



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PROTEÇÃO DE PLANTAS**



RAÍZA DA ROCHA OLIVEIRA TEIXEIRA

**INFECÇÃO MISTA DE BADNAVÍRUS E BEGOMOVÍRUS EM
Centrosema brasilianum (L.) Benth**

Rio Largo - AL
2017

RAÍZA DA ROCHA OLIVEIRA TEIXEIRA

**INFECÇÃO MISTA DE BADNAVÍRUS E BEGOMOVÍRUS EM
Centrosema brasilianum (L.) Benth**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Proteção de Plantas.

Orientadora: Prof. Dra. Sarah Jacqueline Cavalcanti Silva

Coorientadora: Dra. Iraildes Pereira Assunção

Rio Largo - AL
2017

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Centro de Ciências Agrárias – CECA
Erison Rodrigues de Santana - Bibliotecário

T266i Teixeira, Raíza da Rocha Oliveira.

**Infecção mista de badnavírus e begomovírus em *Centrosema
brasilianum* (L.) Benth** / Raíza da Rocha Oliveira Teixeira. – Rio
Largo, 2017.
60 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Proteção de plantas) –
Universidade Federal de Alagoas. Programa de Pós - graduação em
Proteção de Plantas. Centro de Ciências Agrárias, 2017.

Orientador(a): Dra. Sarah Jacqueline Cavalcanti Silva.

Coorientadora: Dra. Iraildes Pereira Assunção

1. Caracterização molecular.
2. Badnavirus
3. Begomovirus.

CDU: 632

RAÍZA DA ROCHA OLIVEIRA TEIXEIRA

INFECÇÃO MISTA DE BADNAVÍRUS E BEGOMOVÍRUS EM
***Centrosema brasilianum* (L.) Benth**

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas. E aprovada em 25 de agosto de 2017.

Prof^ª. Dr^ª. Sarah Jacqueline Cavalcanti Silva - Universidade Federal de Alagoas
(Orientadora)

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima – Universidade Federal de Alagoas
(Examinador)

Prof^ª. Dr^ª. Kátia Cilene da Silva Félix – Faculdade Sete de Setembro (FASETE)
(Examinador)

Rio Largo - AL
2017

AGRADECIMENTOS

À Deus em primeiro lugar, que dizem que escreve certo por linhas tortas – mas diria que nós que enxergamos torto – agradeço por não me permitir desistir, por me mostrar pessoas maravilhosas e por me fazer ser constantemente grata pelas oportunidades.

À minha família pelas bases construídas, pelos ensinamentos e por sempre acreditar no meu potencial. Aos amigos pelo apoio 24 horas por dia e pelas alegrias compartilhadas.

Aos Professores Drs Gaus Silvestre de Andrade Lima e Iraildes Pereira Assunção pelo acolhimento e oportunidade no laboratório.

À Professora Dra Sarah Jacqueline Cavalcanti Silva pela orientação e ajuda com tudo. Serei sempre grata.

À Mayra Ferro e Caio Henrique Hollanda, que além dos momentos de descontração (constantes), me presentearam com muita ajuda no laboratório, sem vocês não teria sido possível chegar até aqui tão rápido.

A todos do Laboratório de Fitopatologia Molecular e Virologia Vegetal pela convivência, pela ajuda, pelos momentos de alegria e gordices. Cada um, com seu jeitinho, contribuiu para uma caminhada mais leve em meio a tanta correria.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Proteção de Plantas CECA-UFAL por dividirem seu conhecimento e experiência.

A todos os meus colegas do Programa de Pós-graduação em Proteção de Plantas do CECA-UFAL pelos momentos juntos em sala de aula (e em restaurantes).

A CAPES pela bolsa de mestrado concedida

A todos aqueles que deixaram sua marca – mesmo sem saber – e contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Eternamente grata!

RESUMO

Doenças causadas por vírus que pertencem aos gêneros *Badnavirus* e *Begomovirus* têm emergido como sérios problemas para muitas culturas economicamente importantes nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, incluindo o Brasil. Os begomovírus (Família *Geminiviridae*) incluem vírus com genoma de DNA circular fita simples encapsidados em partículas quase-icosaédricas geminadas e transmitidos pelo complexo de espécie crípticas da mosca-branca *Bemisia tabaci*. Badnavírus (Família *Caulimoviridae*) consiste em um grupo de vírus com genoma de DNA circular fita dupla, encapsidados em partículas baciliformes não envelopados, e transmitidos principalmente por cochonilhas. Fitovírus possuem uma ampla gama de hospedeiras daninhas/silvestres, as quais podem funcionar como reservatórios de vírus, bem como fontes de inóculo e fonte de novas espécies virais para epidemias em cultura. *Centrosema brasilianum* é uma planta daninha da família Fabaceae, que é frequentemente encontrada exibindo sintomas de mosaico e crescendo nas proximidades de muitas plantas cultivadas na região Nordeste do país. Em março de 2017, foi encontrada uma planta de *C. brasilianum* mostrando sintomas de mosaico e enrolamento foliar, no município de Maceió, estado de Alagoas. Objetivo desse trabalho foi detectar e caracterizar molecularmente vírus com genoma de DNA infectando *C. brasilianum*. O DNA total foi extraído a partir da amostra e usado como molde para reações de amplificação por PCR utilizando os primers universais BADNA-FP e BADNA-RP e PAL1v1978 e PAR1c496, visando respectivamente a detecção de badnavírus e begomovírus. Amostras que testaram positivas para PCR foram diretamente sequenciadas pelo método de primer walking. Sequências parciais foram obtidas para região RT/RNaseH dos badnavírus e DNA-A dos begomovírus. Comparações de sequências pareadas e análises filogenéticas indicaram a presença de infecção mista em *C. brasilianum* por badnavírus e begomovírus. O isolado BR:Mac:17, pertence a uma provável nova espécie de badnavírus para a qual foi designado o nome tentativo Centrosema bacilliform virus (CenBV). Esta espécie foi filogeneticamente mais relacionada com *Grapevine roditis leaf discoloration-associated virus* (GRLDaV), proveniente da videira (*Vitis vinifera* L). Enquanto, o isolado BR:Mac2:17 é um Begomovirus, provavelmente da espécie *Bean golden mosaic virus* (BGMV). Análises filogenéticas, de recombinação e de evolução em rede mostraram fortes evidências de que BR:Mac2:17 é de fato é um isolado de BGMV. Os resultados demonstram que *C. brasilianum* pode atuar como reservatório de badnavírus e begomovírus na ausência da cultura no campo.

Palavras-chaves: *Badnavirus*, *Begomovirus*, caracterização molecular

ABSTRACT

Diseases caused by viruses belonging to the genera *Badnavirus* and *Begomovirus* have emerged as serious problems for many economically important crops in the tropical and subtropical regions of the world, including Brazil. *Begomovirus* (Family *Geminiviridae*) include viruses with circular single-stranded DNA genomes encapsidated in quasi-cosahedral and transmitted by the species complex of the whitefly *Bemisia tabaci*. *Badnavirus* (Family *Caulimoviridae*) consists of a group of viruses with double-stranded circular DNA genomes, encapsidated in non-enveloped bacilliform particles, and transmitted mainly by mealybugs. Plant viruses have a wide range of host / wild hosts, which can function as virus reservoirs, as well as sources of inoculum and source of new viral species for crop epidemics. *Centrosema brasilianum* is a weed of the *Fabaceae* family, which is often found exhibiting mosaic symptoms and growing in close proximity to many plants grown in the northeastern region of Brazil. In May 2017, a plant of *C. brasilianum* showing symptoms of mosaic and leaf foliage was found in Maceió, Alagoas state. The aim of this work was to detect and molecularly characterize viruses with DNA genomes infecting *C. brasilianum*. The total DNA was extracted from the sample and used as template for PCR amplification reactions using the universal primers BADNA-FP and BADNA-RP and PAL1v1978 and PAR1c496, targeting the detection of badnavirus and begomovirus. Samples that tested positive for PCR were directly sequenced by the *primer walking* method. Partial sequences were obtained for RT / RNaseH region of the badnavirus and begomovirus DNA-A. Comparisons of paired sequences and phylogenetic analyzes indicated the presence of mixed infection in *C. brasilianum* by badnavirus and begomovirus. The isolate BR: Mac: 17 belongs to a probable new species of badnavirus for which the tentative name *Centrosema bacilliform virus* (CenBV) has been designated. This species was phylogenetically more related to *Grapevine roditis leaf discoloration-associated virus* (GRLLDaV), originating from the vine (*Vitis vinifera* L). Meanwhile, the isolated BR: Mac2: 17 is a *Begomovirus*, probably of the *Bean golden mosaic virus* (BGMV) species. Phylogenetic, recombination, and network evolution analyzes have shown strong evidence that BR: Mac2: 17 is indeed a BGMV isolate. The results demonstrate that *C. brasilianum* can act as reservoir of badnavirus and begomovirus in the absence of the crop in the field.

Key words: *Badnavirus*, *Begomovirus*, molecular characterization

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Planta de <i>C. brasilianum</i> .	23
Figura 2. Organização genômica dos begomovírus monossegmentados e bissegmentados. As ORFs (V1, V2, C3, C4, e etc) estão coloridas de acordo com as proteínas que estas codificam. CR, região comum. O “hairpin” que inclui a origem de replicação está indicado na LIR.	28
Figura 3. Representação da partícula viral de morfologia isométrica e baciliforme da família caulimoviridae.	30
Figura 4. (A) Representação esquemática da organização genômica de <i>Commelina yellow mottle virus</i> (CoYMV) espécie-tipo do gênero <i>Badnavirus</i> . O círculo completo representa o genoma de DNA de fita dupla. As setas largas indicam a posição das ORFs I, II e III. (B) Representação linear do mapa genômico de badnavírus mostrando a identificação dos domínios: domínios de movimento (M), motivo de ligação ao RNA (BR), região conservada de cisteína (CYS), aspartato protease (PR), transcriptase reversa (RT) e ribonuclease H (RH) (BRIDDON et al., 1999).	33
Figura 5. Produto da PCR visualizado em gel de agarose a 0,8%. Onde M: marcador molecular KASVI; 1: fragmento de aproximadamente 1,2kb referente a região comum e as extremidades amino terminal dos genes <i>Rep</i> e <i>Cp</i> do genoma dos begomovírus; 2: fragmento de aproximadamente 580 pb referente ao domínio RT/RNaseH do genoma dos badnavírus; 3: Controle negativo.	43
Figura 6. Matriz bidimensional representando porcentagem de identidade de comparações pareadas de sequências nucleotídicas do domínio RT/RNase H do isolado BR_Mac1_17 com amostras de badnavirus disponíveis no GenBank.	44
Figura 7. Matriz bidimensional representando porcentagem de identidade de comparações pareadas de sequências nucleotídicas do DNA-A do isolado BR_Mac2_17 com amostras de begomovírus disponíveis no GenBank.	45
Figura 8. Planta de <i>C. brasilianum</i> exibindo sintomas de mosaico e enrolamento foliar (seta vermelha) causados pela de infecção mista com os vírus CenBV e BGMV.	47
Figura 9. Análise filogenética de inferência Bayesiana baseada na sequência da região RT/RNaseH da ORF III do genoma dos badnavírus mais similares obtidos no GenBank. BR_Mac1_17 foi isolado neste estudo.	48
Figura 10. Análise filogenética de Máxima Verossimilhança baseada na sequência parcial do DNA-A do genoma dos begomovírus mais similares obtidos no GenBank BGMV, MaYVV, MaCmMV, CPGMV e CenYSV. BR_Mac2_17 foi isolado neste estudo.	49
Figura 11. Análise reticulada do isolado BR_Mac1_17 para eventos de recombinação.	50
Figura 12. Análise reticulada do isolado BR_Mac2_17 para eventos de recombinação. Onde observa-se eventos de recombinação intraespecífica com BGMV,	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências de badnavirus e begomovirus obtidas a partir do banco de dados não-redundantes GenBank.	39
Tabela 2. Eventos de recombinação detectados entre diferentes isolados de espécies de begomovirus.....	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 <i>Centrosema brasilianum</i> (L.) Benth	23
2.2 Ocorrência de vírus em <i>Centrosema</i> spp.	23
2.3 Família <i>Geminiviridae</i>	24
2.4 Gênero <i>Begomovirus</i>	25
2.5 Organização genômica e replicação dos <i>Begomovirus</i>	27
2.6. Família <i>Caulimoviridae</i>	29
2.7 Gênero <i>Badnavirus</i>	32
2.8 Diversidade de <i>Begomovirus</i> e <i>Badnavirus</i> em plantas daninhas/silvestres da família Fabaceae no Brasil	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Coleta do material vegetal	37
3.2 Detecção e caracterização dos genomas parciais de begomovírus e badnavírus.....	37
3.3 Análise de sequências e demarcação de espécies	38
3.4 Análise filogenética	41
3.5 Análises de recombinação.....	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 Análises de sequências e demarcação de espécie	43
4.2 Análises Filogenéticas	47
5 CONCLUSÕES	53
6 REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

Espécies incluídas nos gêneros *Badnavirus* e *Begomovirus* constituem um dos mais importantes grupos de fitovírus de DNA que tem emergido como sérios patógenos para um grande número de plantas cultivadas, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (BHAT et al., 2016; INOUE-NAGATA et al., 2016).

Os badnavírus (Família *Caulimoviridae*) são vírus de DNA fita dupla circular, com partículas bacilliformes e genoma monossegmentado com cerca de 7,2 a 9,2 kb. Estes são transmitidos naturalmente por cochonilhas (*Planococcus* spp) e algumas espécies por pulgões (*Aphis* spp.). Os badnavírus causam doença em muitas hospedeiras monocotiledôneas e dicotiledôneas como arroz (*Oryza sativa* L.) (OMURA et al., 1983), a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) (LOCKHART; AUTREY, 1988), banana (*Musa* spp.) (LOCKHART; OLSZEWSKI, 1993), cacau (*Theobroma cacao* L.) (BRUNT et al., 1997), citros (*Citrus* spp.) (AHLAWAT et al., 1996), pimento (*Capsicum* spp.) (LOCKHART et al., 1997), inhame (*Dioscorea* spp.) (PHILLIPS et al., 1999) e o taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott.) (YANG et al., 2003). Alguns badnavírus também ocorrem como vírus endógenos, que se integram aos genomas hospedeiros e que podem ser ativados, por exemplo, através do estresse abiótico, dando origem a formas epissomais infecciosas (BHAT et al., 2016). No Brasil, infecções causadas por badnavírus já foram descritas nas culturas do abacaxi, banana, inhame e cana-de-açúcar (FIGUEIREDO et al., 2006; BRIOSO et al., 2012, LIMA et al., 2013; SANTOS, 2013; SILVA et al., 2015).

Os begomovírus (Família *Geminiviridae*) englobam vírus com genoma monossegmentado ou bissegmentado de DNA fita simples circular, encapsidados em partículas quase-icosaédricas geminadas. Estes vírus são transmitidos predominantemente pela mosca-branca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) para uma ampla gama de hospedeiras dicotiledôneas (ZERBINI et al., 2017). No Brasil, begomovírus são fatores limitantes para os cultivos de feijão e tomate, levando a perdas substanciais na produtividade dessas culturas (INOUE-NAGATA et al., 2017).

Além de infectarem plantas cultivadas, os begomovírus também infectam outras hospedeiras daninhas/silvestres, principalmente aquelas pertencentes às famílias *Malvaceae*, *Euphorbiaceae* e *Fabaceae* (MORALES; ANDERSON, 2001). Poucos são os relatos de

ocorrência de badnavírus em plantas daninhas, predominando a infecção de *Commelina* spp., família *Commelinaceae* (GEERING; HULL, 2012). Plantas daninhas abrigam muitas espécies de vírus que podem ocorrer em infecção mista. Hospedeiras daninhas em infecção mista promovem a interação entre diferentes espécies e/ou isolados vírais levando a uma série de efeitos como: aumento/decréscimo das taxas de replicação, transmissão e expressão de sintomas na hospedeira (SYLLER, 2012). Adicionalmente, infecções mistas com mais de uma espécie viral constituem o pré-requisito para ocorrência de recombinação, um importante mecanismo na evolução de badnavírus e begomovírus (PADIDAM et al., 1999; AHMAD et al., 2011; SILVA et al., 2012; LIMA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014; SHARMA et al., 2015).

Plantas daninhas desempenham um importante papel na epidemiologia de begomovírus, atuando como hospedeiras alternativas e como fontes de novos vírus/isolados que surgem por recombinação ou pseudo-recombinação que podem ser transmitidos para plantas cultivadas via inseto vetor (COTRIM et al., 2007; CASTILLO-URQUIZA et al., 2008; SILVA et al., 2012). No entanto, são escassas as informações sobre a importância de plantas daninhas na epidemiologia de espécies do gênero *Badnavirus*.

