



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CAMPUS DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE PLANTAS**



IARA MARIA DOS SANTOS COSTA LUNA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE BEGOMOVÍRUS ASSOCIADOS A FAVA
CULTIVADAS EM SISTEMA DE PRODUÇÃO FAMILIAR EM ALAGOAS**

Rio Largo - AL
2023

IARA MARIA DOS SANTOS COSTA LUNA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE BEGOMOVÍRUS ASSOCIADOS A FAVA
CULTIVADAS EM SISTEMA DE PRODUÇÃO FAMILIAR EM ALAGOAS**

Dissertação apresentado à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas da Universidade Federal de Alagoas como requisito para o título de Mestre(a) em Proteção de Plantas.

Orientadora: Prof. Dra. Sarah Jacqueline Cavalcanti da Silva

Rio Largo – AL

2023

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Campus de Engenharias e Ciências Agrárias
Bibliotecária Responsável: Myrtes Vieira do Nascimento

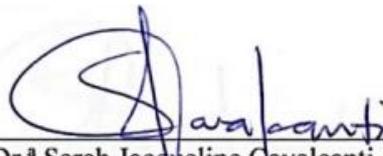
L961d	<p>Luna, Iara Maria dos Santos Costa Diversidade genética de Bergomovírus associados a fava cultivadas em sistemas de produção familiar em Alagoas. / Iara Maria dos Santos Costa Luna – 2023. 47 f.; il.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) - Universidade Federal de Alagoas, Campus de Engenharias e Ciências Agrárias. Rio Largo, 2023.</p> <p>Orientação: Dr^a. Sarah Jacqueline Cavalcante da Silva</p> <p>Inclui bibliografia</p> <p>1. <i>Geminiviridae</i>. 2. Variedade genética. 3. <i>Phaseolus lunatus</i>.</p> <p>I. Título</p> <p style="text-align: right;">CDU: 57</p>
-------	---

Folha de Aprovação

IARA MARIA DOS SANTOS COSTA LUNA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE BEGOMOVÍRUS ASSOCIADOS A FAVA
CULTIVADAS EM SISTEMA DE PRODUÇÃO FAMILIAR EM ALAGOAS**

Dissertação submetida à banca examinadora do Programa de Pós-graduação em Proteção de Plantas com Campus de Engenharias e Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Alagoas, e aprovada em 16 de fevereiro de 2023.



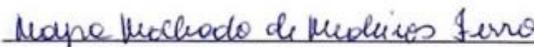
Prof.^a Dr.^a Sarah Jacqueline Cavalcanti da Silva

(Orientadora)

Banca examinadora:



Prof. Dr. Roberto Ramos Sobrinho
Membro Titular



Dr.^a Mayra Machado de Medeiros Ferro
Membro Titular

AGRADECIMENTOS

Um trabalho de mestrado inclui diversos esforços e processos, como todo trabalho intelectual, esse inclui a maturação de um longo processo de conhecimento. Nele, além de nossa própria produção reúne também o empenho de várias pessoas, indispensáveis para encontrar o melhor rumo em cada momento da caminhada. Esta dissertação de mestrado é o resultado de muitas horas de trabalho e é importante expressar os meus sinceros agradecimentos a algumas pessoas que me ajudaram em mais uma etapa da minha vida.

Na impossibilidade de nomear cada pessoa, reúno aqui alguns nomes e através destes quero expressar minha gratidão a todos aqueles que se ligaram a tarefa da pesquisa e desta redação.

A Universidade Federal de Alagoas que, como instituição pública, resistiu a tantos desafios em tempos difíceis e se manteve ativa no seu compromisso com a produção da pesquisa e da inovação. De modo todo especial a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas – FAPEAL, da qual sou bolsista desde a graduação e que financiou este projeto de mestrado através de uma bolsa de pesquisa.

