curl virus*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, v.92, p.3879-3883. 1995b.
- Lazarowitz, S.G. geminiviruses: Genome structure and gene function. Critical reviews in Plant sciences, v.11, p.327-349. 1992.
- Lefevre, P., Martin, D. P., Hoareau, M., Naze, F., Delatte, H., Thierry, M., Varsani, A., Becker, N., Reynaud, B. & Lett, J. M. Begomovirus ‘melting pot’ in the south-west Indian Ocean islands: molecular diversity and evolution through recombination. Journal General of Virology, 88, 3458–3468. 2007.
- Lopes, A. C. P. A.; Barros, M. C. S.; Silva, S. J. C.; Assunção, I. P. Lima, G. S. A.; Denise Silva, D. M. W. e Ramalho Neto, C. E. Ocorrência de *Begomovirus* em fava no Estado de Alagoas. Anais: VII Reunião Nacional da SBBp E 2<sup>nd</sup> International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biothechnology – SBBp, Recife: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular/ Secretaria Regional de Pernambuco, UFPE, período 17 a 19/11/2004, p. 62.
- Mansoor, S., briddon, R.W., Zafar, Y. e Stanley, J. Geminivirus disease complexes: An emerging threat. Trends in Plant Sciences, v.8, p.128-134. 2003.
- Martin, D. P., Willment, J. A., Billharz, R., Velders, R., Odhiambo, B., Njuguna, J., James, D. & Rybicki, E. P. Sequence diversity and virulence in Zea mays of Maize streak virus isolates. Virology, 288, 247–255. 2001.
- Melo, P.C.T. Mosca branca ameaça produção de hortaliças. Campinas, SP, Brazil: Asgrow do Brasil Sementes Ltda., Technical Bulletin 1992.
- Monci, F., Sanchez-Campos, S., Navas-Castillo, J. e Moriones, E. A natural recombinant between the geminivirus *Tomato yellow leaf Curl Sardinia vírus* and *tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. Virology, v.303, p.317-326. 2002.



- Ndunguru, J., Legg, J. P., Aveling, T. A., Thompson, G. & Fauquet, C. M. 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. 2005.
- Nelson, R. S., and van Bel, A. J. E. The mystery of virus trafficking into, through and out of vascular tissue. *Prog. Bot.* 59:476-533. 1997.
- Oliveira, E. C.; Silva-Mann, R; Franco Filho, E.; Boari, A. J. Identificacao de Begomovirus em fava (*Phaseolus lunatus* L.) no Estado de Sergipe. In: XV Encontro de Iniciacao Cientifica, 2005, Sao Cristovao. VII Congresso de Iniciacao Cientifica. Sao Cristovao: UFS, p. 139-139, 2005.
- Oliveira, M.R.V., Henneberry, T.J., Anderson, P. History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. *Crop Protection* 20, 709–723, 2001.
- Ooi, K., Ohshita, S., Ishii, I. e Yahara, T. Molecular phylogeny of geminivirus infecting wild plant in Japan. *Journal of Plant Research*, p.247-257. 1993.
- Orozco, B.M. e Hanley-Bowdoin, L. Conserved sequence and structural motifs contribute to the DNA binding and cleavage activities of a geminivirus replication protein. *Journal of Biological Chemistry*, v.273, p.24448-24456. 1998.
- Orozco, B.M., Miller, A.B., Settlege, S.B., e Hanley-Bowdoin, L. Functional domains of a geminivirus replication protein. *Journal of Biological Chemistry*, v.272, p.9840-9846. 1997.
- Owor, B.E., Martin, D.P., Sheherd, D.N., Edema, R., Monjane, A.L., Rybicki, E.P., Thomson, J.A. e Varani, A. Genetic analysis of *Maize streak virus* isolates from Uganda reveals widespread distribution of a recombinant variant. *Journal of General Virology*, v.88, p.3154-3165. 2007.
- Padidam, M., Beachy, R.N. e Fauquet, C.M. Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. *Journal of General Virology*, v.76, p.249-263. 1995.