Diante do exposto, objetivou-se por meio desse trabalho realizar a caracterização molecular de vírus de DNA infectando *Centrosema brasilianum*, uma planta daninha associada a diversas culturas economicamente importantes no estado de Alagoas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Centrosema brasilianum* (L.) Benth

Conhecida popularmente como feijão-bravo ou fava-branca, a *Centrosema brasilianum* é uma leguminosa forrageira perene nativa da América do Sul, pertence à família Fabaceae (Leguminosae), que apresenta ampla distribuição geográfica e é umas das maiores famílias botânicas - com aproximadamente 19.000 espécies e mais de 730 gêneros - (SOUZA; LORENZI, 2008; QUEIROZ, 2009). Segundo Penteadó et al (1996), a maioria das espécies de *Centrosema* está distribuída por savanas e florestas de regiões tropicais e subtropicais das Américas do Sul e Central. No Brasil ocorre a maior riqueza de *Centrosema*, sendo encontradas 31 espécies, das quais dez apresentam ocorrência exclusiva neste país.

Figura 1. Planta de *C. brasilianum*.



Fonte: The Field Museum – Neotropical Herbarium Specimens

2.2 Ocorrência de vírus em *Centrosema* spp.

Relatos de ocorrência de viroses em plantas do gênero *Centrosema* mundialmente são escassos e incluem espécies que pertencem aos grupos *Comovirus*, *Potyvirus*, *Cucumovirus*, *Potexvirus*, *Carlavirus* e *Geminivirus* (SCHULTZE-KRAFT et al., 1990).

O primeiro vírus descrito em *Centrosema* sp. foi de *Centrosema mosaic virus* (CaMV ou CenMV), um *Potexvirus* encontrado na Nova Guiné (CROWLEY; FRANCKI, 1963; PURCIFULL; EDWARDSON, 1982; VAN VELSEN; CROWLEY, 1961 e 1962) que pode ser transmitido por afídeos e besouros. Uma outra espécie de *Centrosema mosaic virus* (CeMV, gênero *Potyvirus*) foi isolada e caracterizada na Colômbia em 1984 (CIAT, 1985 e 1986). Esta inclui como hospedeiros *C. brasilianum*, *C. macrocarpum*, *C. pascuorum*, *C. pubescens*, *C. schottii* e *Glycine max*, e pode ser transmitido por afídeos e sementes (Schultze-Kraft et al, 1990). Outro *Potyvirus*, *Passionfruit woodiness virus* (PWV), foi descrito da Austrália infectando *C. pubescens* (GREBER, 1971; SCHULTZE-KRAFT et al., 1990).

No Brasil, até o momento apenas uma espécie de vírus foi descrita, *Centrosema yellow spot virus* (CenYSV), e um begomovírus (família *Geminiviridae*) foi isolado e caracterizado molecularmente a partir de amostras foliares de *C. brasilianum* exibindo sintomas de manchas foliares amarelas, no município de Caruaru, estado de Pernambuco (SILVA et al., 2012).

2.3 Família *Geminiviridae*

Geminiviridae é uma das mais importantes e numerosas famílias de vírus que infectam plantas, englobando pequenos vírus não envelopados, com genoma de DNA fita simples (ssDNA) circular contendo 2500-5200 bases, envoltos por um capsídeo icosaédrico geminado (BROWN et al., 2012; ZERBINI et al., 2017).

A família possui até o momento 369 espécies reconhecidas pelo International *Comitee on Taxonomy of Viruses* – ICTV (<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>) e distribuídas em oito gêneros: *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus*, definidos com base na gama de hospedeiros, tipo de inseto vetor, organização genômica e relacionamento filogenético (VARSANI et al., 2014, BROWN et al., 2015; GILBERTSON et al., 2015).

Becurtovirus, *Curtovirus*, *Mastrevirus*, e *Turncurtovirus* têm genoma monossegmentados e são transmitidos por diferentes espécies de cigarrinhas para espécies dicotiledôneas e monocotiledôneas. *Capulavirus*, *Glabrovirus* e *Topocuvirus* também são monossegmentados, mas são transmitidos respectivamente pelo pulgão *Aphis cracivora*, e os membrancídeos *Spissistilus festinus* e *Micruotalis malleifera* (BROWN et al., 2012; ZERBINI et al., 2017; VARSANI et al., 2017). A espécie *Eragrostis curvula streak virus*, única espécie do gênero *Eragrovirus*, tem genoma monossegmentado e seu vetor ainda não foi determinado (ZERBINI et al., 2017).

O gênero *Begomovirus* (espécie tipo, *Bean golden yellow mosaic virus*) é o mais numeroso, contando atualmente com 322 espécies reconhecidas pelo ICTV. Estes são transmitidos pelo grupo de espécies crípticas de mosca-branca do complexo *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). (ICTV, 2017).

2.4 Gênero *Begomovirus*

As espécies do gênero *Begomovirus* infectam uma ampla gama de plantas dicotiledôneas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (BROWN et al., 2015). Os begomovírus tornaram-se um grupo de vírus emergentes devido à alta incidência e severidade das doenças causadas em culturas economicamente importantes como tomate (*Solanum lycopersicum*) (COSTA, 1976), feijão (*Phaseolus vulgaris*) (COSTA, 1965), pimenta (*Capsicum* spp.) (LIMA et al., 2001), mandioca (*Manihot esculenta*) (DUBERN, 1979) e batata (*Solanum tuberosum*) (DANIELS, 1985), além de infectar plantas silvestres/daninhas em diferentes famílias botânicas (MORALES; ANDERSON, 2001; NAVAS-CASTILLO et al., 2011; BROWN et al., 2015).

As perdas econômicas ocasionadas por begomovírus são difíceis de avaliar. Entretanto, estima-se que perdas causadas por begomovírus associados ao mosaico da mandioca (*Cassava Mosaic Disease*) chegaram a US\$ 2 bilhões por ano na África (PATIL; FAUQUET, 2009). No Brasil, é estimado que as begomoviroses causaram perdas de US\$ 5 bilhões no período de 1995 a 2000 (JESKE, 2009). O tomateiro e o feijoeiro são as principais culturas afetadas por begomovírus no país, com perdas que podem chegar a 100% (MORALES; ANDERSON, 2001). Para os feijões (*Phaseolus* spp.), perdas médias anuais de 20% têm sido estimadas (FARIA et al., 2014).

Os begomovírus são encontrados basicamente no floema das plantas infectadas, entretanto, algumas espécies são capazes de infectar tecidos mais externos como as células do mesófilo (NELSON; VAN BEL, 1998). Diferentes isolados de uma mesma espécie podem causar sintomas que variam significativamente, dependendo do background genético do hospedeiro, das condições ambientais e do estágio de crescimento e condições fisiológicas do hospedeiro no momento da infecção (PICÓ et al., 1996). No geral begomovírus causam sintomas similares em plantas incluindo: nanismo, distorção foliar, algumas combinações de mosaico dourado, amarelo claro e verde, enrolamento foliar, enrugamento, amarelecimento veinal e interveinal e manchas amarelas nas folhas (INOUE-NAGATA et al., 2016).

Baseado na organização genômica, diversidade genética e distribuição geográfica, os begomovírus são divididos em dois grupos: os do Velho Mundo/Old World (VM/OW), que compreende África, Europa, Ásia e Austrália; e Novo Mundo/New World (NM/NW), compreendendo as Américas (GILBERTSON et al., 2015; INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016). Os begomovírus do VM apresentam predominantemente um componente genômico e frequentemente estão associados a moléculas de ssDNA (~1.350 nt) satélites denominados alfassatélites (anteriormente DNA-1), betassatélites (anteriormente DNA 2) e deltassatélites (FAUQUET; STANLEY, 2005; ZHOU et al., 2013).

Os betassatélites requerem um begomovírus auxiliar para sua replicação, encapsidação, movimento célula a célula e sistêmico na planta hospedeira, e transmissão por *B. tabaci* (BRIDDON et al., 2006; ZHOU, 2013). Possuem uma origem de replicação (ori) que inclui o nonanucleotídeo TAATATTAC, observado na maioria dos begomovirus (BRIDDON et al., 2006). Além de codificar uma única proteína multifuncional, β C1, que atua na indução de sintomas e aumento da patogenicidade do vírus auxiliar pela elevação dos níveis de DNA viral e supressão do sistema de defesa antiviral da hospedeira via silenciamento pós-transcricional (CUI et al., 2005; SAEED et al., 2005; BRIDDON et al., 2006; EINI et al., 2012; GOPAL et al., 2007). Apesar do requerimento do vírus auxiliar para replicação, os betassatélites são promíscuos, podendo ser transreplicados por uma diversidade de vírus auxiliares não cognatos, incluindo begomovírus mono e bissegmentados (MANSSOR et al., 2006; SAEED et al., 2007, ZHOU, 2013).

Diferente dos beta-satélites, os alfa-satélites possuem na sua origem de replicação o nonanucleotídeo (TAGTATTAC) semelhante ao dos nanovírus (família *Nanoviridae*) (BRIDDON et al., 2004; BRIDDON et al., 2006). Alfa-satélites codificam uma proteína associada a replicação (Rep) que permite autonomia na replicação e parecem não ser essenciais para o desenvolvimento e manutenção da doença (BRIDDON et al., 2006). Embora em alguns casos foi demonstrado que estes podem atenuar os sintomas da doença; ou mesmo codificar uma Rep com uma forte atividade de supressão de silenciamento gênico, sendo mais eficiente em suplantar os mecanismos de defesa da hospedeira quando comparado aos beta-satélites (PAPROTKA, 2010; PATIL et al., 2010; IDRIS et al., 2011). Alfa-satélites foram encontrados em associação com begomovírus bipartidos no Novo Mundo (Brasil, Cuba e Venezuela) (PAPROTKA et al., 2010, ROMAY et al., 2010).

Os begomovírus do NW são, na sua maioria, bissegmentados (dois componentes genômicos – DNA-A e DNA-B) com aproximadamente 2,6 Kb cada (Figura 2). (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999). No entanto, em 2013 foi descrito o primeiro relato de begomovírus

monossegmentado nativo do NW, o *Tomato leaf deformation virus* (ToLDeV) causando sintomas associados ao *Tomato leaf curl disease* (ToLCD) no Peru e Equador (MELGAREJO et al., 2013; SÁNCHEZ-CAMPOS et al., 2013). Adicionalmente, foi demonstrada a ocorrência dos DNAs alfa-satélites *Cleome leaf crumple virus* (CILCrV), *Euphorbia mosaic virus* (EuMV) e *Melon chlorotic mosaic virus* (MeCMV) em associação com begomovírus bissegmentados do NW (PAPROTKA; METZLER; JESKE, 2010b; ROMAY et al., 2010).

2.5 Organização genômica e replicação dos *Begomovirus*

Os DNA-A e DNA-B cognatos dos begomovírus bissegmentados, possuem uma região conservada (Região Comum, RC) com aproximadamente 200pb, a qual compartilha acima de 90% de identidade de sequência (LAZAROWITZ et al., 1992; FONTES et al., 1994b). A RC abriga uma sequência de nove nucleotídeos (5'-TAATATT↓AC-3'), chamada de nonanucleotídeo, que está presente em todos os geminivírus e onde se situa a origem de replicação viral (OROZCO; HANLEY-BOWDOIN, 1996).

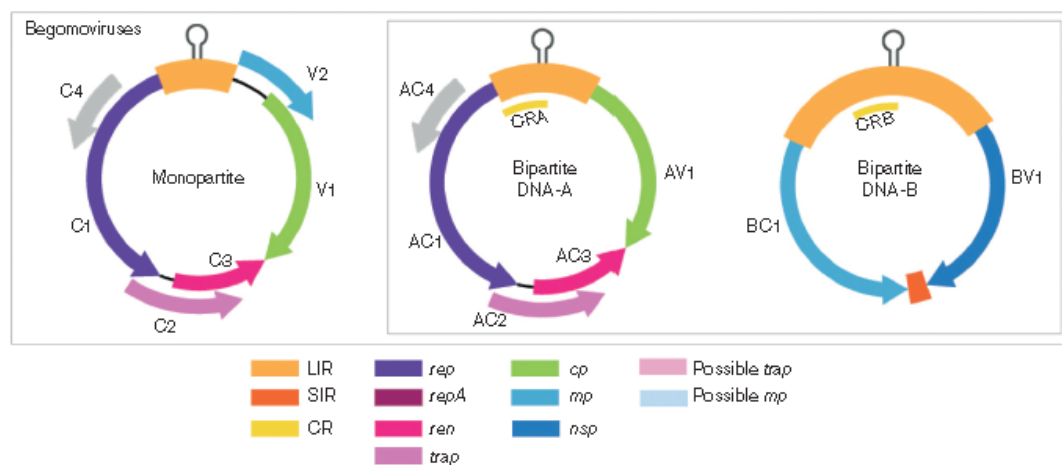
O genoma dos begomovírus possui *Open Reading Frames* (ORFs) que codificam proteínas multifuncionais, que no caso dos geminivírus, reflete uma compensação ao pequeno tamanho do genoma (2.600 nucleotídeos) (FONDONG, 2013). A transcrição é bidirecional tanto no DNA-A, que codifica genes envolvidos na replicação e encapsidação viral, quanto no DNA-B, que codifica genes envolvidos na movimentação do vírus da planta (TIMMERMANS; DAS; MESSING, 1994; BROWN, 1997; FARIA et al., 2000).

No DNA-A, no sentido viral encontra-se o gene que codifica para a proteína capsidial (CP, *coat protein*) que tem a função de proteger o genoma viral contra degradação e é fundamental para a transmissão e determina a especificidade do vírus pelo inseto vetor (BRIDDON et al., 1990; HÖFER et al., 1997a). No sentido complementar encontram-se os genes que codificam para as seguintes proteínas: (1) *Replication-associated protein* (REP), proteína associada a replicação do ssDNA viral no núcleo da célula hospedeira iniciando a replicação por círculo rolante (GUTIERREZ, 1999). A função desta proteína é ligar ao sítio de início da replicação viral e clivar umas das fitas de DNA (FONTES; LUCKOW; HANLEY-BOWDOIN, 1992); (2) *Trans-activating protein* (TrAP), proteína transativadora da transcrição, que atua nos promotores de genes de sentido viral dos DNA-A e DNA-B (CP e NSP). (SUNTER; BISARO, 1992) e que também atua como supressora de silenciamento gênico (VOINNET et al., 1999); (3) *Replication-enhancer protein* (REn), fator acessório (não

essencial) de amplificação da replicação viral por ser capaz de aumentar a afinidade da proteína Rep na origem de replicação; (4) C4, proteína que também está envolvida na supressão de silenciamento gênico. (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999)

O DNA-B possui dois genes, um no sentido viral que codifica a proteína *Nuclear shuttle protein* (NSP) responsável pelo transporte intracelular do DNA através do envelope nuclear; e no sentido complementar codifica a proteína *Movement protein* (MP) envolvida no movimento célula-a-célula do vírus por meio do aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas. Acredita-se que o transporte célula-a-célula é realizado por um complexo MP/DNA/NSP. (HEHNLE; WEGE; JESKE, 2004).

Figura 2. Organização genômica dos begomovírus monossegmentados e bissegmentados. As ORFs (V1, V2, C3, C4, e etc) estão coloridas de acordo com as proteínas que estas codificam. CR, região comum. O “hairpin” que inclui a origem de replicação está indicado na LIR.



Fonte: Adaptado de Zerbini et al. (2017).

O processo de infecção dos membros de *Geminiviridae* tem início com entrada das partículas virais na planta por meio da inoculação pelo inseto vetor. No interior da célula da hospedeira ele irá se desassociar de forma espontânea do capsídeo e será transportado até o núcleo, onde ocorrerá a replicação do vírus (LAZAROWITZ, 1992; PALMER; RYBICKI, 1998). Dentro do núcleo celular o ssDNA é convertido em um intermediário de fita dupla (dsDNA) chamado de Forma Replicativa (FR). Não se sabe ao certo, mas essa conversão ocorre provavelmente por meio de fatores do hospedeiro (STENGER et al., 1991; STANLEY, 1995; ZERBINI; CARVALHO; MACIEL-ZAMBOLIN, 2000). A FR vai se acumulando dentro da célula e serve como molde para a síntese de novos componentes genômicos e na transcrição dos genes virais. A replicação desses vírus ocorre via mecanismo de círculo

rolante, semelhante ao utilizado pelos bacteriófagos ϕ X174 e M13 (STENGER et al., 1991; STANLEY, 1995).

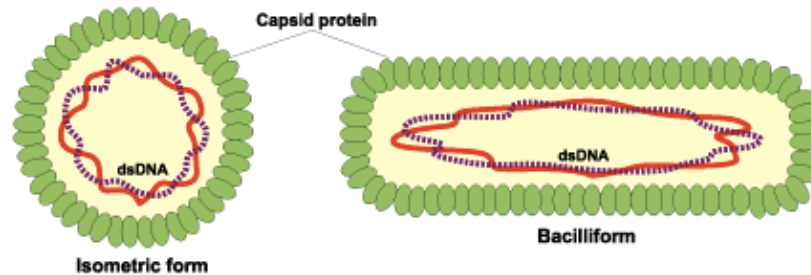
A localização da origem de replicação (*ori*) é na RC dos dois componentes genômicos. Neste local, existe uma sequência conservada em forma de grampo, *structurally conserved element* (SCE), chamada de nonanucleotídeo, encontrada em todos os geminivírus e que constitui o domínio funcional da origem de replicação (HEYRAUD-NITSCHKE et al., 1995; OROZCO; HANLEY-BOWDOIN, 1998). É nesse nonanucleotídeo que ocorre a clivagem (TAATATT↓AC) do dsDNA e que se inicia a replicação viral por círculo rolante (FONTES et al., 1994; LAUFS et al., 1995). A replicação ocorre de forma similar, independente do componente genômico, ou seja, ocorre da mesma forma tanto para o DNA-A, como para o DNA-B (LAUFS et al., 1995; FARIA; ZERBINI, 2000; STANLEY et al., 2005).