Minha gratidão especial a minha orientadora Dra. Sarah Jacqueline, que foi o primeiro contato que tive com o PPGPP e com a minha pesquisa, sua dedicação, cuidado e carisma me conquistaram e me fizeram ter certeza de que havia tomado a decisão certa ao escolher este programa para a pós-graduação. Obrigada por toda a confiança, paciência e disponibilidade.

A professora Dra. Mayra Ferro, que foi a alma desta pesquisa. Muito obrigada por todo tempo investido, paciência, carinho e amizade. Sua doçura e alegria contagiavam a todos e faz com que os dias sejam mais leves. Obrigada por ter sido minha guia nesse último ano, por ter me trazido calma no meio dessa tempestade chamada Mestrado. Sou eternamente grata a Deus por Ele ter te colocado no meu caminho, eu não teria conseguido sem você.

Ao professor Dr. Mariote Netto que é a pessoa mais agridoce que eu conheço. Seu humor ácido e seu riso fácil alegam a rotina que tantas vezes é pesada e tão cansativa. Suas críticas são lâminas afiadas, mas que cortam de forma precisa e necessária. Obrigada, por todo o ensinamento e conhecimento passado e por nunca me negar ajuda, mesmo que eu nunca tenha sido sua responsabilidade.

Ao professor Dr. Roberto Ramos Sobrinho por toda contribuição dada durante meu trabalho, por sua disponibilidade e pelos conselhos pertinentes dados sempre que o procurei.

Aos meus amigos queridos, Géssica Trindade, Jéssica Mariana, José Tomaz, Mayara Oliveira, Yolanda Melo, Maria Isabel e Thaynnara Lira por todas as risadas, momentos de descontração e por todos os sábios conselhos sempre que precisei.

A Shara, Germano, Caio, Paulo, Marcus e Gabriela, por me auxiliarem nos diversos processos que foram necessários para a construção desta pesquisa.

A todos os membros do Laboratório de Fitopatologia Molecular e Virologia Vegetal, cujos esforços e auxílio tornaram possível a concretização desde projeto, em especial a Lauristela Hermogenes, por toda ajuda tanto no preparo de todas as soluções necessárias para esta pesquisa quanto nas aulas que precisei ministrar durante meu estágio.

A Matheus, meu marido, pelo amor, partilha, companheirismo e apoio incondicional. Obrigada por ter embarcado comigo nesse sonho, por sempre me dirigir palavras doces e de extrema confiança em momentos em que eu duvidava da minha própria capacidade. Obrigada por

confiar mais em mim do que eu mesma, isso sempre me ajudou a dar mais um passo por mais que eu me sentisse esgotada.

A minha prima/irmã, Vitória Afonso, que me acompanha e incentiva desde nossa infância, obrigada por sempre vibrar e comemorar cada uma das minhas conquistas como se elas fossem suas, por ouvir meus desabafos e sempre me direcionar palavras de conforto.

Ao meu tio José Manoel, que me criou como filha, me guiou e investiu nos meus sonhos. Obrigada por todo incentivo, amor, carinho e palavras sábias, por sempre me ouvir com atenção e por sempre saber as palavras certas a serem ditas. Não tenho dúvidas de que boa parte do meu sucesso pessoal e profissional é fruto do seu amor e dedicação.

A minha mãe e minha irmã, Bernadete e Sara, pelo profundo apoio, me estimulando e me dando força nos momentos mais difíceis. Obrigada por desejarem sempre o melhor para mim, pelo esforço que fizeram para que eu pudesse superar cada obstáculo em meu caminho e chegar aqui e, principalmente, pelo amor imenso que vocês têm por mim.

A vocês, minha família, sou eternamente grata por tudo que sou, por tudo que consegui conquistar e pela felicidade que tenho.

Feliz o homem que suportar a provação, porque provado, receberá a coroa da vida que Deus prometeu a quem o ama.