- Padidam, M., Sawyer, S. e Fauquet, C.M. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology*, v.265, p. 218-224. 1999.
- Paplomatas, E.J., Patel, V.P., Hou, Y.M., Noueiry, A.O. e Gilbertson, R.L. Molecular characterization of a new sap-transmissible bipartite genome geminivirus infecting tomatoes in Mexico. *Phytopathology*, v.84, p.1215-1224. 1994.
- Pita, J.S., Fondong, V.N., Sangare, A., Otim-Nape, G.W., Ogwal, S. e Fauquet, C.M. Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. *Journal of Virology*, v.82, p.655-665. 2001.
- Rasheed, M. S., L. A. Selth, A. M. Koltunow, J. W. Randles, and M. A. Rezaian. Single-stranded DNA of Tomato leaf curl virus accumulates in the cytoplasm of phloem cells. *Virology* 348:120–132. 2006.
- Ribeiro, S.G., Ambrozevicius, L.P., Ávila, A.C., Bezzera, I.C., Calegario, R.F., Fernandes, J.J., Lima, M.F., Mello, R.N., Rocha, H. e Zerbini, F.M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology*, v.148, p.281-295. 2003.
- Ribeiro, S.G., Mello, L.V., Boiteux, L.S., Kitajima, E.W. e Faria, J.C. Tomato infection by a geminivirus in the Federal District, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v.19, p.330. 1994.
- Ridgen, J.E., Dry, I.B., krake, L.R. e Rzaian M.A. Plant virus DNA replicaton proceses in *Agrobacterium*: insigh into the origins of the geminiviruse? *Proceeding of the National Acadmy of Sciences, USA*, v.93, p.10280-10284. 1996.
- Rojas, M. R.; Gilbertson, R. L.; Russell, D. R. e Maxwell, P. Use of degenerated primers in the Polymerase Chain Reaction to detect whitefly-transmitted Geminiviruses. *Plant Disease*, v. 77, n. 4, p. 340-347, 1993.

- Rojas, M.R., Hagen, C., Lucas, W.J. e Gilbertson, R.L. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology*, v.43, p.361-394. 2005.
- Rojas, M.R., Jiang, H., Salati, ., Xoconostle-Cazares, B., Sudarshana, M.R., Lucas, W.J. e Gilbertson, R.L. Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, *Tomato yellow leaf curl virus*. *Virology*, v.291, p.110-125. 2001.
- Rojas, M.R., Noueiry, A.O., Lucas, W.J. e Gilbertson, R.L. Bean dwarf mosaic geminivirus movement proteins recognize DNA in a form- and size-specific manner. *Cell*, v.95, p.105-113. 1998.
- Rozas, et al. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, pp.1451-1452, 2009.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. e Maniatis, T. *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.
- Sanderfoot, A.A., e Lazarowitz, S.G. Cooperation in viral movement: The geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery. *Plant Cell*, v.7, p.1185-1194. 1995.
- Sanderfoot, A.A., e Lazarowitz, S.G. Getting it together in plant virus movement: Cooperative interaction between bipartite geminivirus movement proteins. *Trends in Cell Biology*, v.6, p.353-358. 1996.
- Santos C.D.G., Ávila, A.C., Inoue-Nagata, A.K. e Resende, R.O. Espécies vegetais hospedeiras de begomovírus isolados e tomateiro em Goiás e no Distrito Federal. *Fitopatologia Brasileira*, v.29, p. 450-455. 2004.
- Santos, D.; Corlet, F. M. F.; Mendes, J. E. M. F. e Wanderley Júnior, J. S. A. Produtividade e morfologia de vagens e sementes de variedades de feijão no Estado da Paraíba. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 37, n. 10, p. 1407-1412, 2002.