A clivagem do dsDNA na região comum é realizada pela *Rep*. Nessa região se encontra uma sequência específica para a ligação desta proteína (FONTES; LUCKOW; HANLEY-BOWDOIN, 1992; FONTES et al., 1994a) e regiões promotoras da RNA polimerase tipo II de plantas, responsável pela transcrição dos genes virais (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999). A partir do momento em que *Rep* é ligada ao DNA viral e ocorre a estabilização do complexo formado por *Rep*, *REn* e fatores do hospedeiro se inicia a replicação por círculo rolante (GUTIERREZ, 1999). O reconhecimento pela proteína *Rep* é considerado vírus-específico (HARRISON; ROBINSON, 1999; RAMOS et al., 2003). O último estágio é a produção e a encapsidação do ssDNA genômico circular maduro em partículas virais (GUTIERREZ, 1999).

2.6 Família *Caulimoviridae*

Os vírus incluídos na família *Caulimoviridae* são encapsidados em partículas não envelopadas de morfologia isométrica (45-50 nm de diâmetro) ou baciliforme (35-50 nm de diâmetro e 900nm). O genoma dos caulimovírus é constituído por uma molécula de DNA semicircular de fita dupla com cerca de 7,2-9,2 kb (FAUQUET et al., 2005; GEERING; HULL, 2012), uma região intergênica poli (A) presente em alguns membros da família, e descontinuidades de fita simples ou gaps em sítios específicos de ambas as fitas (HARPER et al., 2002).

Figura 3. Representação da partícula viral de morfologia isométrica e baciliforme da família caulimoviridae.



Fonte: Gypse Database 2.0

Angiospermas das classes Eudicotiledônea e Monocotiledônea são as hospedeiras naturais das espécies da família *Caulimoviridae*. A transmissão natural do vírus ocorre via vetor (hemipteras das famílias *Aleyrodidae*, *Aphididae*, *Cicadellidae* e *Pseudococcidae*), contato entre plantas hospedeiras, por semente e pólen, dependendo do gênero/espécie. Técnicas de inoculação mecânica e enxertia também podem acarretar a transmissão destes vírus (FAUQUET et al., 2005). Os sintomas característicos na planta atribuídos aos *Caulimoviridae* podem variar de acordo com o hospedeiro, a espécie viral envolvida, e condições climáticas, sendo os mais comumente observados: clareamento de nervuras, estrias, mosaico, manchas necróticas, linhas e manchas cloróticas, nanismo, má formação foliar e enrolamento de folíolos (GEERING; HULL, 2012).

De acordo com a organização genômica, gama de espécies hospedeiras, tipo de inseto vetor, diferenças na sequência de nucleotídeos do domínio reverse transcriptase/RNase H (RT/RNaseH), o ICTV divide a família *Caulimoviridae* oito gêneros: *Badnavirus*, *Caulimovirus*, *Cavemovirus*, *Petuvirus*, *Rosadnavirus*, *Solendovirus*, *Soymovirus* e *Tungrovirus* (GEERING; HULL, 2012).

Os caulimovírus são considerados pararetrovírus, vírus com dsDNA que replicam através de um intermediário de RNA (BHAT et al., 2016). O processo de replicação, em geral, envolve duas fases: (1) fase nuclear: a partícula viral chega à célula, sofre desencapsidação por ação de proteinases celulares e libera o dsDNA genômico que é transportado para o núcleo onde as descontinuidades do DNA são reparadas e “minicromossomos” são formados. O dsDNA é então transcrito pela RNA polymerase II do

hospedeiro (DE KOCHKO et al.,1998); (2) fase citoplasmática: O RNA transcrito é traduzido, resultando nos produtos proteicos relacionados aos genes virais existentes (FÜTTERER et al., 1997; POOGGIN et al., 1999). O RNA pré-genômico é retrotranscrito pela transcriptase reversa no citoplasma produzindo novos dsDNA genômicos (MEDBERRY et al., 1990). Os dsDNA genômicos são encapsidados, produzindo assim novos vírions. Os genomas desses vírus também contêm uma sequência complementar ao tRNAMet da planta que corresponde ao sítio de iniciação da replicação do DNA. Geralmente, este sítio está localizado dentro ou adjacente à região intergênica (região não-codificante) e é designado como nucleotídeo um (DE KOCHKO et al.,1998).

Diferente dos retrovírus, membro de *Caulimoviridae* não se integram no genoma da hospedeira para completar seu ciclo de replicação, por não ser capaz de codificar uma integrase. Apesar da ausência da integrase o DNA dos caulimovírus pode integrar passivamente no genoma da hospedeira, porém o mecanismo é pobremente compreendido. Tais sequências são conhecidas como sequencias endógenas de pararetrovirus (*Endogenous Pararetroviral Sequences* - EPRVs) e são a classe mais abundante de sequências virais endógenas em diferentes espécies de plantas (GAYRAL; ISKRA-CARUANA, 2009).

Quase todas as sequências endógenas de caulimovírus possuem um padrão de arranjo similar com repetições em tandem, duplicações internas, fragmentações e inversão do genoma viral. A maioria das EPRVs resulta em genomas virais parciais e não funcionais, porém várias integrações contêm toda extensão do genoma viral, com ORFs funcionais. (GAYRAL; ISKRA-CARUANA, 2009; TEYCHENEY; GEERING, 2011). Sequências virais podem ocorrer dispersas no genoma de plantas, originárias de uma infecção viral anterior que se fixou na linhagem germinativa. Tais sequências podem então ser ativadas resultando na liberação do genoma viral funcional que infectará o hospedeiro (GAYRAL; ISKRA-CARUANA, 2009).

Essas sequências são integradas no genoma hospedeiro e podem dar origem a vírus episomais (NDOWORA et al., 1999) sendo provenientes de eventos de infecções antigas (HARPER et al., 2005) ou sequências representativas intermediárias entre caulimovírus e retrotransposons LTR (BOUSALEM; LLORENS et al., 2009). Sequências endógenas de *Caulimoviridae* foram descritas em 27 espécies de nove diferentes famílias de plantas e derivam dos gêneros *Caulimovirus*, *Petuvirus*, *Badnavirus*, *Solendovirus* e dos gêneros tentativos *Orendovirus* e *Florendovirus* (TEYCHENEY; GEERING, 2011; MUSHEGIAN; ELENA, 2015; DIOP et al., 2017).

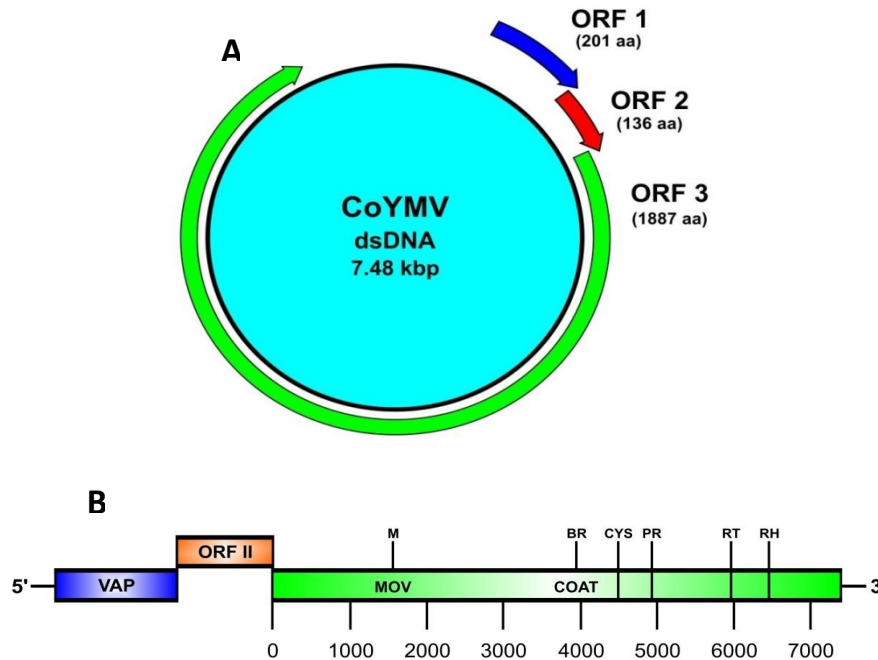
Existem evidências de que algumas sequências endógenas são capazes de iniciar a infecção, em determinadas condições. Os melhores exemplos são *Banana streak OL virus* (BSOLV) (NDOWORA et al., 1999), *Tobacco vein clearing virus* (TVCV) (LOCKHART et al., 2000), *Petunia vein clearing virus* (PVCV) (STAGINNUS; RICHERT-PÖGGELER, 2006) e *Banana streak GF virus* (BSGFV) (GAYRAL; ISKRA-CARUANA, 2009). A presença de sequências endógenas de badnavírus no genoma da hospedeira tem tornado um desafio a diagnose, taxonomia, movimento seguro de germoplasma e o controle das doenças causadas pelos badnavírus (BHAT et al., 2016).

2.7 Gênero *Badnavirus*

Com 40 espécies identificadas, o gênero *Badnavirus* é mais numeroso da família *Caulimoviridae* e o segundo em número de espécies entre os fitovírus com genoma de DNA (ICTV, 2017). A espécie tipo do gênero *Badnavirus* é *Commelina yellow mottle virus* (ComYMV), detectada pela primeira vez em *Commelina diffusa* L., na ilha de Guadalupe, no Caribe (MIGLIORI; LASTRA, 1978). Seus representantes possuem partículas baciliformes não envelopadas com 95-130nm de comprimento e 24-35nm de largura (FAUQUET et al., 2005; GEERING; HULL et al., 2012). O genoma de badnavírus geralmente contém uma única molécula de dsDNA de cerca de 7200-7600 pb que forma um círculo aberto interrompido por descontinuidades sítio-específicas e que podem conter uma região intergênica poli A (MEDBERRY; LOCKHART; OLSZEWSKI, 1990).

O genoma viral usualmente codifica três “Open Reading Frames” (ORFs) principais e contém geralmente três descontinuidades (gaps) em sítios específicos, contudo em alguns casos podem estar presentes quatro ORFs adicionais (BOUHIDA et al., 1993; HAGEN et al. 1993; GEERING; HULL, 2012). As ORFs I e II codificam respectivamente para a as proteínas P1 (20,8 kDa) de função desconhecida e P2 (23 kDa) cuja função está associada á encapsidação do vírion (CHENG et al., 1996; JACQUOT et al., 1996). A terceira ORF (ORF3) codifica uma poliproteína de 208 a 216 kDa que é proteoliticamente clivada e gera, dentre outros produtos, a proteína de movimento, a proteína do capsídeo viral, a aspartato protease (AP), responsável pela clivagem da poliproteína, a transcriptase reversa (*reverse transcriptase* RT) e a Ribonuclease H1 (MEDBERRY et al., 1990; TZAFRIR et al., 1997; HARPER; HULL, 1998; GEERING; HULL, 2012).

Figura 4. (A) Representação esquemática da organização genômica de *Commelina yellow mottle virus* (CoYMV) espécie-tipo do gênero *Badnavirus*. O círculo completo representa o genoma de DNA de fita dupla. As setas largas indicam a posição das ORFs I, II e III. (B) Representação linear do mapa genômico de badnavírus mostrando a identificação dos domínios: domínios de movimento (M), motivo de ligação ao RNA (BR), região conservada de cisteína (CYS), aspartato protease (PR), transcriptase reversa (RT) e ribonuclease H (RH) (BRIDDON et al., 1999).



Badnavirus constituem um importante grupo de fitovírus que tem emergido como sérios patógenos para muitas culturas tropicais, especialmente banana, pimenta, cana-de-açúcar, taro e inhame. Relatos de perdas econômicas associadas a diferentes espécies de badnavírus em diversas culturas variam entre 10% a 90%. No geral a gama de hospedeiros desse vírus é restrita, delimitada a uma ou duas famílias botânicas. Os sintomas causados por infecção de badnavírus são variados e na maioria dos casos incluem mosqueado clorótico, estrias necróticas, deformação e redução do tamanho dos entrenós levando ao desenvolvimento de nanismo (BHAT et al., 2016).

A disseminação de badnavírus ocorre principalmente por propagação vegetativa e algumas poucas espécies como *Commelina yellow mottle virus* (ComYMV), *Kalanchoe top-spotting virus* (KTSV), *Piper yellow mottle virus* (PYMoV), *Cocoa swollen shoot virus* (CSSV) e *Taro bacilliform virus* (TaBV) também podem ser transmitidas por sementes (HEARON et al., 1984; QUAINOO et al., 2008; HAREESH; BHAT, 2010; DEESHMA et al., 2014; BHAT et al., 2016). A transmissão horizontal de badnavírus ocorre na maioria dos casos através de várias espécies de cochonilha. As espécies *Gooseberry vein banding virus*

(GVBaV), *Rubus yellow net virus* (RYNV) e *Spiraea yellow leaf spot virus* (SYLSV) são transmitidas por afídeos (BHAT et al., 2016).

No Brasil, infecções causadas por badnavirus já foram descritas em abacaxi (SANTOS, 2013), bananeira (BRIOSO et al., 2012), bougainvillea (RIVAS et al., 2005); inhame (LIMA et al., 2013); cana-de-açúcar (SILVA et al., 2015). Estudos realizados com as culturas de abacaxi, inhame e cana-de-açúcar em Alagoas e outros estados do Nordeste do país, revelaram que a incidência e variabilidade de badnavirus nessa região é elevada (LIMA et al., 2013; SANTOS, 2013; SILVA et al., 2015)

2.8 Diversidade de *Begomovirus* e *Badnavirus* em plantas daninhas/silvestres da família Fabaceae no Brasil

O primeiro registro de um begomovirus infectando uma hospedeira da família Fabaceae no país foi realizado por Costa em 1965, o qual demonstrou que o vírus que causa o mosaico dourado do feijoeiro (*Bean golden mosaic virus*, BGMV) é transmitido pela mosca-branca *Bemisia tabaci* (COSTA et al., 1965). O mosaico dourado do feijoeiro é uma das mais devastadoras doenças para o cultivo de feijoeiro no continente Americano, e desde 1970, o BGMV vêm causando perdas entre 40 a 100% da produção de *Phaseolus* spp no Brasil. (FARIA; MAXWELL, 1999; ARAGÃO, 2013). O BGMV é o begomovirus prevalente nas áreas de cultivo de feijoeiro da região central do país, mas na região Nordeste suas populações vêm sendo gradualmente substituídas por begomovirus nativo de plantas daninhas (RAMOS-SOBRINHO et al., 2014).

A ocorrência de infecção por begomovirus em plantas daninhas da família Fabaceae foi relatada pela primeira vez no país em 2006, nas espécies *Desmodium* sp. e *Macroptilium lathyroides*. No entanto, as espécies de begomovirus associadas a estas plantas não foram identificadas (ASSUNÇÃO et al., 2006).

Uma pesquisa realizada para determinar a diversidade, variabilidade de espécies e estrutura de populações de begomovirus infectando leguminosas não cultivadas, revelou a presença de seis espécies: *Euphorbia yellow mosaic virus* - EuYMV proveniente de *Macroptilium atropurpureus*); *Centrosema yellow spot virus* - CenYSV infectando *Centrosema brasilianum*); BGMV, *Macroptilium yellow net virus* - MaYNV, *Macroptilium yellow vein virus* – MaYVV obtidos a partir de *M. lathyroides* e *Macroptilium yellow spot virus* – MaYSV, causando infecção em *M. lathyroides*, *Calopogonium mucunoides*, *Canavalia* sp. Os resultados desse estudo revelaram que estas hospedeiras daninhas são

reservatórios de vários begomovírus, e podem desempenhar um importante papel como fonte de inóculo e fonte de novos vírus para plantas cultivadas (SILVA et al., 2012). Acredita-se que begomovírus que infectam plantas daninhas/silvestres no Brasil tem sido horizontalmente transferidos para plantas cultivadas, e que na nova hospedeira eles rapidamente evoluem por recombinação e pseudorecombinação, dando origem a novas espécies (CASTILLO-URQUIZA et al., 2008; FERNANDES et al., 2009).