Tiago 1, 12

RESUMO

Os feijões são alimento básico de fundamental importância para segurança alimentar e nutricional como fonte de proteínas, além de renda para produtores rurais de Alagoas. Praticamente toda a produção de feijões do estado é proveniente da agricultura familiar, que os utilizam para consumo próprio e comercialização do excedente, suprindo assim as demandas do mercado interno. A produção é baseada no cultivo do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) e feijão-fava (*P. lunatus*), e em menor extensão, feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) e feijão-guandú (*Cajanus cajan*). Infelizmente, a produtividade dessas culturas é considerada baixa, devido principalmente a ocorrência de problemas fitossanitários como begomoviroses (gênero *Begomovirus*, família *Geminiviridae*), e a baixa tecnologia aplicada nas lavouras. Os begomovírus têm limitado a produção e reduzido a qualidade dos grãos em feijoeiros cultivados em todas as áreas do Brasil, com as espécies *Bean golden mosaic virus* e *Macroptilium yellow spot virus* sendo as de maior importância econômica para leguminosas cultivadas no país. Essas espécies ocorrem em Alagoas desde 2005 nas culturas de feijão e fava, e plantas não cultivadas como *Macroptilium* spp., sendo bean golden mosaic virus (BGMV) o vírus prevalente. Nesse contexto, o objetivo dessa pesquisa é determinar a diversidade genética de begomovírus associados a *P. lunatus* em sistemas de produção familiar em Alagoas. Amostras foliares de feijão-fava foram coletadas em diferentes áreas de cultivo familiar do estado de Alagoas. O DNA total de cada amostra foi extraído e utilizado, inicialmente, como molde para detecção de begomovírus, utilizando primers degenerados. Posteriormente, foi realizada a detecção dos componentes genômicos DNA-A e DNA-B de bean golden mosaic virus (BGMV) e MaYSV, utilizando primers espécie-específicos. Amostras que testaram negativa para os begomovírus BGMV e MaYSV tiveram os seus componentes genômicos clonados e sequenciados. BGMV foi a espécie predominantemente encontrada em todas as áreas de coleta. Já MaYSV foi encontrada em menor frequência, e quase sempre em infecção mista com BGMV.

Palavras-chave: *Geminiviridae*, variabilidade genética, *Phaseolus lunatus*

ABSTRACT

Beans are a basic food of fundamental importance for food and nutritional security as a source of protein, as well as income for rural producers in Alagoas. Practically all the production of beans in the state comes from family farming, which uses them for their own consumption and commercialization of the surplus, thus meeting the demands of the domestic market. Production is based on the cultivation of bean (*Phaseolus vulgaris*) and lima-bean (*P. lunatus*), and to a lesser extent, cowpea (*Vigna unguiculata*) and pigeonpea (*Cajanus cajan*). Unfortunately, the productivity of these crops is considered low, mainly due to the occurrence of phytosanitary problems such as begomoviruses (genus *Begomovirus*, family *Geminiviridae*), and the low technology applied to crops. Begomoviruses have limited production and reduced grain quality in bean crops grown in all areas of Brazil, with *Bean golden mosaic virus* and *Macropodium yellow spot virus* species being the most economically important for legumes grown in the country. These species occur in Alagoas since 2005 in bean and lima bean crops, and non-cultivated plants such as *Macropodium* spp., with bean golden mosaic virus (BGMV) being the prevalent virus. In this context, the objective of this research is to determine the genetic diversity of begomoviruses associated with *P. lunatus* in family production systems in Alagoas. Leaf samples of lima bean were collected in different areas of family cultivation in the state of Alagoas. The total DNA of each sample was extracted and used, initially, as a template for detection of begomoviruses, using degenerate primers. Subsequently, detection of the genomic components DNA-A and DNA-B of bean golden mosaic virus (BGMV) and MaYSV was carried out using species-specific primers. Samples that tested negative for BGMV and MaYSV begomoviruses had their genomic components cloned and sequenced. BGMV was the predominant species found in all collection areas. MaYSV was found less frequently, and almost always in mixed infection with BGMV.