- Sanz, A.I., Fraile, A., Gallego, J.M., Malpica, J.M. e Garcia-Arenal, F. Genetic variability of natural populations of cotton leaf curl geminivirus, a single-stranded DNA virus. *Journal of Molecular Evolution*, v.49, p.672-681. 1999.
- Sanz, A.I., Fraile, A., Garcia-Arenal, F., Zhou, X., Robinson, D.J., Khalid, S., Butt, T. e Harrison, B.D. Multiple infection, recombination and genome relationships among begomovirus isolates found in cotton and other plants in Pakistan. *Journal of General Virology*, v.81, p.1839-1849. 2000.
- Seal, S.E., Jeger, M.J. e Van Den Bosch, F. Begomovirus evolution and disease management. *Advances in Virus Research*, v.67, p. 297-316. 2006.
- Sharma, P. & Ikegami, M. RNA-silencing suppressors of geminiviruses. *J Gen Plant Pathol* 74:189–202, 2008.
- Silva, S. J. C. Diversidade genética de Begomovirus em plantas de fava (*Phaseolus lunatus* L.) nos estados de Alagoas e Pernambuco. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Alagoas, 58p. 2006.
- Stanley, J. Analysis of *African cassava mosaic virus* recombinants suggests strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. *Virology*, v.206, p.707-712. 1995.
- Stanley, J., Bisaro, D.M., Briddon, R.W., Brown, J.K., Fauquet, C.M., Harrison, B.D., Rybick, E.P. & Stenger, D.C. Family *Geminiviridae*. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. & Ball, L.A. (Ed.). *Virus Taxonomy*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press. pp. 301-326. 2005.
- Sunter, G., Hartitz, M.D., Hormuzdi, S.G., Brough, C.L. e Bisano, D.M. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required for coat protein accumulation while ORF L3 is necessary for efficient DNA replication. *Virology*, v.179, p.69-77. 1990.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673–4680. 1994.

- Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, J.A., Brown, J.K., Becerra-Flora, A. e Rivera-Bustmante, R. detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the Southern United States. *Phytopathology*, v.86, p.1186-1192. 1996.
- Vanitharani, R., Chellappan, P., Pita, J.S. e Fauquet, C.M. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology*, v.78, p.9487-9498. 2004.
- Varsani, A., et al. Comparative analysis of Panicum streak virus and Maize streak virus diversity, recombination patterns and phylogeography. *Virology Journal*, 6:194 doi:10.1186/1743-422X-6-194. 2009.
- Varsani, A., Shepherd, D. N., Monjane, A. L., Owor, B. E., Erdmann, J. B., Rybicki, E. P., Peterschmitt, M., Briddon, R. W., Markham, P. G. & other authors. 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. 2008.
- Viera, R. F. A cultura do feijão-fava. *Informe Agropecuario*, Belo Horizonte, v. 16, n. 174, p. 30-37, 1992.
- Villas-Bôas, G. L. et al. Predominância do biótipo B de mosca branca (*Bemisia argentifolii*) em diversos hospedeiros e regiões do Brasil. *Anais, 8º Encontro Latino-Americano e do Caribe Sobre Moscas Brancas e Geminivirus*, Recife, p. 150, 1999.
- Zerbini, F.M., Andrade, E.C., Barros, D.R., Ferreira, S.S., Lima, A.T.M., Alfenas, P.F. e Melo, R.N. Traditional and novel strategies for geminivirus management in Brazil. *Australasian Plant Pathology*, v.34, p.475-480. 2005.
- Zhang, W., Olson, N.H., Baker, T.S., Faulkner, L., Agrandje-Mchenna, M., Boulton, M.I., Davies, J.W. & Mckenna, R. Structure of the *Maize streak virus* geminate particle. *Virology* 279:471-7. 2001.

- Zhou, X., Liu, Y., Calvert, L., Munoz, C., Otim-Nape, G.W., Robinson, D.J. e Harrison, B.D. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *Journal of General Virology*, v.78, p.2101-2111. 1997.
- Zhou, X., Xie, Y., Tao, X., Zhang, Z., Li, Z. e Fauquet, C.M. Characterization of DNAbeta associated with begomoviruses in China and evidence for co-evolution with their cognate viral DNA-A. *Journal of General Virology*, v.84, p.237-247. 2003.
- Zimmermann, M. J. de O.; Teixeira, M. G. Origem e evolução. In: Araújo, R. S.; Rava, C. A.; Stone, L. F.; Zimmermann, M. J. de O. (Coord.). *Cultura do feijoeiro comum no Brasil*. Piracicaba: Potafos, p. 57-60, 1996.