A espécie MaYSV tem sido frequentemente encontrada infectando naturalmente leguminosas daninhas e cultivadas como *Macroptilium* spp., *C. mucunoides*, *Canavalia* spp., *Desmodium glabrum*, feijão comum e feijão-fava nos estados de Alagoas, Paraíba, Pernambuco e Sergipe (SILVA et al., 2012; LIMA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014; FONTENELE et al., 2016). Nos últimos anos, MaYSV parece estar deslocando populações de BGMV em feijão comum e feijão-fava nessas regiões. Evidências corroboram com esses fatos como por exemplo: Em 2005, apenas BGMV foi obtido de feijão-fava nos estados de Alagoas e Pernambuco. Contudo, em 2011, MaYSV foi o begomovírus mais frequentemente obtido a partir de feijão-fava, feijão comum e *M. lathyroides* em Alagoas. Enquanto BGMV e MaYVV foram menos prevalentes, e indicando a rápida emergência de MaYSV em hospedeiras fabáceas em Alagoas (RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Já pesquisas realizadas em áreas de cultivo de feijão comum em 2013 no estado de Pernambuco, também identificaram a prevalência de MaYSV, sendo a espécie BGMV encontrada em apenas uma amostra, em infecção mista com MaYSV (FARIA et al., 2016). No entanto, MaYSV não tem sido detectado em cultivos de feijoeiro na região central do Brasil. BGMV é o vírus prevalente, ocorrendo em importantes áreas de produção situadas nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do país (RAMOS-SOBRINHO et al., 2014).

Pesquisas realizadas para identificar vírus associados a plantas daninhas da família Fabaceae no Brasil, indicam que similar ao que é observado para begomovírus provenientes de plantas cultivadas, a diversidade e variabilidade de espécies de begomovírus nessas hospedeiras é bastante alta (SILVA et al., 2012; LIMA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). A alta variabilidade genética nas populações de MaYSV se deve principalmente a eventos de recombinação interespecífica com outros begomovírus provenientes de plantas daninhas e cultivadas (SILVA et al., 2012; LIMA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Enquanto a que a variabilidade genética nas populações de BGMV é baixa (FARIA; MAXWELL, 1999; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Adicionalmente, BGMV possui populações estruturadas com base em região geográfica e nos hospedeiros e as populações de MaYSV não (RAMOS-SOBRINHO et al., 2014).

A emergência de isolados altamente variáveis de MaYSV pode complicar seriamente o manejo dessas viroses em *Phaseolus* spp, que são importantes culturas que compõem a base da alimentação dos brasileiros. O bombardeamento de clones infecciosos de MaYSV demonstrou que esse vírus foi capaz de causar mosaico dourado e distorção foliar em feijão ‘Olathe Pinto’, soja e plantas de feijão GM resistentes a BGMV (FUENTES et al., 2016; PRINS et al., 2008).

Quanto aos badnavírus, até o momento, estes não foram relatados infectando nenhuma hospedeira daninha/silvestre da família *Fabaceae*. A função de plantas daninhas na epidemiologia de doenças causadas por badnavírus é muito pouco estudada. Lockhart et al., (1996), observou que plantas daninhas não são importantes para sobrevivência e/ou disseminação de isolados de *Banana streak virus* (BSV) que causam a estria da bananeira. Uma das explicações para que isto ocorra é que a maioria das hospedeiras infectadas por espécies de badnavírus são propagadas vegetativamente o que facilita o acúmulo e disseminação desses vírus (GEERING; HULL, 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta do material vegetal

Amostras foliares *C. brasiliense* apresentando sintomas indicativos de infecção por vírus foram coletadas em Maceió (AL), em 26 de março de 2017. O material vegetal foi armazenado como exsicata e em freezer à - 80°C até o momento das análises, no Laboratório de Fitopatologia Molecular e Virologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas.

3.2 Detecção e caracterização dos genomas parciais de Begomovírus e Badnavírus

O DNA total foi extraído a partir de cada amostra vegetal segundo protocolo de Lodhi (1994). O DNA obtido foi submetido à ampliação por *Polymerase Chain Reaction* (PCR), para detecção dos vírus pertencentes aos gêneros *Begomovirus* e *Badnavirus*, utilizando os pares de oligonucleotídeos universais e degenerados, respectivamente, PAL1v1978 (5'-GCATCTGCAGGCCACATYGTTCTTLYCCNG-3') PAR1c496 (5'-AATACTGCAGGGCTTYCTRACATRGG-3'), BadnaFP (5'-ATGCCITTYGGIITIAARAAYGCICC-3') e BadnaRP (5'-CCAYTTRCAIACISICCCCAICC-3') (ROJAS et al., 1993; YANG et al., 2003).

As reações foram realizadas em volume total de 60 µL, contendo 6 µL de tampão 10X (KCl 100 mM, Tris-HCl 100 mM pH 9,0, Triton-X 1%), 4,8 µL de dNTPs 2,5 mM, 1,8 µL de MgCl 50 mM, 3 µL de cada oligonucleotídeo (10 µM), 1 U da Taq DNA Polimerase, 1 µL de 2 DNA (10 a 100 ng) e 40 µL de água ultrapura. As condições de amplificação para detecção de begomovirus as condições foram: desnaturação inicial de 94°C por 2 min, 94 °C por 1 min, 52 °C por 1 min, 72 °C por 2 min. Os ciclos foram repetidos 30 vezes exceto o passo inicial e a extensão final a 72 °C por 10 min. Já para a detecção de badnavírus, as condições foram: desnaturação inicial de 94 °C por 4 min, 94 °C por 30 s, 50 °C por 30 s, 72 °C por 30 s. Os ciclos foram repetidos 35 vezes exceto o passo inicial e a extensão final a 72 °C por 10 min.

Após a amplificação, os produtos foram analisados em gel de agarose a 0,8%, em tampão TBE (Tris-Borato, EDTA 0,5M, pH 8,0), corado com brometo de etídeo e visualizado sobre luz ultravioleta.

Para caracterização, os produtos da amplificação foram purificados utilizando-se o kit

GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare). O sequenciamento foi realizado comercialmente (Macrogen Inc., Seul, Coréia do Sul), diretamente a partir dos produtos de PCR purificados.

3.3 Análise de sequências e demarcação de espécies

Sequências nucleotídicas correspondentes às sequências parciais do componente genômico DNA-A dos begomovírus e domínio RT/RNaseH do genoma dos badnavírus foram montadas utilizando-se o programa *CodonCode Aligner* v. 4.1.1 (www.codoncode.com). As sequências obtidas foram inicialmente analisadas com o algoritmo BLAST n (ALTSCHUL et al., 1990) e o banco de dados de nucleotídeos não-redundante GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) para determinar as espécies virais com as quais elas compartilham maior identidade de sequência. As sequências similares obtidas a partir do GenBank (Tabela 1) foram utilizadas para demarcação de espécie dos novos isolados de begomovírus e badnavírus utilizando-se o programa *Sequence Demarcation Tool* v. 1.2 (MUHIRE et al., 2013), com base no nível limite de 80% estabelecido pelo ICTV para badnavírus (GEERING; HULL, 2012) e 91% para begomovírus (BROWN et al., 2015).

Tabela 1. Sequências de badnavirus e begomovirus obtidas a partir do banco de dados não-redundantes GenBank.

Espécies/ Acrônimos	Código de acesso no Genbank	Família
<i>Banana streak CA virus</i> (BSCAV)	HQ593111	Caulimoviridae
<i>Banana streak IM vírus</i> (BSIMV)	HQ593112	Caulimoviridae
<i>Banana streak OL virus</i> (BSOLV)	NC003381	Caulimoviridae
<i>Banana streak UA virus</i> (BSUAV)	HQ593107	Caulimoviridae
<i>Banana streak UI vírus</i> (BSUIV)	HQ593108	Caulimoviridae
<i>Banana streak UL vírus</i> (BSULV)	HQ593109	Caulimoviridae
<i>Banana streak UM vírus</i> (BSUMV)	HQ593110	Caulimoviridae
<i>Banana streak virus Acuminata Yunnan</i> (BSYNV)	DQ092436	Caulimoviridae
<i>Banana streak virus strain Acuminata Vietnam</i> (BSVNV)	AY750155	Caulimoviridae
<i>Bean golden mosai virus</i> (BGMV)	KJ939753	Geminiviridae
<i>Bean golden mosaic virus isolate BR:Arp1:05</i> (BGMV)	KJ939707	Geminiviridae
<i>Bougainvillea spectabilis chlorotic vein-banding virus</i> (BsCVBV)	EU034539	Caulimoviridae
BR_Mac1_17	Obtido neste estudo	Caulimoviridae
BR_Mac2_17	Obtida neste estudo	Geminiviridae
<i>Cacao swollen shoot virus</i> (CSSV)	NC001574	Caulimoviridae
<i>Canna yellow mottle virus</i> (CaYMV)	MF074075	Caulimoviridae
<i>Centrosema yellow spot virus</i> (CenYSV)	JN419002	Geminiviridae
<i>Citrus yellow mosaic virus</i> (CiYMV)	NC003382	Caulimoviridae
<i>Commelina yellow mottle virus</i> (ComYMV)	NC001343	Caulimoviridae
<i>Cowpea golden mosaic virus</i> (CPGMV)	AF188708	Geminiviridae
<i>Cycad leaf necrosis virus</i> (CyNLV)	EU853709	Caulimoviridae
<i>Dioscorea bacilliform AL virus</i> (DBALV)	KX008573	Caulimoviridae
<i>Dioscorea bacilliform RT virus</i> (DBRTV1)	KX008574	Caulimoviridae
<i>Dioscorea bacilliform RT virus</i> (DBRTV2)	KX008577	Caulimoviridae
<i>Dioscorea bacilliform virus</i> (DBSNV)	DQ822073	Caulimoviridae
<i>Dioscorea rotundata endogenous virus eDBV5</i>	KF829974	Caulimoviridae
<i>Dioscorea rotundata endogenous virus eDBV8</i>	KF829997	Caulimoviridae
<i>Dracaena mottle virus</i> (DrMV)	DQ473478	Caulimoviridae

<i>Fig badnavirus 1</i> (FBV1)	JF411989	Caulimoviridae
<i>Gooseberry vein banding virus</i> (GVBAV)	HQ852248	Caulimoviridae
<i>Grapevine roditis leaf discoloration-associated virus</i> (GRLDaV)	HG940503	Caulimoviridae Caulimoviridae
<i>Grapevine vein-clearing virus</i> (GVGC)	JF301669	Caulimoviridae
<i>Kalanchoe top-spotting virus</i> (KTSV)	NC004540	Caulimoviridae
<i>Macroptilium common mosaic virus</i> (MaCmMV)	KX691396	Geminiviridae
<i>Macroptilium common mosaic virus</i> isolate ALM9_2A (MaCmMV)	KX691397	Geminiviridae
<i>Macroptilium yellow vein virus</i> (MaYVV) isolate BR:Pai26:11	KJ939906	Geminiviridae
<i>Macroptilium yellow vein virus</i> isolate BR:Pai22:11	KJ939902	Geminiviridae
<i>Mulberry badnavirus 1</i> (MBV-1)	LN651258	Caulimoviridae
<i>Musa acuminata</i> endogenous Badnavirus	KF386728	Caulimoviridae
<i>Pagoda yellow mosaic associated virus</i> (PYMAV)	KJ013302	Caulimoviridae
<i>Pelargonium vein banding virus</i> (PVBV)	GQ428155	Caulimoviridae
<i>Pineapple bacilliform comosus virus</i> (PBCoV)	GU121676	Caulimoviridae
<i>Piper yellow mottle virus</i> (PYMoV)	KJ873042	Caulimoviridae
<i>Rubus yellow net virus</i> (RYNV)	KM078034	Caulimoviridae
<i>Spiraea yellow leaf spot virus</i> (SYLSV)	AF299074	Caulimoviridae
<i>Sugarcane bacilliform Guadeloupe D virus</i> (SCBGCV)	FJ439817	Caulimoviridae
<i>Sugarcane bacilliform Ireng Maleng virus</i> (SCBIMV)	NC003031	Caulimoviridae
<i>Sugarcane bacilliform Mor virus</i> (SCBMOV)	NC_008017	Caulimoviridae
<i>Sugarcane bacilliform virus</i> clone 10 (SCBGAV)	FJ824814	Caulimoviridae
<i>Sugarcane bacilliform virus</i> isolate BB (SCBV-BB)	JN377535	Caulimoviridae
<i>Sugarcane bacilliform virus</i> isolate BRU (SCBV-BRU)	JN377537	Caulimoviridae
<i>Sugarcane bacilliform virus</i> isolate BT (SCBV-BT)	JN377536	Caulimoviridae
<i>Sugarcane bacilliform virus</i> isolate Iscam (SCBV-IsCam)	JN377534	Caulimoviridae

<i>Sweet potato pakakuy virus</i> (SPVa)	FJ560943	Caulimoviridae
<i>Sweetpotato badnavirus B</i> (SPBb)	FJ560944	Caulimoviridae
<i>Taro bacilliform virus</i> (TaBV)	AF357836	Caulimoviridae
<i>Turmeric mild chlorosis virus</i> (TuMCIV)	AJ810081	Caulimoviridae
<i>Yacon necrotic mottle virus</i> (YNMoV)	KM229702	Caulimoviridae

3.4 Análise filogenética

Alinhamentos múltiplos de sequências nucleotídicas provenientes de *C. brasilianum* e outros isolados disponíveis no GenBank (Tabela 1) foram preparados e ajustados manualmente para o conjunto de dados de sequência parcial do DNA-A dos begomovírus e domínio RT/RNaseH dos badnavírus utilizando-se o algoritmo MUSCLE (EDGAR, 2004), disponível no MEGA6 (TAMURA et al., 2013). O alinhamento do conjunto de dados de sequência parcial do DNA-A foi usado para determinar o relacionamento filogenético dos begomovírus pelo método de Máxima Verossimilhança usando o software MEGA 5.05 (TAMURA et al., 2013). O melhor modelo de substituição de nucleotídeos para cada grupo foi determinado com a ferramenta *Find Best DNA/Protein Models* (ML) e a confiabilidade de cada ramo determinada por bootstrap de 1000 replicações.

Para o conjunto de dados RT/RNaseH dos badnavirus, o relacionamento filogenético foi realizado por inferência Bayesiana no web portal CIPRES (MILLER et al., 2010) usando MrBayes v. 3.2.3 (RONQUIST et al., 2012). O melhor modelo de substituição (GTR + I) de nucleotídeos foi determinado para cada conjunto de dados usando MrModeltest 2.3 (POSADA; BUCKLEY, 2004) de acordo com o Akaike Information Criterion (AIC). Análises foram rodadas por 10 milhões de gerações usando quatro cadeias e amostrando a cada 1.000 gerações, para um total de 10.000 árvores. As primeiras 2.500 árvores foram descartadas como uma fase de burn-in. Probabilidades posteriores (RANNALA; YANG, 1996) foram determinadas a partir de uma árvore consenso majority-rule gerada com as 7.500 árvores remanescentes.

3.5 Análises de recombinação

Os conjuntos de dados da sequência parcial do DNA-A dos begomovírus e domínio RT/RNaseH dos badnavírus obtidos de *C. brasilianum* foram também submetidos à análise de

detecção de evolução em rede, utilizando o método *Neighbor-Net* implementado no programa SplitsTree v. 4.10 (HUSON; BRYANT, 2006).

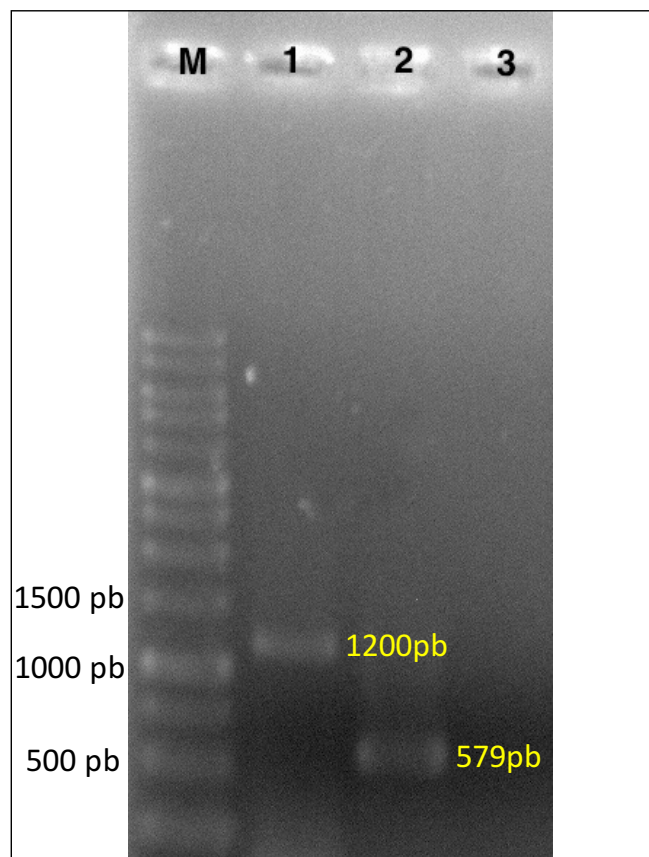
A determinação dos locais (*breakpoints*) de recombinação e identificação de prováveis sequências parentais foram realizadas utilizando os métodos RDP, Geneconv, Boot-scan, Maximum Chi Square, Chimaera, SisterScan e 3Seq implementados no pacote RDP v. 4.0 (MARTIN et al., 2015). Nesta análise, o alinhamento do conjunto de ambos conjuntos de dados foi analisado com definições padrão para os diferentes métodos e a significância estatística foi inferida por um *P*-valor menor que o Bonferroni corrigido de 0,05. Somente eventos de recombinação detectados no mínimo por quatro diferentes métodos foram considerados confiáveis.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises de sequências e demarcação de espécie

A amplificação por PCR utilizando o par de oligonucleotídeos BadnaFP/BadnaRP direcionou a amplificação de um fragmento contendo aproximadamente 580 pares de base (pb) que corresponde ao domínio RT/RNaseH do genoma dos badnavírus. Enquanto o par de oligonucleotídeos PAL1v1978/PAR1C496 direcionou a amplificação de um fragmento de aproximadamente 1200pb que compreende a região comum e as extremidades amino terminal dos genes *Rep* e *Cp* do genoma dos begomovírus (Figura 5). Esses resultados revelam a ocorrência natural de infecção mista por *Badnavirus* e *Begomovirus* em *C. brasilianum*.