Keywords: *Geminiviridae*, Genetic Variability, *Phaseolus lunatus*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers utilizados para detecção dos componentes genômicos (DNA-A e DNA-B) das espécies BGMV e MaYSV via PCR.....27

Tabela 2. Amostras de *Phaseolus lunatus* (feijão-fava) coletadas no Estado de Alagoas. A detecção dos begomovírus BGMV e MaYSV foi realizada via PCR utilizando primers degenerados e espécie-específicos.....29

Anexos

Tabela suplementar 1. Amostras coletadas no estudo e detecção dos componentes genômicos DNA-A e DNA-B via PCR utilizando primers degenerados e espécie específicos.....36

Tabela suplementar 2. Eventos de recombinação detectados na amostra FPI 39 baseados na sequência completa de DNA-B.....41

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1. Organização genômica dos begomovirus19

Material e Métodos

Figura 2. Municípios do Estado de Alagoas em que foram realizadas as coletas25

Resultados

Figura 3. Amostras com sintomas de mosaico encontradas no campo.....29

Figura 4. Distribuição geográfica das espécies prevalentes em cada município em que foi realizada a coleta..... 30

Figura 5. Matriz de identidade de sequências do DNA-B do isolado FPI39 e demais begomovírus que infectam *Phaseolus* spp.....31

Figura 6. Árvore filogenética de inferência bayesiana baseada na sequência completa do isolado FPI39 e outros begomovírus que infectam plantas do gênero *Phaseollus*.....33

Figura 7. Análise reticulada baseada no DNA-B de FPI39 e outros Begomovirus que infectam leguminosas.....34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1.1. A cultura dos feijoeiros	13
2.1.2. <i>Phaseolus lunatus</i> L.	14
2.2 Família <i>Geminiviridae</i>	14
2.3 Gênero <i>Begomovirus</i>	16
2.4 Begomovírus em leguminosas cultivadas no Brasil	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Coleta e armazenamento do material vegetal	22
3.2 Extração de DNA e detecção de begomovírus por PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	23
3.3 Clonagem e sequenciamento do genoma completo de begomovírus	24
3.4 Análise de sequências e demarcação de espécies	25
3.5 Análise filogenética	25
3.6 Análise de recombinação	25
4. Resultados	26
4.1 Detecção de begomovírus via PCR com primers universais e específicos	26
4.2 Clonagem, sequenciamento e demarcação de espécies de begomovírus	28
4.3 Análise Filogenética	29
4.4 Análise de recombinação	30
5. Discussão	31
6. Conclusões	35
REFERENCIAS	36
ANEXOS	42

1. INTRODUÇÃO

A agricultura familiar exerce papel fundamental na economia brasileira. De acordo com o Censo Agropecuário 2017 (IBGE 2017), 77% dos estabelecimentos agrícolas do país são classificados como pertencentes a essa atividade, empregando mais de 10 milhões de pessoas (IBGE/SIDRA, 2019). No estado de Alagoas, 98.5 mil (85,59% do total) estabelecimentos são caracterizados como familiares, demonstrando a importância da atividade para o desenvolvimento socioeconômico (IBGE/SIDRA, 2019; BARBOSA; BRANDÃO, 2020). Em Alagoas, a agricultura familiar tem se baseado na policultura, sendo responsável por quase toda a produção de arroz, feijão, mandioca, milho e palma forrageira (SILVA JÚNIOR&OLIVEIRA, 2021).

A cultura da fava (*Phaseolus lunatus*) é de importante valor econômico para região do Nordeste do Brasil. Também conhecida como feijão-fava ou feijão-lima, tem sua produção conduzida principalmente por agricultores familiares que compõem as inúmeras interfaces do setor rural brasileiro. É uma importante fonte alternativa de renda e alimentação para populações, embora seja menos cultivada quando comparada ao feijão-comum (*P. vulgaris*) (CONAB, 2018; IBGE, 2020). Alguns fatores se tornam limitantes para a produção de fava como, por exemplo, a ausência de adoção de tecnologias de cultivo e ocorrência de problemas fitossanitários, especialmente fitovirose.