### Material Suplementar

Tabela S1. Isolados de begomovírus utilizados para comparação filogenética com os isolados de fava (*Phaseolus lunatus*).

| ISOLADOS                                               | ACESSO          |
|--------------------------------------------------------|-----------------|
| <i>African cassava mosaic virus</i> - <b>ACMV</b>      | AY211885        |
| <i>Blainvillea yellow spot virus</i> - <b>BIYSV</b>    | EU710756        |
| <i>Sida common mosaic virus</i> - <b>SiCmMV</b>        | EU710751        |
| <i>Sida micrantha virus</i> - <b>SimMV</b>             | A2_NC_005330    |
| <i>Sida mottle virus</i> - <b>SiMoV</b>                | NC_004637       |
| <i>Sida yellow leaf curl virus</i> - <b>SiYLCV</b>     | EU710750        |
| <i>Sida yellow mosaic virus</i> - <b>SiYMV</b>         | NC_004639       |
| <i>Tomato chlorotic mottle virus</i> - <b>ToCMoV</b>   | BASe1_NC_003664 |
| <i>Tomato common mosaic virus</i> - <b>ToCmMV</b>      | EU710754        |
| <i>Tomato golden mosaic virus</i> - <b>TGMV</b>        | NC_001507       |
| <i>Tomato leaf distortion virus</i> - <b>ToLDV</b>     | EU710749        |
| <i>Tomato mild mosaic virus</i> - <b>ToMIMV</b>        | EU710752        |
| <i>Tomato rugose mosaic virus</i> - <b>ToRMV</b>       | NC_002555       |
| <i>Tomato severe rugose virus</i> - <b>ToSRV</b>       | GO_NC_009607    |
| <i>Tomato yellow spot virus</i> - <b>ToYSV</b>         | NC_007726       |
| <i>Tomato yellow vein streak virus</i> - <b>ToYVSV</b> | Ba3_EF417915    |

Tabela S2. Porcentagem de identidade entre as sequências de nucleotídeos completa do DNA-A dos isolados de fava (*Phaseolus lunatus*) e outros begomovírus proximamente relacionados.