Figura 5. Produto da PCR visualizado em gel de agarose a 0,8%. Onde M: marcador molecular KASVI; 1: fragmento de aproximadamente 1,2kb referente a região comum e as extremidades amino terminal dos genes *Rep* e *Cp* do genoma dos begomovírus; 2: fragmento de aproximadamente 580 pb referente ao domínio RT/RNaseH do genoma dos badnavírus; 3: Controle negativo.



As análises BLASTn e comparações de sequências pareadas utilizando SDT confirmaram a infecção mista por *Badnavirus* e *Begomovirus* em *C. brasilianum* (Figuras 6 e 7). O isolado BR_Mac1_17 compartilhou maior identidade nucleotídica (67,3%) com o badnavírus *Grapevine roditis leaf discoloration-associated virus* (GRLDaV), obtido em amostras foliares de uva, na Grécia. (MALIOGKA, et al., 2015). De acordo com o critério de $\geq 80\%$ de identidade de sequência nucleotídica no domínio RT/RNase H estabelecido pelo ICTV (GEERING; HULL, 2012), o isolado BR_Mac1_17 corresponde a uma provável nova espécie do gênero *Badnavirus*, para qual foi proposto o nome *Centrosema bacilliform virus* (CenBV). Este também constitui o primeiro relato de ocorrência de infecção natural por badnavírus em planta daninha e na família *Fabaceae* no Brasil.

Figura 6. Matriz bidimensional representando porcentagem de identidade de comparações pareadas de sequências nucleotídicas do domínio RT/RNase H do isolado BR_Mac1_17 com amostras de badnavirus disponíveis no GenBank.

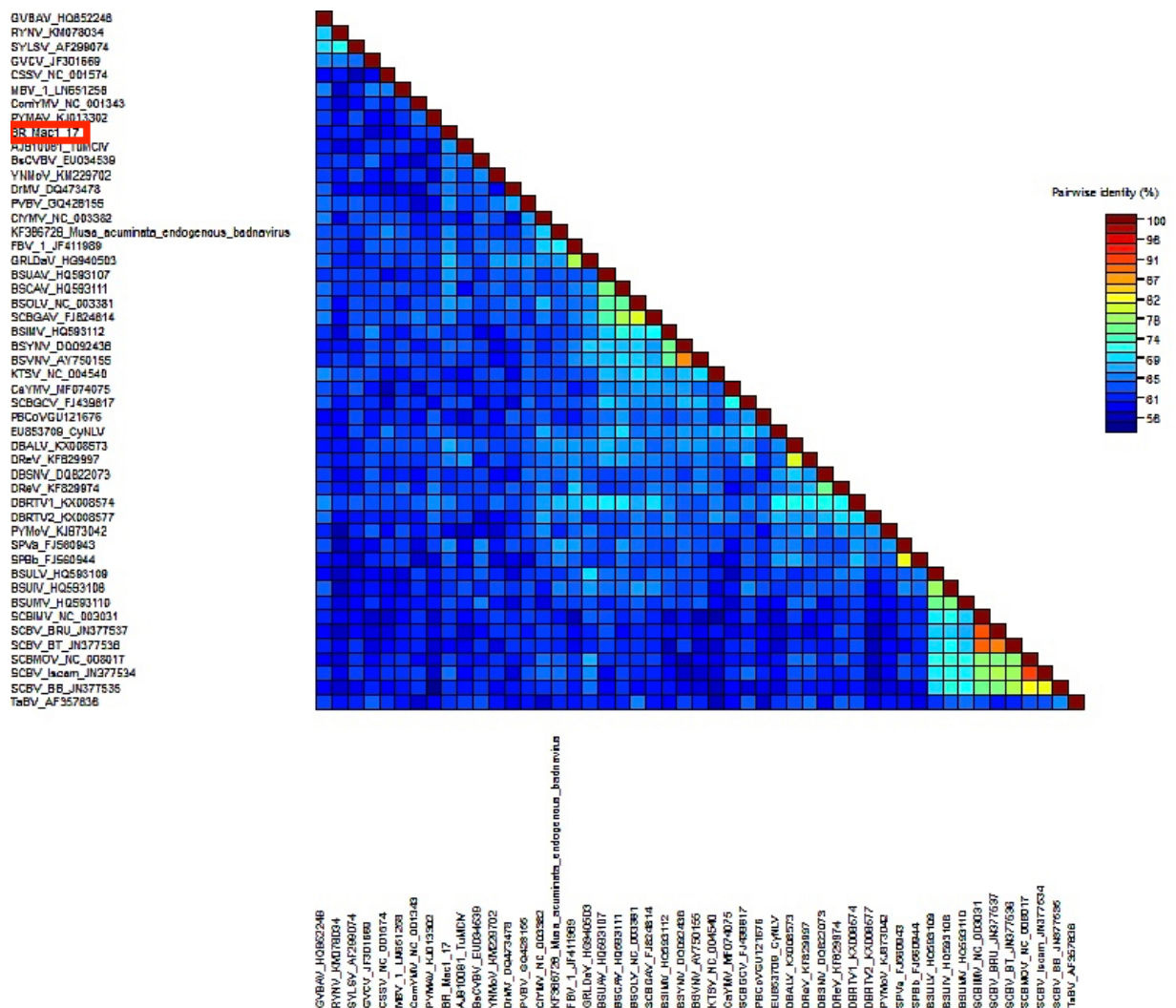
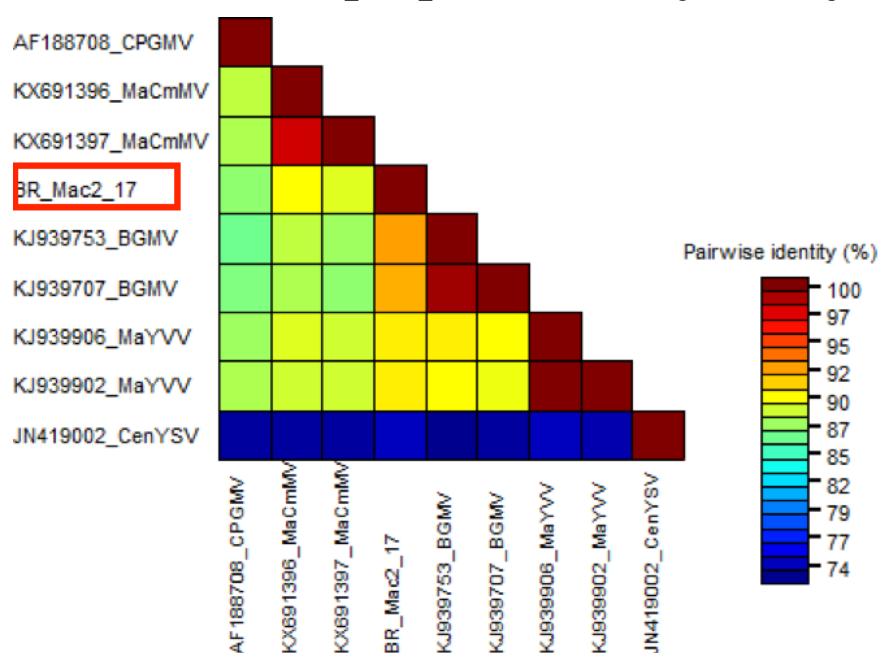


Figura 7. Matriz bidimensional representando porcentagem de identidade de comparações pareadas de sequências nucleotídicas do DNA-A do isolado BR_Mac2_17 com amostras de begomovírus disponíveis no GenBank.



Relatos de detecção de badnavírus em plantas daninhas são escassos, até o momento poucas espécies foram descritas e caracterizadas, por exemplo, *Commelina yellow mottle virus* isolado de *Commelina diffusa*, que é a espécie tipo do gênero *Badnavirus* (GEERING; HULL, 2012) e *Red clover bacilliform virus* (RCBV) obtida de *Trifolium pratense* na República Tcheca (FRÁNOVÁ et al., 2012). Dois badnavírus sem espécie definida foram obtidos das plantas daninhas da família Asteraceae, *Ambrosia psilostachya* (MELCHER et al., 2008) e *Sclerocarpus africanus* presente em plantações de inhame na Nigéria (ASALA et al., 2014). Quanto a ocorrência de badnavírus em plantas da família *Fabaceae*, apenas as espécies RCBV (FRÁNOVÁ et al., 2012) e *Wisteria badnavirus 1* (WBV1) isolado da planta ornamental *Wisteria sinensis* na China (LI et al., 2017), têm sido descritas.

O isolado BR_Mac2_17 apresentou maior identidade variando de 91,8% [KJ939707] a 92% [KJ939753] com dois isolados do begomovírus *Bean golden mosaic virus* obtidos de feijão-fava (*Phaseolus lunatus*) provenientes dos municípios de Arapiraca e Palmeira dos Índios, Alagoas (RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). O ICTV determina que begomovírus que compartilham $\geq 91\%$ de identidade de sequência de nucleotídeos do genoma completo pertencem a mesma espécie (BROWN et al., 2015). O fragmento de 1,2 kb amplificado pelo par de oligonucleotídeos PAL1v1978/PAR1C496, corresponde a aproximadamente metade da

sequência do genoma viral do DNA-A (2,6 kb), sugerindo que BR_Mac2_17 seja um begomovírus da espécie BGMV. Até o presente momento, a espécie *Centrosema yellow spot virus* (CenYSV), era o único begomovírus descrito em *C. brasilianum* (SILVA et al., 2012). A obtenção da sequência do genoma completo é essencial para revelar o real estado taxonômico isolado BR_Mac2_17, no entanto este processo se encontra em andamento.

No Brasil, BGMV tem sido um importante patógeno infectando feijoeiro (*Phaseolus spp.*) desde 1970 (COSTA, 1976; FARIA; MAXWELL, 1999), causando perdas entre 40 e 100% (MORALES, 2006). As leguminosas (*Fabaceae*) feijão comum (*P. vulgaris*), feijão fava (*P. lunatus*) e planta daninha *Macroptilium lathyroides* são hospedeiras naturais de BGMV na região nordeste, incluindo o Estado de Alagoas (SILVA et al., 2012; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Até o momento, não existe relato da ocorrência de infecção natural de *C. brasilianum* por BGMV no Brasil e no mundo. No entanto, em um estudo realizado em Cuba, 44 acessos de *Centrosema spp.* foram testados para resistência a infecção por BGMV e 26 deles foram suscetíveis, na sua maioria da espécie *C. pubensces* (SCHULTZE-KRAFT, 1990). Portanto, este consiste no primeiro relato da infecção natural de *C. brasilianum* por BGMV em todo o mundo e amplia a gama de hospedeiras desse vírus.

Os sintomas apresentados na planta de *C. brasilianum* co-infectada pelas espécies CenBV e BGMV foram de mosaico e enrolamento foliar (Figura 8). Mosaico amarelo é o sintoma comumente causado por BGMV em plantas infectadas de feijão (*Phaseolus spp.*) e daninhas da família fabaceae (FARIA; MAXWELL, 2000; SILVA et al., 2012; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Enquanto os sintomas mais frequentes causados por badnavírus são clorose interveinal, mosqueado e estrias cloróticas (GEERING; HULL 2012). Portanto, os sintomas de mosaico e enrolamento foliar causado por co-infecção de CenBV e BGMV em *C. brasilianum* indica a possível ocorrência de sinergismo entre as duas espécies virais. A expressão dos sintomas devido a uma infecção viral depende de vários fatores, como o nível de resistência do hospedeiro, o estágio de crescimento da planta, espécie de vírus ou cepas e condições ambientais. (PICÓ; DÍEZ; NUEZ, 1996).

Figura 8. Planta de *C. brasilianum* exibindo sintomas de mosaico e enrolamento foliar (seta vermelha) causados pela de infecção mista com os vírus CenBV e BGMV.



Na natureza, infecções mistas de plantas por vírus são comuns e dois ou mais vírus podem causar sinergismo onde formas mais severas de sintomas são expressas pela planta. Em situações de sinergismo, a concentração do vírus, o movimento do vírus ou ambas podem ser aumentados (ZHANG et al., 2001). No entanto, para confirmar o efeito sinérgico da infecção mista na expressão de sintomas em *C. brasilianum* torna-se necessário realizar um experimento de transmissão experimental para diferenciar os sintomas que cada vírus causa quando em infecção simples na hospedeira e em plantas indicadoras.

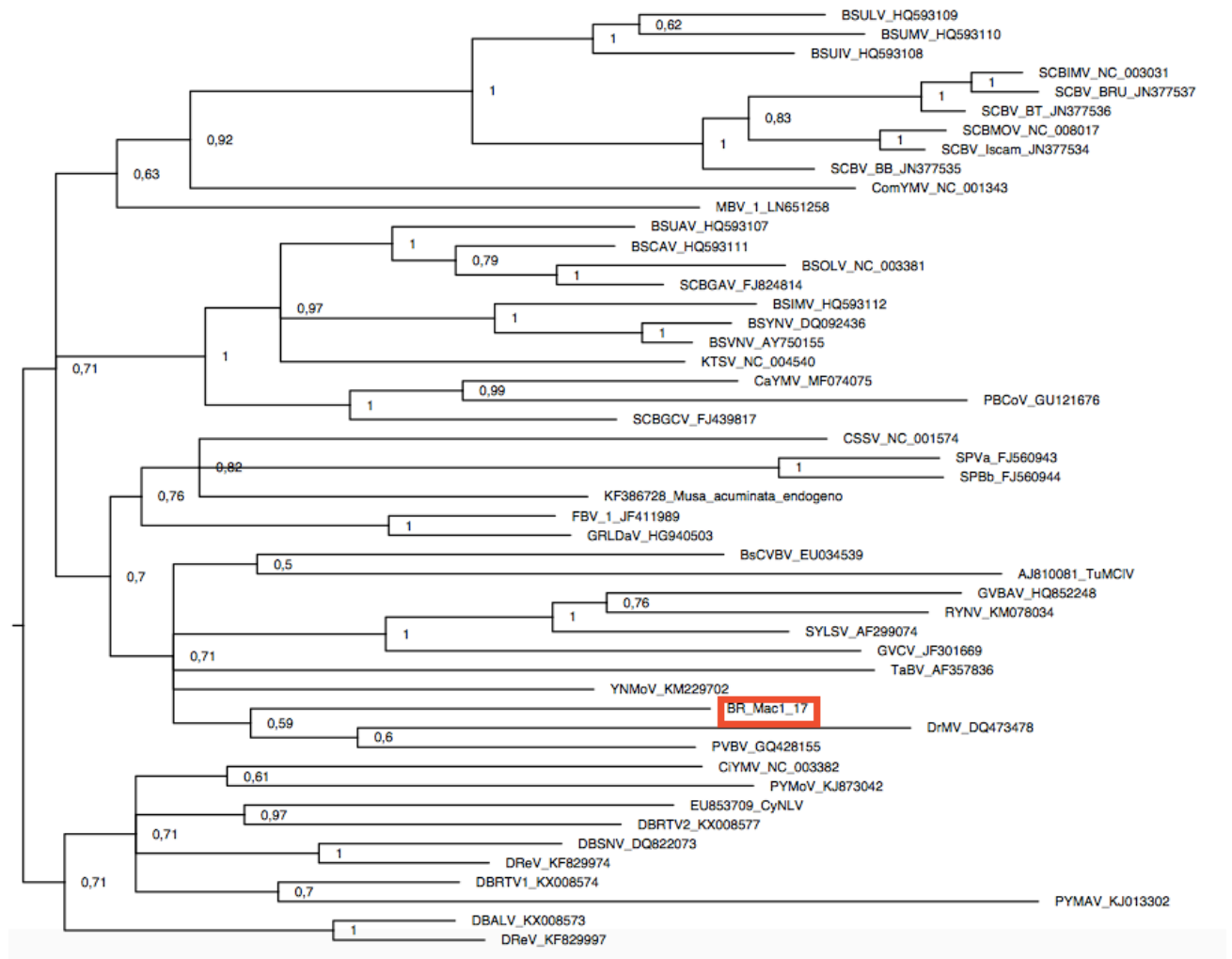
Infecções mistas também são importantes para evolução de vírus porque fornece a pré-condição para recombinação, mecanismo que pode contribuir para o surgimento de isolados virais mais severos ou novas espécies de vírus (PADIDAM et al., 1999; SANZ et al., 2000; RIBEIRO et al., 2003, MARTIN et al., 2011; SYLLER, 2012). Recombinação tem sido demonstrado como o principal fator que contribui para a variabilidade de vírus de DNA (MARTIN et al., 2011).