Os begomovírus (gênero *Begomovirus*, família *Geminiviridae*) são fitovírus com genoma de DNA fita simples circular encapsidados em partículas quasi-icosaédricas geminadas e transmitidos por um complexo de espécies crípticas da mosca-branca *Bemisia tabaci* (INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016; ZERBINI et al., 2017). *Begomovirus* é o maior gênero de vírus de plantas em termo de número de espécies e causam doenças em diversas culturas de importância econômica das regiões tropicais e subtropicais (FARIA, 2000; NAVAS-CASTILLO, FIALLO-OLIVÉ, SÁNCHEZ-CAMPOS, 2011; INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016; ROJAS et al., 2018).

No Brasil, as begomovirose, provocam perdas significativas em espécies de feijoeiros que podem variar de 40% a 100%, dependendo da cultivar, estágio de infecção da planta, população do vetor, presença de hospedeiros alternativos e condições ambientais (MORALES, 2010; QUINTELA et al., 2008). O mosaico dourado do feijoeiro, causado pela espécie *Bean golden mosaic virus* (BGMV), tem sido uma das

mais importantes doenças do feijão comum (*P. vulgaris*) e feijão-fava (*P. lunatus*), desde que surgiu nos anos de 1960 (COSTA, 1965). Ao longo das últimas décadas, epidemias de BGMV nas principais áreas de cultivo, têm causado perdas substanciais e continuam sendo a maior preocupação para os produtores de feijão do país. Estas ocorrem normalmente no período quente e seco dos meses de verão e bem como nos períodos de seca, conhecido como “veranico”, que ocorre na estação das chuvas (INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016). Além do BGMV, outros begomovírus podem infectar *Phaseolus* spp. no Brasil como, por exemplo: *Macrotium yellow spot virus* (MaYSV), que infecta feijão-comum e feijão-fava (RAMOS-SOBRINHO et al., 2014).

Estudos prévios demonstram que BGMV ocorre predominantemente em feijão comum na região central do país (Minas Gerais, Goiás e Distrito Federal), ao passo que o MaYSV é o begomovírus predominante em *Phaseolus* spp. na região Nordeste. Até 2010, o BGMV predominava nos cultivos de feijão comum no Nordeste, e foi o único vírus encontrado infectando feijão-fava em Alagoas. Mas a partir de 2011, MaYSV foi o begomovírus mais frequentemente encontrado em hospedeiras feijão-comum e feijão-fava em Alagoas. Esses resultados destacam a rápida emergência e prevalência de MaYSV no estado (LIMA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO, 2014).

A dinâmica de prevalência de espécies virais pode mudar com o passar dos anos, sendo possível que espécies que antes predominam sobre determinado hospedeiro sejam substituídas. Estudos mais recentes sobre begomovírus que ocorrem em leguminosas cultivadas no estado de Alagoas são necessários para elucidar aspectos sobre a dinâmica e prevalência de espécies virais nesses hospedeiros. Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi determinar a diversidade genética de begomovírus associados a fava cultivada em sistema de produção familiar em Alagoas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1.1. A cultura dos feijoeiros

Os feijoeiros (*Phaseolus* spp.) são considerados culturas básicas da segurança alimentar mundial e um ícone presente na mesa de diversos brasileiros, sendo estimado que 70% da população brasileira consuma feijão diariamente, atingindo um consumo médio por pessoa de 17 kg/ano, o que constitui a maior fonte de proteínas e nutrientes depois da proteína animal em países em desenvolvimento (MAPA, 2018).

2.1.2. *Phaseolus lunatus* L.

O feijão-fava (*P. lunatus* L.), também conhecido como fava ou feijão-de-lima é a segunda leguminosa de maior importância dentro do gênero *Phaseolus*, sendo rica em proteína vegetal, antioxidantes, minerais e vitaminas, podendo contribuir para a sustentabilidade e garantia da segurança alimentar e nutricional da população (GARCIA *et al.* 2021; NGUYEN, 2020; SEIDU, 2018; ASSUNÇÃO NETO *et al.* 2022).