|                | BR:A<br>RP1:0<br>5 | BR:A<br>RP2:0<br>05 | BR:E<br>TA1:0<br>05 | BR:E<br>TA2:0<br>05 | BR:V<br>IC:05 | BR:R<br>EC1:0<br>05 | BR:R<br>EC2:0<br>05 | BR:C<br>NO1:0<br>05 | BR:C<br>NO2:0<br>05 | BR:B<br>EL:05 | BR:MRB<br>:05 | BR:MAC<br>:05 | BR:MAV<br>:05 | BR:PJA:05 | BR:A<br>TA1:0<br>05 | BR:A<br>TA2:0<br>05 | BR:A<br>TA3:0<br>5 | BR:UNP:0<br>5 | BR:STM1:0<br>05 | BR:STM2:0<br>05 | BR:CHP:05 | BR:RLA:05 | BGMV-F<br>BGMV | BGMV | ToY<br>VSV | TGM<br>V |
|----------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-----------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------|-----------------|-----------------|-----------|-----------|----------------|------|------------|----------|
| BR:ARP1:0<br>5 | 100                | 99                  | 98                  | 99                  | 98            | 90                  | 90                  | 99                  | 99                  | 98            | 98            | 99            | 98            | 99        | 97                  | 94                  | 97                 | 99            | 99              | 99              | 99        | 99        | 90             | 90   | 73         | 71       |
| BR:ARP2:0<br>5 |                    | 100                 | 98                  | 98                  | 98            | 90                  | 90                  | 98                  | 99                  | 98            | 98            | 99            | 98            | 99        | 97                  | 94                  | 97                 | 99            | 99              | 99              | 99        | 99        | 90             | 90   | 73         | 71       |
| BR:ETA1:0<br>5 |                    |                     | 100                 | 99                  | 98            | 90                  | 90                  | 98                  | 99                  | 98            | 98            | 99            | 98            | 99        | 97                  | 94                  | 97                 | 99            | 99              | 99              | 99        | 99        | 90             | 91   | 74         | 71       |
| BR:ETA2:0<br>5 |                    |                     |                     | 100                 | 99            | 90                  | 90                  | 99                  | 99                  | 98            | 98            | 99            | 98            | 99        | 97                  | 94                  | 97                 | 99            | 99              | 99              | 99        | 99        | 91             | 91   | 74         | 71       |
| BR:VIC:05      |                    |                     |                     |                     | 100           | 90                  | 90                  | 98                  | 99                  | 98            | 98            | 99            | 98            | 99        | 97                  | 94                  | 97                 | 99            | 98              | 99              | 99        | 99        | 90             | 90   | 74         | 71       |
| BR:REC1:0<br>5 |                    |                     |                     |                     |               | 100                 | 99                  | 90                  | 90                  | 90            | 90            | 90            | 90            | 90        | 90                  | 93                  | 90                 | 90            | 90              | 90              | 90        | 90        | 94             | 94   | 74         | 71       |
| BR:REC2:0<br>5 |                    |                     |                     |                     |               |                     | 100                 | 90                  | 91                  | 90            | 90            | 90            | 90            | 91        | 90                  | 93                  | 90                 | 90            | 90              | 90              | 90        | 90        | 94             | 94   | 74         | 72       |
| BR:CNO1:0<br>5 |                    |                     |                     |                     |               |                     |                     | 100                 | 99                  | 99            | 98            | 99            | 98            | 99        | 97                  | 94                  | 97                 | 99            | 98              | 99              | 99        | 99        | 90             | 90   | 74         | 71       |
| BR:CNO2:0<br>5 |                    |                     |                     |                     |               |                     |                     |                     | 100                 | 99            | 99            | 99            | 99            | 100       | 97                  | 94                  | 97                 | 99            | 99              | 99              | 99        | 99        | 91             | 91   | 74         | 71       |
| BR:BEL:05      |                    |                     |                     |                     |               |                     |                     |                     |                     | 100           | 99            | 99            | 99            | 99        | 97                  | 94                  | 97                 | 99            | 98              | 99              | 99        | 99        | 90             | 91   | 73         | 71       |
| BR:MRB:0<br>5  |                    |                     |                     |                     |               |                     |                     |                     |                     |               | 100           | 99            | 99            | 99        | 97                  | 94                  | 97                 | 98            | 98              | 99              | 99        | 99        | 90             | 90   | 73         | 71       |
| BR:MAC:0<br>5  |                    |                     |                     |                     |               |                     |                     |                     |                     |               |               | 100           | 99            | 99        | 97                  | 94                  | 97                 | 99            | 99              | 99              | 99        | 99        | 91             | 91   | 74         | 71       |
| BR:MAV:0<br>5  |                    |                     |                     |                     |               |                     |                     |                     |                     |               |               |               | 100           | 99        | 97                  | 94                  | 97                 | 99            | 98              | 99              | 99        | 99        | 90             | 91   | 73         | 71       |
| BR:PJA:05      |                    |                     |                     |                     |               |                     |                     |                     |                     |               |               |               |               | 100       | 97                  | 94                  | 97                 | 99            | 99              | 99              | 99        | 99        | 91             | 91   | 74         | 71       |
| BR:ATA1:0<br>5 |                    |                     |                     |                     |               |                     |                     |                     |                     |               |               |               |               |           | 100                 | 94                  | 100                | 97            | 97              | 97              | 97        | 97        | 90             | 90   | 74         | 72       |
| BR:ATA2:0<br>5 |                    |                     |                     |                     |               |                     |                     |                     |                     |               |               |               |               |           |                     | 100                 | 94                 | 94            | 94              | 94              | 94        | 94        | 94             | 94   | 74         | 71       |
| BR:ATA3:0<br>5 |                    |                     |                     |                     |               |                     |                     |                     |                     |               |               |               |               |           |                     |                     | 100                | 97            | 97              | 97              | 97        | 97        | 90             | 90   | 74         | 72       |
| BR:UNP:05      |                    |                     |                     |                     |               |                     |                     |                     |                     |               |               |               |               |           |                     |                     |                    | 100           | 99              | 99              | 99        | 99        | 91             | 91   | 71         | 71       |
| BR:STM1:0<br>5 |                    |                     |                     |                     |               |                     |                     |                     |                     |               |               |               |               |           |                     |                     |                    |               | 100             | 99              | 99        | 99        | 91             | 91   | 72         | 71       |
| BR:STM2:0<br>5 |                    |                     |                     |                     |               |                     |                     |                     |                     |               |               |               |               |           |                     |                     |                    |               |                 | 100             | 99        | 99        | 91             | 91   | 72         | 71       |
| BR:CHP:05      |                    |                     |                     |                     |               |                     |                     |                     |                     |               |               |               |               |           |                     |                     |                    |               |                 |                 | 100       | 99        | 91             | 91   | 74         | 71       |
| BR:RLA:05      |                    |                     |                     |                     |               |                     |                     |                     |                     |               |               |               |               |           |                     |                     |                    |               |                 |                 |           | 100       | 91             | 91   | 74         | 71       |