4.2 Análises Filogenéticas

Na filogenia inferida por análise de Inferência Bayesiana o conjunto de dados RT/RNaseH revelou que o isolado BR_Mac1_17 (CenBV) ocupou um ramo independente na árvore o qual está mais proximamente relacionado com as espécies *Dracaena mottle virus* (DrMV) e *Pelargonium vein banding virus* (PVBV), que infectam *Dracaena sanderiana* (Liliaceae), *Pelargonium peltatum* (Geraniaceae) bem como alguns membros das famílias *Amaranthaceae* e *Solanaceae* (BRUNT et al, 1997). Este resultado não corrobora com o observado nas análises *parwise* a qual indicou que a espécie *Grapevine roditis leaf discoloration-associated virus* (GRLLDaV) é mais próxima da espécie tentativa CenBV. O fato de CenBV, apresentar baixa identidade de sequência e não apresentar relacionamento

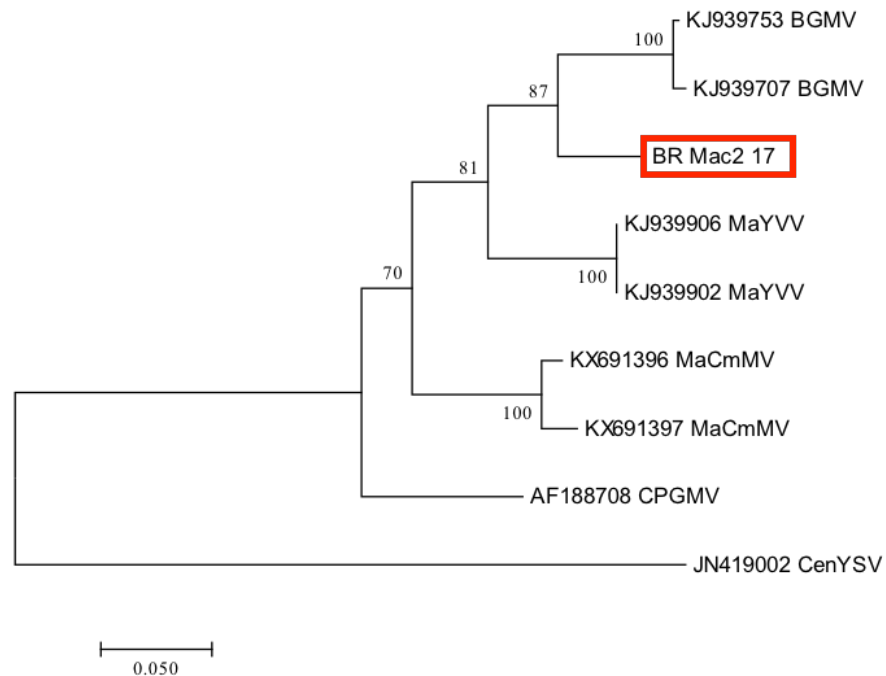
filogenético com badnavirus endógenos, indica que esse vírus está ocorrendo de forma episomal na amostra de *C. brasilianum* da qual foi obtido. Estas incongruências encontradas nas análises *pairwise* e filogenéticas podem refletir na ocorrência de possíveis eventos de recombinação entre as espécies.

Figura 9. Análise filogenética de inferência Bayesiana baseada na sequência da região RT/RNaseH da ORF III do genoma dos badnavírus mais similares obtidos no GenBank. BR_Mac1_17 foi isolado neste estudo.



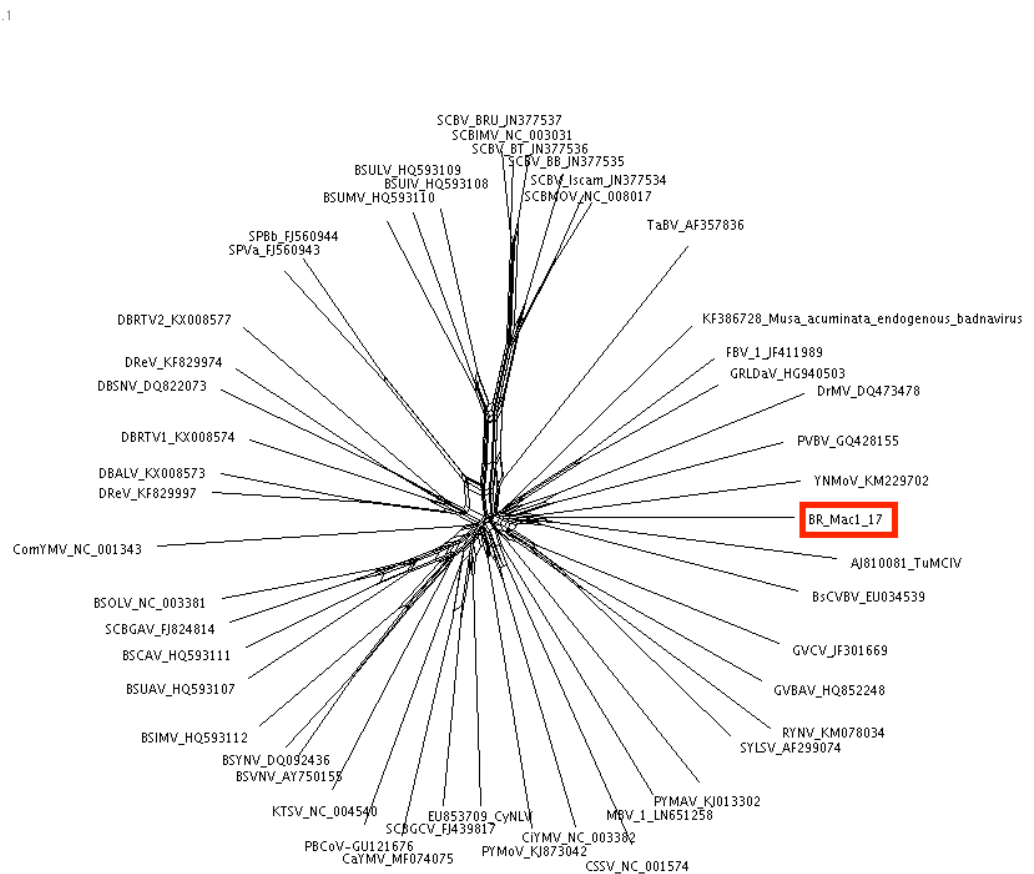
Na árvore ML para o conjunto de dados de sequência parcial do DNA-A, o isolado BR_Mac2_17 (BGMV) agrupou juntamente com os dois isolados de BGMV obtidos de *P. lunatus* em Alagoas (Figura 10). Esses resultados reforçam a hipótese que o isolado BR_Mac2_17 pertence a espécie BGMV.

Figura 10. Análise filogenética de Máxima Verossimilhança baseada na sequência parcial do DNA-A do genoma dos begomovírus mais similares obtidos no GenBank BGMV, MaYVV, MaCmMV, CPGMV e CenYSV. BR_Mac2_17 foi isolado neste estudo.



Análises de evolução em rede foram utilizadas para melhor investigar possíveis eventos de recombinação ocorrendo no isolado de CenBV obtido nesse estudo. A análise revelou que CenBV (BR_Mac1_17), forma uma rede interligada com YNMoV e TuMCIV (Figura 11), indicando possíveis eventos de recombinação antigos ocorreram entre eles e que posteriormente esta espécie teria seguido sua evolução por ocorrência de mutações. A proximidade entre YNMoV e CenBV foi observada pelas análises filogenéticas. No entanto, não foi possível determinar os breakpoints de recombinação e identificação das possíveis espécies parentais envolvidas provavelmente devido ao pequeno tamanho da sequência analisada (~580nt).

Figura 11. Análise reticulada do isolado BR_Mac1_17 para eventos de recombinação.



Contudo, sequências nucleotídicas da região parcial dos domínios RT/RNaseH (579pb), presentes na ORF III, vem sendo amplamente utilizadas para identificação de espécies pertencentes ao gênero *Badnavirus* (GUIMARÃES et al., 2015; SILVA et al., 2015; MULLER et al., 2011). Oligonucleotídeos universais descritos por Yang et al. (2003) são bastante eficientes na amplificação dessa região genômica nos badnavírus. Um estudo prévio para determinar o posicionamento taxonômico e efeito da recombinação e entre isolados do gênero *Badnavirus*, demonstrou que a sequência parcial da região RT/RNaseH (579pb) é suficiente para demarcação da maioria das espécies de badnavírus atualmente descritas, sendo ineficiente apenas na diferenciação das espécies de SCBV e BSV obtidas de banana e cana-de-açúcar que compartilham mais de 80% de identidade nucleotídica para esta região (JORDÃO, 2015).

Poucos são os estudos sobre evolução de espécies da família *Caulimoviridae*, no entanto, tem sido demonstrado frequente ocorrência de recombinação intraespecífica entre espécies de *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) (FROISSART et al., 2005); e recombinação

intra/interespecíficas entre os badnavírus *Banana streak virus* (BSV) e *Sugarcane bacilliform mosaic virus* (SCBMV) (SHARMA et al., 2015).

Evidência de evolução em rede também foi observada entre BR_Mac2_17 (BGMV) e outros isolados de BGMV, sugerindo um evento de recombinação intraespecífica (Figura 12). Na análise RDP o isolado BR_Mac2_17 não foi identificado como um recombinante. No entanto, breakpoints de recombinação ocorrendo na região que codifica para os genes *Rep* de outros dois isolados de BGMV, indicou o isolado BR_Mac2_17 como doador parental (Tabela 2). Confirmando o evento detectado pela análise de evolução em rede.

Figura 12. Análise reticulada do isolado BR_Mac2_17 para eventos de recombinação. Onde observa-se eventos de recombinação intraespecífica com BGMV,

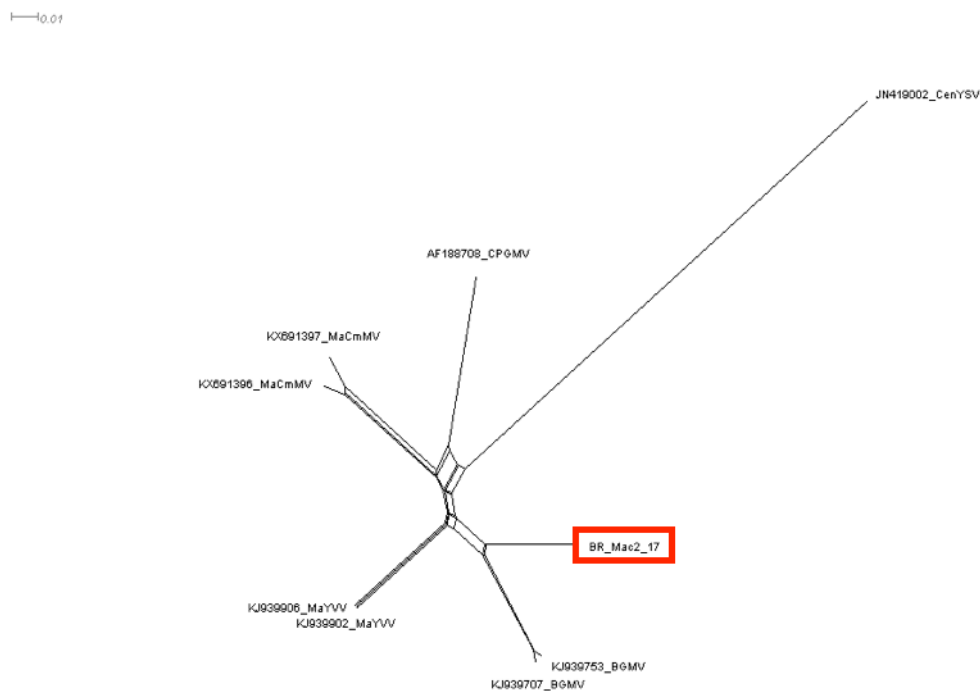


Tabela 2. Eventos de recombinação detectados entre diferentes isolados de espécies de begomovirus.

Eventos	Pontos de recombinação		Recombinante	Sequências Parentais		Métodos*	Valor P
	Início	Fim		Secundária	Principal		
1	690	749	KJ939753_BGMV	Desconhecido	BR_Mac2_17	RGBMCSP	6,05SE-04
2	672	780	KJ939707_BGMV	Desconhecido	BR_Mac2_17	RGBMSPL	6,05SE-04

*= R, RDP; G, GENECONV; B, Bootscan; M, Maxchi; C, Chimaera; S, SiScan; L, LARD; P, PhyIPro.

Estudos tem demonstrado que a espécie BGMV possui baixa variabilidade genética em hospedeiras da família *Fabaceae* como *P. vulgaris* e *P. lunatus* (fava), (FARIA; MAXWELL, 1999; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014) e que este fato reflete um reduzido grau de eventos de recombinação ocorrendo no seu genoma (RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Apesar de poucos eventos de recombinação serem encontrados ao longo do genoma dessa espécie, hotspots de recombinação são frequentemente encontrados na região que codifica para os genes *Rep* e *Cp* e tem identificado BGMV e outros begomovírus nativos de plantas daninhas como *Macroptilium lathyroides* e *Sida* spp. como doadores parentais (SILVA et al., 2012; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Mais uma evidência da importância de hospedeiras daninhas na sobrevivência e evolução de BGMV.

Dessa forma, os resultados encontrados nesse estudo indicam que *C. brasilianum* constitui um reservatório de badnavírus e begomovírus. Estudos adicionais são necessários para demonstrar se esta daninha desempenha um papel ativo como fonte de inóculo primário ou como uma fonte de novos vírus para plantas cultivadas.

5 CONCLUSÕES

Constatou-se a ocorrência de infecção viral mista de vírus pertencentes aos gêneros *Badnavirus* e *Begomovirus* na planta daninha *Centrosema brasilianum*

O isolado BR_Mac1_17 é uma provável nova espécie do gênero *Badnavirus* para qual foi designado o nome tentativo *Centrosema bacilliform virus*.

Fortes evidências sugerem que o isolado BR_Mac2_17 pertence a espécie *Bean golden mosaic virus*

A espécie *C. brasilianum* pode atuar como reservatórios de espécies badnavírus e begomovírus

Estudos adicionais são necessários para demonstrar se *C. brasilianum* desempenha um papel ativo como fonte de inóculo ou fonte contínua de novos vírus para plantas cultivadas.

6 REFERÊNCIAS

- AHLAWAT, Y. S. et al. Association of a badnavirus with citrus mosaic disease in India. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 80, p. 590-592, 1996.
- AHMAD, J.; SINGH, B. R.; AL-KHEDHAIRY, A. A.; ALARIFI, S.; KHAN, A. J.; MUSARRAT, J. Characterization of Sunn hemp begomovirus and its geographical origin based on in silico structural and functional analysis of recombinant coat protein. **African Journal of Biotechnology**. v. 10, p. 2600-2610, 2011.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. v. 215, 403-410, 1990.
- ARAGÃO, F. J; NOQUEIRA, E. D; TINOCO, M. L; FARIA, J.C. Molecular characterization of the first commercial transgenic common bean immune to the Bean golden mosaic virus. **Journal of Biotechnology**. v. 166, p. 42-50. 2013.
- ASALA, S.; ALEGBEJO, M. D.; KASHINA, B. D.; BANWO, O. O.; SHINGGU, C. P. Viruses in weeds in *Dioscorea* yam fields in Nigeria. **African Crop Science Journal**. v. 22, n. 2, p. 109-115, 2014.
- ASSUNÇÃO, I. P.; LISTIK, A; F.; BARROS, M. C. S.; AMORIM, E. P. R.; SILVA, S. J. C.; IZABEL, O.; RAMALHO-NETO, C. E.; LIMA, G. S. A. Diversidade genética de Begomovirus que infectam plantas invasoras na região nordeste. **Planta Daninha**. v. 24, n. 2, p. 239-244, 2006.
- BHAT, A. I; HOHN, T; SELVARAJAN, R. Badnaviruses: The Current Global Scenario. **Viruses**. v. 8, n. 6, 2016.
- BOUSALEM, M.; DOUZERY, E. J. P.; SEAL, S. E. Molecular taxonomy, phylogeny, and evolution of plant reverse transcribing viruses (Caulimoviridae) inferred from the reverse transcriptase sequences. **Archives Virology**. v. 153, p.1085-1102. 2008.
- BRIDDON R. W. Cotton leaf curl disease, a multicomponent begomovirus complex **Molecular Plant Pathology**. v. 4, p. 427-434, 2003.

BRIDDON, R. W. et al. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. **Virology**, v. 177, p. 85-94, 1990.

BRIOSO, P. S. T. Badnavirus e seu controle. In: 45 o Congresso Brasileiro de Fitopatologia. **Tropical Plant Pathology** (Suplemento) v. 37, p. 1-19. 2012.

BROWN, J. K. et al. **Family Geminiviridae**. In: KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. (eds) *Virus Taxonomy 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, p. 351-373, 2012.

BROWN, J. K. et al. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence Comparisons. **Archives of Virology**, v. 160, p. 1593-1619, 2015.