Sua grande adaptação ao clima do Nordeste brasileiro trouxe para a cultura uma grande importância socioeconômica para pequenos produtores (CAVALCANTE, 2018). Trata-se de uma planta trepadeira bastante utilizada tanto na alimentação humana quanto animal devido a sua rusticidade, permitindo que o cultivo seja prolongado e tenha colheita em período seco. No Nordeste brasileiro, o plantio passou a ser realizado junto com o milho, mamona, mandioca e demais culturas que possam servir como suporte, sendo também utilizada em cercas vivas (LIMA, 2020), predominando os plantios de sequeiro com a semeadura realizada no início do período chuvoso, embora a espécie adapte-se bem à distribuição irregular das chuvas comum na região. Portanto, dada a grande adaptação às condições edafoclimáticas, a fava vem sendo explorada no Nordeste há muito tempo, sendo cultivada em sistema de agricultura familiar (BARBOSA & ARRIEL, 2018; BENEVIDES *et al.*, 2019).

Apesar da importância socioeconômica dessa cultura, a produtividade em Alagoas é considerada baixa. Um dos fatores que comprometem o desempenho produtivo e reduzem a qualidade comercial dos feijoeiros é ocorrência de doenças, especialmente viroses causadas por espécies da família *Geminiviridae*.

2.2 Família *Geminiviridae*

A família *Geminiviridae* é uma família de fitovírus composta por 14 gêneros, *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulavirus*, *Citlodavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Maldovirus*, *Mastrevirus*, *Mulcrilevirus*, *Opunvirus*, *Topilevirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus*, que englobam 520 espécies classificadas de acordo com o gama de hospedeiros, inseto vetor, relacionamento filogenético e organização genômica (ZERBINI *et al.*, 2017; VARSANI *et al.*, 2017; ICTV, 2022).

Os geminivírus são fitovírus com genoma de fita simples de DNA (ssDNA) circular de aproximadamente 2,6 a 5,2 kilobases (kb) de tamanho, encapsidado em partículas geminadas quasi-icosaédricas com aproximadamente 18 nm de diâmetro e 30

nm de comprimento (BROWN et al., 2015). A proteína capsidial é conservada quando se trata da sua capacidade para formar os vírions, porém diverge quanto à especificidade pelo inseto vetor (ROJAS et al., 2005). A replicação do genoma ocorre pelo mecanismo de círculo rolante (STENGER et al., 1991). Todos os geminivírus possuem uma região intergênica com diversos elementos de sequência altamente conservados, o que inclui uma estrutura em forma de grampo contendo uma sequência de nove nucleotídeos (5'-TAATATTAC-3'). Esta sequência é a responsável pela origem de replicação, além de repetições diretas e invertidas de cinco nucleotídeos, denominadas iterons, essenciais para que a origem seja reconhecida pela proteína viral associada à replicação (ROJAS et al., 2005; RIZVI et al., 2015). A maioria dos gêneros é composta por apenas um componente genômico (monopartido), com exceção de *Begomovirus* que possui espécies com apenas um ou com dois componentes genômicos (bipartidos) (ZERBINI et al., 2017; VARSANI et al., 2017).

A transmissão dos geminivírus dá-se por insetos vetores que se alimentam no floema de plantas hospedeiras como cigarrinhas, membracídeos e moscas-brancas. As plantas infectadas apresentam sintomas que incluem amarelecimento, atrofiamento das plantas (nanismo), deformação foliar, enrugamento, manchas foliares, mosqueado e mosaico, resultando em perda significativa de rendimento (INOUE-NAGATA, et al., 2016; NIGAM, 2021). Os geminivírus causam doenças relevantes para a produção agrícola em regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo, são capazes de infectar mono e dicotiledôneas, afetando severamente culturas como algodoeiro, cucurbitáceas, feijoeiros, mandioca, pimentão, tomateiro e até mesmo plantas ornamentais, o que resulta em perdas econômicas por baixa produção (INOUE-NAGATA, et al 2016; MARTIN e ELENA, 2009).

Dentre os fitovírus que ocasionam problemas na agricultura, merecem destaque os begomovirus bean golden mosaic virus (BGMV) e bean golden yellow mosaic virus (BGYMV) que infectam feijões nas Américas, beet curly top virus (BCTV; gênero *Curtovirus*) infectando beterraba açucareira na América do Norte e Oriente Médio, african cassava mosaic virus (ACMV; gênero *Begomovirus*) infectando mandioca, e maize streak virus (MSV; gênero *Mastrevirus*) em milho na África, cotton leaf curl virus (CLCuV; gênero *Begomovirus*) infectando algodão na Ásia, e tomato yellow leaf curl virus (TYLCV; gênero *Begomovirus*) infectando tomates em todo o mundo (HANLEY-BOWDOIN et al., 2013; INOUE-NAGATA, et al 2016), sendo uma parte dessas espécies capazes de provocar prejuízo econômico de até 100% (SATTAR et al., 2013).

2.3 Gênero *Begomovirus*

O gênero *Begomovirus* é o maior grupo de vírus dentro da família *Geminiviridae*, com atualmente 445 espécies reconhecidas pelo *International Comitee on Taxonomy of Viruses – ICTV* (<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>), sendo o *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) sua espécie tipo (BROW et al., 2015; VARSANI et al., 2014; KING, A.M., ADAMS, M.J., LEFKOWITZ, E.J., 2012).

Os begomovirus podem ser divididos em dois grupos, begomovirus do “Velho Mundo” (VM; Europa, África, Ásia e Austrália) e do “Novo Mundo” (NM; Américas). Essa classificação se dá não apenas pela distribuição geográfica, mas também devido a organização genômica. O gênero *Begomovirus* pode apresentar um ou dois componentes genômicos, os begomovirus do VM apresentam tanto um único componente genômico quanto dois componentes genômicos e são frequentemente associados a alfassatélites, betassatélites e deltassatélites (DRY et al., 1997; FAUQUET; STANLEY, 2005; ZHOU et al., 2013; LOZANO et al., 2016; ROSARIO et al., 2016). Já os begomovirus do NM são quase que exclusivamente bipartidos, com relatos de ocorrência de associação a alfassatélites e deltassatélites (DRY et al., 1997; PAPROTKA; METZLER; JESKE, 2010; ROMAY et al., 2010; FIALLO-OLIVÉ et al., 2012, 2016).

Begomovirus infectam uma ampla gama de plantas, incluindo culturas comerciais, plantas medicinais, aromáticas, ornamentais e daninhas, sendo predominantemente limitados ao floema e restritos ao sistema vascular (LEVY, 2003; INOUE-NAGATA et al., 2016; VIVEK et al., 2021). Estes induzem diferentes tipos de sintomas em suas hospedeiras como nanismo, deformação foliar, mosaico/mosqueados de coloração verde-claro a amarelo-dourado, amarelecimento venal ou intervenal e pontos amarelos nas folhas. Portanto, constituem um grupo de vírus economicamente importante, sobretudo em regiões tropicais e subtropicais (MORALES; ANDERSON, 2001; NAVAS-CASTILLO et al., 2011; BROWN et al., 2015). Embora seja difícil estimar as perdas globais causadas por begomovirus devido ao grande número de culturas que afetam, elas certamente estão na faixa de bilhões de dólares anualmente (FIALLO-OLIVÉ et al., 2021).

São principalmente transmitidos de modo persistente circulativo por um complexo de espécies crípticas da mosca-branca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) (BROWN et al., 2012; BROWN et al., 2015). O complexo *B. tabaci* engloba ao menos 39 biótipos morfológicamente indistinguíveis, mas geneticamente diferentes, com destaque para as espécies Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1; antigo biótipo B) e

Mediterranean (MED; antigo biótipo Q), consideradas as mais invasivas e destrutivas (DE BARRO et al., 2011). MEAM1 está amplamente distribuída no Brasil, enquanto a ocorrência de MED foi descrita na Região Sul, podendo estar presente em outras partes do país (BARBOSA et al., 2015, INOUE-NAGATA et al., 2016).