BROWN, J. K. The biology and molecular epidemiology of the Geminiviridae subgroup III. **Plant Microbe Interactions**, v. 2, p. 125-195, 1997.

BROWN, J. K. New species and revised taxonomy proposal for the genus Begomovirus (Geminiviridae): phylogenetic and pairwise distance analysis using the same approach as implemented for the genera Mastrevirus and Curtovirus in the same family, 2013. Disponível em:

<http://talk.ictvonline.org/files/ictv_official_taxonomy_updates_since_the_8th_report/m/plant-official/4838.aspx>. Acesso em Abril de 2017.

BRUNT, A. A.; CRABTREE, K.; DALLWITZ, M. J.; GIBBS, A. J.; WATSON, L.; ZURCHER, E. J. *Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database*, 1997. Disponível em: <<http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>>. Acesso em Setembro de 2017.

CASTILLO-URQUIZA G. P. et al. **Genetic structure of tomato-infecting begomovirus populations in two tomato-growing regions of Southeastern Brazil**. In: 6TH INTERNATIONAL GEMINIVIRUS SYMPOSIUM AND 4TH INTERNATIONAL SSDNA COMPARATIVE VIROLOGY WORKSHOP, Program and Abstracts. Guanajuato, México. 2010.

CASTILLO-URQUIZA, G. P.; BESERRA JUNIOR, J. E.; BRUCKNER, F. P.; LIMA, A. T.; VARSANI, A.; ALFENAS-ZERBINI, P.; ZERBINI, M. F. Six novel begomoviruses

infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Archives of Virology**. v. 153, p. 1985-1989. 2008.

CHENG, C.; LOCKHART, B. E. L.; OLSZEWSKI, N. E. The ORF I and II proteins of Commelina yellow mottle virus are virion-associated. **Virology**. v. 223, n. 2, p. 263-71, 1996.

CIAT-Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1979 Tropical Pastures Program anual report CIAT series no. 02ETPO-79. Cali: Colombia, 156 p, 1980.

COSTA, A. S. Three whitefly-transmitted virus diseases of beans in São Paulo, Brazil. **Plant Prot Bull FAO**. v. 13, p. 2-12. 1965.

COSTA, A. S. Whitefly-transmitted plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**. v. 14, p. 429-449. 1976

COTRIM, M. A.; KRAUSE-SAKATE, R.; NARITA, N.; ZERBINI, F. M.; PAVAN, M. A. Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. **Summa Phytopathologica**, v. 33, p. 300-303, 2007.

CROWLEY, N. C; FRANCKI, R. L. B. Purification and some properties od Centrosema mosaic virus. **Australian Journal of Biological Science**. v. 16, p. 468-472, 1963.

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

DANIELS, J. Effect of viruses on potato cultivars planted in Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira** 10: 302, 1985.

DE KOCHKO, A.; VERDAGUER, B.; TAYLOR, N.; CARCAMO, R.; BEACHY, R. N.; FAUQUET, C. Cassava Vein Mosaic Virus (CsVMV), type species for a new genus of plant double stranded DNA viruses. **Archives of Virology**. v. 143, p.945-962, 1998.

DEESHMA, K. P.; BHAT, A. I. Complete genome sequencing of Piper yellow mottle virus infecting black pepper, betelvine, and Indian long pepper. **Virus Genes**. v. 50, p. 172–175, 2015.

Defesa Vegetal-Biodiversidade indesejada - planta daninha de origem africana é encontrada

no Brasil. Disponível em <<http://www.defesavegetal.net/novidades/tag/Sclerocarpus-africanus>> Acesso em: 26 de julho de 2017.

DIOP, S.; GEERING A. D. W.; ALFAMA-DEPAUW, F.; MIKAEL LOAEC, F. F.; TEYCHENEY, P. Y.; MAUMUS, F. Tracheophyte genomes keep track of the deep evolution of the Caulimoviridae, doi: <https://doi.org/10.1101/158972>, 2017.

DUBERN, J. *Phytopathology*, St. Paul, v. 96, p. 25. **American Phytopathological Society**, v. 96, 1979.

DNA viruses. **Virology**, v. 344, p. 198-210, 2006.

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

EINI, O.; SATISH, C. D.; DRY, I. B.; RANGLES, J. W. Silencing Suppressor Activity of a Begomovirus DNA β Encoded Protein and Its Effect on Heterologous Helper Virus Replication. **Virus Research**. v. 167, p. 97-101. 2012

FARIA, J. C. E.; ZERBINI, F. M. Família *Geminiviridae*: Taxonomia, replicação e movimento. In: LUZ, W. C; FERNANDES, J. M; PRESTES, A. M; PICININI, E. C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v. 8, p. 27-57, 2000.

FARIA, J. C.; MAXWELL, D. P. Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus* spp. in Brazil. **Phytopathology**. v. 89, n. 3, p. 262-268, 1999.

FARIA, J. C.; VALDISSER, P. A. M. E.; NOGUEIRA, E. O. P. L.; ARAÇÃO, F. J. L. RNAi-based Bean golden mosaic virus-resistant common bean (Embrapa 5.1) shows simple inheritance for both transgene and disease resistance. **Plant Breeding**. v. 133, n. 5, p. 649-653, 2014.

FARIA, J.C.; BEZERRA, I. C.; ZERBINI, F. M.; RIBEIRO, S. G.; LIMA, M. F. Situação atual das geminiviroses no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 125-137, 2000.

FARIA, J. C.; GILBERTSON, R. L.; HANSON, R. F.; MORALES, F. J.; AHLQUIST, P.; LONILLO, A. O.; MAXWELL, D. P. Bean golden mosaic geminivirus type II isolates from the Dominican Republic and Guatemala: Nucleotide sequences, infectious

pseudorecombinants, and phylogenetic relationships. **Molecular Plant Pathology**. v. 84, n. 3, p. 321-329, 1994.

FAUQUET C.; MAYO, M.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. **Virus taxonomy. Eight Report of the International committee on Taxonomy of Viruses**. Amsterdam: Elsevier, 2005.

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

FAUQUET, C. M.; STANLEY, T. J. Revising the way we conceive and name viruses below the species level: a review of geminivirus taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. **Archives of Virology**, v. 150, p. 2151-2179, 2005.

FAUQUET, C. M.; SAWYER, S.; IDRIS, A. M.; BROWN, J. K. Sequence analysis and classification of apparent recombinant begomoviruses infecting tomato in the Nile and Mediterranean basins. **Phytopathology**. v. 95, n. 5, p. 549-555, 2005.

FERNANDES, F. R.; ALBUQUERQUE, L. C.; OLIVEIRA, C. L.; CRUZ, A. R. R.; ROCHA, W. B.; PEREIRA, T. G.; NAITO, F. Y. B.; DIAS, N. D.; NAGATA, T.; FARIA, J. C.; ZERBINI, F. M.; ARAGÃO, F. J. L.; INOUE-NAGATA, A. K. Molecular and biological characterization of a new Brazilian begomovirus, euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV), infecting *Euphorbia heterophylla* plants. **Archives of Virology**, New York, v. 156, p. 2063-2069, 2011.

FERRO, M. M. M. **Estrutura Genética de populações dos Begomovirus *Tomato mottle leaf curl virus* infectando tomate (*Solanum lycopersicum*) e *Sida mottle Alagoas virus* em *Sida* spp. no Brasil**. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) - Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas, Universidade Federal de Alagoas, 2014.

FIGUEIREDO, D.; MEISSNER FILHO, P.; SILVA NETO, S.; BRIOSO, P. Detecção e análise da variabilidade de sequências do Banana streak virus (BSV) em bananeiras no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 2, p. 118-23, 2006.

FONDONG, V. N.; PITA, J. S.; REY, M. E.; DE KOCHKO, A.; BEACHY, R. N.; FAUQUET, C. M. Evidence of synergism between African cassava mosaic virus and a new

double-recombinant geminivirus infecting cassava in Cameroon. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 287-297, 2000.

FONTENELE, R. S.; POPPIEL, R.; MATOS, V. O. R. L.; COSTA, F.; FARIA, J. C.; RIBEIRO, S. G. First Report of Macrottilium yellow spot virus in *Desmodium glabrum* in Brazil. **Plant Disease**. v. 100, n. 3, p. 657, 2016.

FONTES, E. P. B.; GLADFELTER, H. G.; SCHAFFER, R. L.; PETTY, I. T.; HANLEY-BOWDOIN, L. Geminivirus replication origins have a modular organization. **The Plant Cell**, New York, v. 6, n.3, p. 405-416, 1994b.

FONTES, E. P.; LUCKOW, V. A.; HANLEY-BOWDOIN, L. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. **The Plant Cell**, New York, v. 4, n. 5, p. 597-608, 1992.

FRÁNOVÁ, J.; JAKEŠOVÁ, H. First report of bacilliform badnavirus-like virus particles in red clover. **Journal of Phytopathology**. v. 160, n. 10, p. 588–590. 2012

FROISSART, R.; ROZE, D.; UZEST, M.; GALIBERT, L.; BLANC, S.; MICHALAKIS, Y. Recombination every day: abundant recombination in a virus during a single multi-cellular host infection. **PLOS Biology**, v. 3, n. 3, p. 89, 2005.

FUENTES, A. C.; N., RUIZ, Y. C.; SANCHEZ, Y.; OCHAGAVIA, M. E.; SEGUIN, J.; MALPICA-LOPEZ, N.; HOHN, T.; LECCA, M.R.; PEREZ, R.; DORESTE, V.; REHRAUER, H.; FARINELLI, L.; PUJOL, M.; POOGIN, M. M. Field trial and molecular characterization of RNAi-transgenic tomato plants that exhibit resistance to tomato yellow leaf curl geminivirus. **Molecular Plant-Microbe Interact**. v. 29, p. 197-209. 2016.

FÜTTERER, J.; ROTHNIE, H. M.; HOHN, T.; POTRYKUS, I. Rice tungro bacilliform virus open read frame II and III are translated from polycistronic pre genomic RNA by leaky scanning. **Journal of General Virology**. v. 71, p. 7984-9, 1997.

GAYRAL, P.; ISKRA-CARUANA, M. Phylogeny of Banana Streak Virus Reveals Recent and Repetitive Endogenization in the Genome of Its Banana Host (*Musa* sp.). **Journal of Molecular Evolution**. v. 69, p. 65-80, 2009.

GEERING A. D. W.; HULL R. **Family Caulimoviridae**. In: KING, A. M. Q.; ADAMS, M.

J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. (Eds.). *Virus Taxonomy*. 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London UK: Elsevier Academic Press, pp.429-443, 2012.

GEERING, A. D. W.; MCMICHAEL, L. A.; DIETZGEN, R. G.; THOMAS, J. E. Genetic diversity among Banana streak virus isolates from Australia. **Phytopathology**. v. 90, p. 921-927, 2000.

GILBERTSON, R. L.; BATUMAN, O.; WEBSTER, C. G.; ADKINS, S. Role of the Insect Supervectors *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis* in the Emergence and Global Spread of Plant Viruses. **Annual Review of Virology**. v. 2, n. 1, p. 67-93, 2015.

GILBERTSON, R. L.; FARIA, J. C.; AHLQUIST, P.; MAXWELL, D. P. Genetic diversity in geminiviruses causing bean golden mosaic disease: the nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of a Brazilian isolate of bean golden mosaic geminivirus. **Phytopathology**. v. 83, p. 709-715, 1993a.

GILBERTSON, R.L. et al. Análise molecular do movimento de vírus nas plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 1, 1993b.

GOPAL, P.; KUMA, P. P.; SINILAL, B.; JOSE, J.; YADUNANDAM, A. K.; USHA, R. Differential roles of C4 and bC1 in mediating suppression of post-transcriptional gene silencing: evidence for transactivation by the C2 of *Bhendi yellow vein mosaic virus*, a monopartite begomovirus. **Virus Research**. v. 123, p.9–18. 2007

GREBER, R. S. A mosaic disease of *Centrosema pubescens* Benth. caused by passionfruit woodiness virus. **Queensland Journal of Agriculture and Animal Sciences**. v. 28, n. 2-3, p. 115-119, 1971.

GUIMARÃES, K. M.; SILVA, S. J. C.; MELO, A. M.; RAMOS-SOBRINHO, R.; LIMA, J. S.; ZERBINI, F. M.; ASSUNÇÃO, I. P.; LIMA, G. S. A. Genetic variability of badnaviruses infecting yam (*Dioscorea* spp.) in northeastern Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 40, p. 111-118, 2015.

GUTIERREZ, C. Geminivirus DNA replication. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, 1999.

GyDB - Gypse Database 2.0. Disponível em http://gydb.org/index.php/Main_Page
Acessado em 28 de Março de 2017.

HAGEN, L. S.; JAQUEMOND, M.; LEPINGLE, A.; LOT, H.; TEPFER, M. Nucleotide sequence and genomic organization of Cacao swollen shoot virus. **Virology** 196:619-28, 1993.

HAREESH, P. S; BHAT, A. I. Seed transmission of Piper yellow mottle virus in black pepper (*Piper nigrum* L). **Journal of Plantation Crops**. v. 38, n. 1, p. 62-5. 2010.

HARPER, G.; DAHAL, G.; THOTTAPPILLY, G.; HULL, R. Detection of episomal Banana Streak Badnavirus by IC-PCR. **Journal of Virological Methods**, v.79, n. 1, p.1-8, 1999.

HARPER, G.; HART, D.; MOULT, S.; HULL, R.; GEERING, A.; THOMAS, J. The diversity of Banana streak virus isolates in Uganda. **Archives of Virology**, v. 150, p. 2407-2420, 2005.

HARPER, G.; HULL, R. Cloning and sequence analysis of Banana streak virus DNA. **Virus Genes**. v. 17, p. 271-8. 1998.

HARPER, G.; HULL, R.; LOCKHART, B.; OLSZEWSKI, N. Viral sequences integrated into plant genomes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p.119-136, 2002.

HEARON, S. S.; LOCKE, J. C. Graft, pollen and seed transmission of an agent associated with top spotting in *Kalanchoe blossfeldiana*. **Phytopathology**. v. 74, p. 347-50. 1984.

HEHNLE, S.; WEGE, C.; JESKE, H. Interaction of DNA with the movement proteins of geminiviruses revisited. **Journal of Virology**. v. 78, p. 7698-706, 2004.

HEYRAUD-NITSCHKE, F.; SHUMACHER, S.; LAUFUS, J.; SCHAEFER, S.; SCHELL, J.; GRONENBORN, B. Determination of the origin cleavage and joining domain of geminivirus Rep proteins. **Nucleic Acids Research**. v. 23, p. 910– 916, 1995.

HÖFER, P.; ENGEL, M.; JESKE, H.; FRISCHMUTH, T. Nucleotide sequence of a new bipartite geminivirus isolated from the common weed *Sida rhombifolia* in Costa Rica. **Virology**. v. 78, p. 1785-1790, 1997b.

HUSON, D. H.; BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Molecular Biology and Evolution**. v. 23, p. 254–267, 2006.

IDRIS, A. M.; SHAFIQ SHAHID, M; BRIDDON, R.W; KHAN, A.J; ZHU, K; BROWN, J.K; INOUE- NAGATA, A.K. An unusual alphasatellite associated with monopartite begomoviruses attenuates symptoms and reduces betasatellite accumulation. **Journal of General Virology**, v. 92, n. 3, p. 706-717, 2011.

INOUE-NAGATA, A. K.; ALBUQUERQUE, L. C.; ROCHA, W. B.; NAGATA, T. A simple method for cloning of the complete begomovirus using the bacteriophage phi 29 DNA polymerase. **Journal of Virological Methods**. v. 116, n. 2, p. 209-211, 2004.

INOUE-NAGATA, A. K.; ÁVILA, A. C.; VILLAS BÔAS, G. L. Os geminivírus em sistema de produção integrada de tomate indústria. **Circular Técnica da Embrapa Hortaliças**. Brasília-DF, p.1, 2009.

INOUE-NAGATA, A. K.; LIMA, M. F.; GILBERTSON, R. L. A review of geminivirus diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. **Horticultura Brasileira**. v. 34, n. 1, p. 8-18, 2016.

INOUE-NAGATA, A. K.; MARTIN, D. P.; BOITEUX, L. S.; GIORDANO, L. B.; BEZERRA, I. C.; ÁVILA, A. C. New species emergence via recombination among isolates of the Brazilian tomato infecting *Begomovirus* complex. **Pesquisa agropecuária brasileira**. v. 41, n. 8, p. 1329-1332, 2006.

JACQUOT, E.; HAGEN, L. S.; JACQUEMOND, M.; YOT, P. The open reading frame 2 product of cacao swollen shoot badnavirus is a nucleic acid-binding protein. **Virology**. v. 225, p. 191-195, 1996.

JESKE, H. **Geminiviruses**. In: TT Viruses. Springer: Berlin Heidelberg, pp. 185-226, 2009.

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

JORDÃO, L. J. **Posicionamento taxonômico e efeito da recombinação entre isolados do gênero Badnavírus**. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas), Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo-AL, 2015.

LAUFS, J.; TRAUT, W.; HEYRAUD, F.; MATZEIT, V.; ROGER, S. G.; SCHELL, J.; GRONENBORN, B. *In vitro* cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus, **PNAS**. v. 92, n. 9, p. 3879-3883, 1995.

LAZAROWITZ, S.G.; SHEPHERD, R. J. Geminiviruses: genome structure and gene function. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v. 11, p. 327-349, 1992b.

LIMA, M.F.; BEZERRA, I.C.; RIBEIRO, S.G.; AVILA, A.C. Distribuição de geminivírus nas culturas do tomate e pimentão em doze municípios do Submédio do Vale São Francisco. **Fitopatologia Brasileira** 26: 81-85, 2001.

LIMA, A. T. M.; RAMOS-SOBRINHO, R.; GONZÁLEZ-AGUILERA, J.; ROCHA, C. S.; SILVA, S. J.; XAVIER, C. A.; SILVA, F. N.; DUFFY, S.; ZERBINI, F. Synonymous site variation due to recombination explains higher genetic variability in begomovirus populations infecting non-cultivated hosts. **Journal of General Virology**. v. 94, p. 418-431, 2013.

LLORENS, C.; MUNOZ-POMER, A.; BERNARD, L.; BOTELLA, H.; MOYA, A. Network dynamics of eukaryotic LTR retroelements beyond phylogenetic trees. **Biology Direct**, v. 4, p. 41, 2009.

LOCKHART, B. E. L.; AUTREY, L. J. C. Occurrence in sugarcane of a bacilliform virus related serologically to banana streak virus. **Plant Disease** v. 72, p.230-233, 1988.

LOCKHART, B. E. L.; OLSZEWSKI, N.E. **Serological and genomic heterogeneity of banana streak badnavirus: implications for virus detection in Musa germplasm, Breeding Banana and Plantain for Resistance to Diseases and Pests**. CIRAD/INIBAP, p. 105-113, 1993.

LOCKART, B. E. L. et al. Identification of Piper yellow mottle virus, a mealybug transmitted badnavirus infecting Piper spp. **Southeast Asia. European of Plant Pathology**, v. 103, p.303-311, 1997.

- LODHI, M. A.; YE, G. N.; WEEDEN, N. F.; REISCH, B. I. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. **Plant Molecular Biology Reporter**. v. 12, n. 1, p. 6-13, 1994.
- MANSOOR, S.; BRIDDON, R. W.; ZAFAR, Y.; STANLEY, J. Geminivirus disease complexes: an emerging threat. **Trends in Plant Science**, v. 8, n. 3, p. 128-134, 2003.
- MARTIN D, P.; MURRELL, B.; GOLDEN, M.; KHOOSAL, A.; MUHIRE, B. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. **Virus Evolution**. v. 1, n. 1, p. 1-5, 2015.
- MARTIN, D. P.; BIAGINI, P.; LEFEUVRE, P.; GOLDEN, M.; ROUMAGNAC, P.; VARSANI, A. Recombination in Eukaryotic Single Stranded DNA Viruses. **Viruses**. v. 3, n. 9, p. 1699-1738, 2011.
- MARTIN, D.; RYBICKI, E. R. D. P: detection of recombination amongst aligned sequences. **Bioinformatics**. v. 16, p. 562-563, 2000.
- MEDBERRY, S. L.; LOCKHART, B. E. L.; OLSZEWSKI, N. E. Properties of Commelina yellow mottle virus complete DNA sequence, genomic discontinuities and transcript suggest that it is a pararetrovirus. **Nucleic Acids Research**. v. 18, n. 18, p.5505-5513, 1990.
- MELCHER, U.; MUTHUKUMAR, V.; WILEY, G. B.; MIN, B. E.; PALMER, M. W.; VERCHOT-LUBICZ, J.; ALI, A.; NELSON, R. S.; ROE, B. A.; THAPA, V.; PIERCE, M. L. Evidence for novel viruses by analysis of nucleic acids in virus-like particle fractions from *Ambrosia psilostachya*. **Journal of Virological Methods**. v. 152, n. 1-2, p. 49-55, 2008.
- MIGLIORI, A. ; LASTRA, R. Study of viruses on *Commelina diffusa* Burm. in Guadeloupe. **Annales de Phytopathologie**. v. 10, 4, p, 467-77, 1978.
- MILLER, M. A. et al. The CIPRES Portals. **Cipres**. 2010. Disponível em: < http://www.phylo.org/sub_sections/portal > Acesso em: 28 de setembro de 2017.
- MORALES, F. J. History and current distribution of begomoviruses in Latin America. **Advances in Virus Research**. v. 67, 127-162, 2006.

- MORALES, F.J.; ANDERSON, P.K. The emergence and dissemination of whitefly transmitted geminiviruses in Latin America. **Archives of Virology**, New York, v. 146, n. 3, p. 415-441, 2001.
- MUHIRE, B.; MARTIN, D. P.; BROWN, J. K.; NAVAS-CASTILO, J.; MARIONES, E.; ZERBINI, F. M.; RIBERA-BUSTAMANTE, R.; MALATHI, V. G.; BRIDDON, R. W.; VARSANI, A. A genome-wide pairwise-identity-based proposal for the classification of viruses in the genus Mastrevirus (family Geminiviridae). **Archives of Virology**, v. 158, p. 1411–1424, 2013.
- MULLER, E.; DUPUV, V.; BLONDIN, L.; BAUFFE, F.; DAUGROIS, J. H.; NATHALIE, L.; ISKRA-CARAUANA, M. L. High molecular variability of sugarcane bacilliform viruses in Guadeloupe implying the existence of at least three new species. **Virus Research**, v. 160, n. 1-2, p. 414–419, 2011.
- MUSHEGIAN, A. R.; ELENA, S. F. Evolution of plant virus movement proteins from the 30K superfamily and of their homologs integrated in plant genomes. **Virology**, v. 476, p. 304-315, 2015.
- NAVAS-CASTILLO, J.; FIALLO-OLIVÉ, E.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, p. 219-248, 2011.
- NDOWORA T. D.; G.; LAFLEUR, D.; HAPPER, G.; HULL, R.; OLSZEWSKI, N. E.; LOCKHART, B. E. L. Evidence that badnavirus infection in *Musa* can originate from integrated pararetroviral sequences. **Virology**, v. 255, n. 2, p.214-220, 1999.
- NELSON, R. S.; VAN BEL, A. J. E. The mystery of virus trafficking into, through and out of vascular tissue. **Progress in Botany**, v. 59, p. 477–533, 1998.
- OMURA, T. et al. Improved purification procedure and RNA segments of rice ragged stunt virus. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v. 49, p. 670-675, 1983.
- OROZCO, B. M.; HANLEY-BOWDOIN, L. A. DNA structure is required for geminivirus replication origin function. **Virology Journal**, London, v. 70, n. 1, p. 148-158, 1996.

- PADIDAM, M.; SAWYER, S.; FAUQUET, C. M. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. **Virology**, New York. v. 265, n. 2, p. 218-225, 1999.
- PAPROTKA, T.; METZLER, V.; JESKE, H. The first DNA 1-like alpha satellites in association with New World begomoviruses in natural infections. **Virology**, New York, v. 404, p. 148-157, 2010.
- PATIL, B. L.; FAUQUET, C. M. Cassava mosaic geminiviruses: actual knowledge and perspectives. **Molecular Plant Pathology**. v. 10, n. 5, p. 685-701, 2009.
- PENTEADO, M. I. O.; MIERA, L. E. S.; VEGA, M. P. Genetic resources of *Centrosema* spp: genetic changes associated to the handling of an active collection. **Genetic Resources and Crop Evolution**. v. 43, p. 85-90, 1996.
- PICÓ, B.; DIAZ, M. J.; NUEZ, F. Viral disease causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The Tomato yellow leaf curl virus – a review. **Scientia Horticulturae**. v. 67, p. 151-196, 1996.
- POOGGIN, M. et al. A short open reading frame terminating in front of a stable hairpin is the conserved feature in pregenomic RNA leaders of plant pararetroviruses. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 2217-28, 1999.
- POSADA, D.; BUCKLEY, T. Model Selection and Model Averaging in Phylogenetics: Advantages of Akaike Information Criterion and Bayesian Approaches Over Likelihood Ratio Tests. **Systematic Biology**. v. 53, p. 793–808, 2004.
- PHILLIPS, S. et al. The Partial Characterization of a Badnavirus Infecting the Greater Asiatic or Water Yam (*Dioscorea alata*). **Journal of Phytopathology**. v. 147, p. 265-269, 1999.
- PRINS, M.; LAIMER, M.; NORIS, E.; SCHUBERT, J.; WASSENNEGGER, M.; TEPFER, M. Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. **Molecular Plant Pathology**. v. 9, n. 1, p. 73-83. 2008
- PURCIFULL, D. E; EDWARDSIN, J. R. **Potexviruses**. In: KURSTAK, E. (ed.). Handbook of plant virus infections comparative diagnosis. Elsevier and North Holland Biomedical Press: Amsterdam Netherdands. pp. 627-693, 1981.
- QUAINOO, A. K.; WETTEN, A. C.; ALLAINGUILLAUME, J. Transmission of Cacao

swollen shoot virus by seeds. **Journal of Virology Methods**. v. 150, n. 1-2, p. 45-9. 2008.

QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da caatinga**. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009.

RAMOS-SOBRINHO, R.; XAVIER, C. A.; PEREIRA, H. M.; LIMA, G. S. A.; ASSUNÇÃO, I. P.; MIZUBITI, E. S.; DUFFY, S.; ZERBINI, F. M. Contrasting genetic structure between two begomoviruses infecting the same leguminous Hosts. **Journal of General Virology**, v. 95, p. 2540-2552, 2014.

RIVAS, E. B.; DUARTE, L. M.; ALEXANDRE, A. V.; FLORA, M. C.; HARAKAVA, F. R.; CHAGAS, C. M. A new Badnavirus species detected in Bougainvillea in Brazil. **Journal of General Plant Pathology**. v. 71, n. 6, p. 438-440, 2005.

ROMAY, G.; CHIRINOS, D.; GERAUD-POUEY, F.; DESBIEZ, C. Association of an atypical alphasatellite with a bipartite New World begomovirus. **Archives of Virology**, New York. v. 155, n. 11, p. 1843-1847, 2010.

RONQUIST, F. et al. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice across a Large Model Space. **Systematic Biology Advance Access**, v. 61, p. 539-42, 2012.

SAEED, M.; BEHJATNIA, S. A. A.; MANSOOR, S.; ZAFAR, Y.; HASNAIN, S; REZAIANAN, M. A. A single complementary-sense transcript of a geminiviral DNA b satellite is determinant of pathogenicity, **Mol Plant Microbe Interact**. v. 18, n. 1, p. 7-14 2005.

SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; MARTÍNEZ-AYALA, A.; MÁRQUEZ-MARTÍN, B.; ARAGÓN-CABALLERO, L.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E. Fulfilling Koch's postulates confirms the monopartite nature of tomato leaf deformation virus: A begomovirus native to the New World. **Virus Research**. v. 173, n. 2, p. 286-293, 2013.

SANTOS, J. M. S. **Incidência e caracterização de Badnavirus no banco de germoplasma de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) na Serra do Ouro, Murici/AL**. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas), Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo-AL, 2013.

SCHULTZE-KRAFT, R.; CLEMENTS, R. J. *Centrosema* : Biology, agronomy, and utilization. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. 667 p. (CIAT publication no. 92), 1990.

SHARMA, S. K.; VIGNESH, K. P.; GEETANJALI, A. D.; PUN, K. B.; BARANWAL, V. K. Subpopulation level variation of banana streak viruses in India and common evolution of banana and sugarcane badnaviruses. **Virus Genes**. v. 50, n. 3, p. 450-65, 2015.

SILVA, J. M.; JORDÃO, L. J.; RAMOS-SOBRINHO, R.; LIMA, J. S.; ASSUNÇÃO, I. P.; CRUZ, M. M.; LIMA, G. S. A. Incidence and species diversity of badnaviruses infecting sugarcane from a germplasm collection in Brazil. **Tropical Plant Pathology**. v. 40, n. 3, p. 212-217, 2015.

SILVA, S. J. C. Diversidade e estrutura genética de Begomovírus que infectam plantas daninhas no nordeste brasileiro. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 2011.

SILVA, S. J. C.; CASTILLO-URQUIZA, G. P.; HORA-JUNIOR, B. T.; ASSUNÇÃO, I. P.; LIMA, G. S.; PIO-RIBEIRO, G.; MIZUBUTI, E. S.; ZERBINI, F. M. High genetic variability and recombination in a begomovirus population infecting the ubiquitous weed *Cleome affinis* in northeastern Brazil. **Archives of Virology**, New York. v. 156, n. 12, p. 2205–2213, 2011.

SILVA, S. J. C.; CASTILLO-URQUIZA, G. P.; HORA-JUNIOR, B. T.; ASSUNÇÃO, I. P.; LIMA, G. S. A.; PIO-RIBEIRO, G.; MIZUBUTI, E. S.; ZERBINI, F. M. Species diversity, phylogeny and genetic variability of begomovirus populations infecting leguminous weeds in northeastern Brazil. **Plant Pathology**. v. 61, n. 3, p. 457–467, 2012.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para a identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

STAGINNUS, C.; RICHERT-PÖGGELER, K. R. Endogenous pararetroviruses: two faced travelers in the plant genome. **Trends in Plant Sciences**. v. 11, n. 10, p. 485-491, 2006.

STANLEY, J. Analysis of *African cassava mosaic virus* recombinants suggests that strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. **Virology**. v. 206, n. 1, p. 707-712, 1995

STANLEY, J. et al. **Family *Geminiviridae***. In: ANDREW, M. Q.; Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier: London, pp. 301-326, 2005.

STENGER, D. C.; REVINGTON, G. N.; STEVENSON, M. C.; BISARO, D. M. Replicational release of geminivirus genomes from tandemly repeated copies evidence for rolling-circle replication of a plant viral-DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 12, p. 8029-8033, 1991.

SUNTER, G.; BISARO, D. M. Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. **Plant and Cell**, v. 4, n. 10, p. 1321-31, 1992.

SYLLER, J. Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. **Molecular Plant Pathology**. v. 13, n. 2, p. 204-216, 2012.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**. v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TEYCHENEY, P. Y.; GEERING, A. D. W. **Recent Advances in Plant Virology**. In: CARANTA C.; ARANDA M. A.; TEPFER M.; LÓPEZ-MOYA J. J. Caister: Academic Press, pp. 343–362, 2011.

The Field Museum – Neotropical Herbarium Specimens. Disponível em <<http://fm1.fieldmuseum.org/vrrc/index.php>> Acesso em: 13 de julho de 2017

TIMMERMANS, M. C. P.; DAS, O. P.; MESSING, J. Geminiviruses and their uses as extrachromosomal replicons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 45, p. 79-112, 1994.

TZAFRIR, I.; AVALA-NAVARRETE, L.; LOCKHART, B. E.; OLSZEWSKI, N. E. The N-terminal portion of the 216-kDa polyprotein of Commelina yellow mottle badnavirus is required for virus movement but not for replication. **Virology**, v. 232, n. 2, p. 359-68, 1997.

VAN VELSEN, R. J; CROWLEY, N. C. Centrosema mosaic virus: A plant virus disease transmitted by both aphids and plant bugs. **Nature**, London. v. 189, 858, 1961.

VANITHARANI, R.; CHELLAPPAN, P.; PITA, J. S; FAUQUET, C. M. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. **Journao of Virology**. v. 78, n. 17, p. 9487–949, 2004.

VARSANI, A.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E.; HERNÁMDEZ-ZEPEDA, C.; IDRIS, A.; BROWN, J. K.; ZERBINI, F. M.; MARTIN, D. P. Establishment of three new genera in the family Geminiviridae: Becurtovirus, Eragrovirus and Turncurtovirus. **Archives of Virology**, Vienna. v. 159, p. 2193-2203, 2014.

VARSANI, A; KRUPOVIC, M. Sequence-based taxonomic framework for the classification of uncultured single-stranded DNA viruses of the family Genomoviridae. **Virus Evolution**. v. 2,3, n. 2, 2017, doi: 10.1093/ve/vew037.

YANG, I. C.; HAFNER, G.J.; DALE, J.L.; HARDING, R. M. Genomic characterization of taro bacilliform virus. **Archives of Virology**, v. 148, p. 937-949, 2003.

ZERBINI, F. M.; BRIDDON, R.W.; MARTIN, D.P.; MARIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J.; RIVERA-BISTAMANTE, R.; ROUMAGNAC, P.; VARSANI, A. ICVT Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae. **Journal of General Virology**. v. 98, n. 2, p. 131-133, 2017.

ZERBINI, F. M.; ZAMBOLIM, E.M.; CARRIJO, I.V.; GILBERTSON, R.L. A new bipartite geminivirus infecting tomatoes in Minas Gerais, Brazil. **Phytopathology**. v. 86, n. 11, p. 51-52, 1996.

ZERBINI, F.M.; CARVALHO, M.G.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. **Introdução à Virologia Vegetal**. Viçosa: Ed. UFV, 145p, 2002.

ZHANG, X. S.; HOLT, J.; COLVIN, J. Synergism between plant viruses: a mathematical analysis of the epidemiological implications. **Plant Pathology**. v. 50, n. 6, p. 732–46, 2001

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