O ciclo de infecção se inicia quando a *B. tabaci* adquire partículas virais, a partir de plantas infectadas, durante a alimentação. Partes bucais de *B. tabaci* são modificados para perfurar o tecido foliar, atingir o sistema vascular e sugar a seiva da planta. Ao alimentar-se de plantas infectadas, a *B. tabaci* ingere partículas de begomovírus (ROSEN, et al., 2015; SCHOLTHOF et al., 2011). Roy e colaboradores (2021) observaram em testes em laboratório que em apenas cinco minutos após o início da alimentação os indivíduos de *B. tabaci* ingeriram bilhões de cópias de begomovírus e que esse número aumentou exponencialmente de acordo com o tempo de exposição a planta infectada. Uma vez que os vírions entram no sistema alimentar de *B. tabaci*, estes são reconhecidos por receptores localizados no intestino médio e atingem a hemolinfa. Na hemolinfa, os vírions interagem com a proteína GroEL, e esta proteína direciona as partículas virais para as glândulas salivares primárias. Ao alimentar-se em plantas hospedeiras saudáveis, a mosca-branca deposita saliva contendo partículas virais diretamente no floema da planta (ROSEN, et al., 2015).

O ICTV oficializou a criação de uma família de DNA satélites de fita simples associados a begomovírus, *Tolecusatellitidae*, a qual inclui os gêneros *Betasatellite* e *Deltasatellite* (ADAMS et al., 2017). O gênero *Betasatellite* possui 61 espécies listadas, e estas possuem cerca de metade do tamanho do componente genômico dos begomovírus. Os betassatélites codificam a proteína β C1, que desempenha um papel importante na indução de sintomas e na supressão do silenciamento genético transcricional e pós-transcricional (ZHOU, 2013). O gênero *Deltasatellite* tem cerca de um quarto do tamanho da composição do genoma dos begomovírus e possui 11 espécies descritas (FIALLO-OLIVÉ et al., 2012; LOZANO et al., 2016).

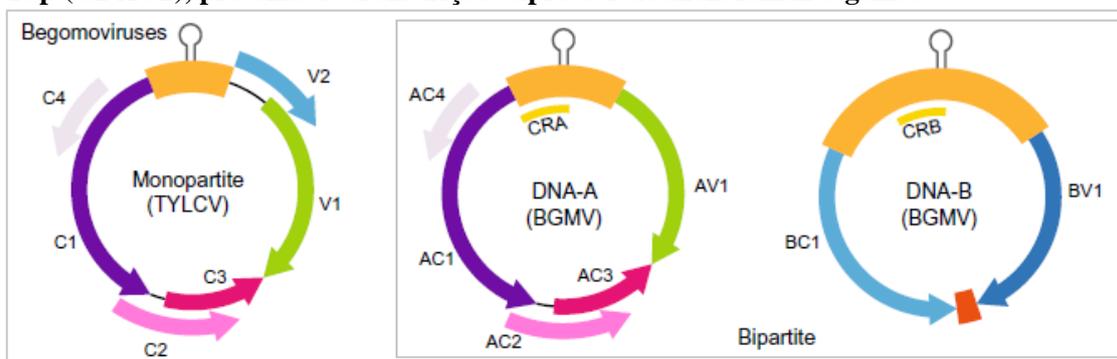
Os genomas bipartidos têm seus componentes genômicos conhecidos como DNA-A e DNA-B (BROWN et al., 2015). Cada componente é encapsidado separadamente em partículas geminadas, sendo necessárias as duas moléculas de DNA para que a infecção ocorra. Ambos apresentam um comprimento semelhante de aproximadamente 2,6 Kb (PILARTZ; JESKE, 2003). O DNA-A desempenha papel essencial na taxonomia, pois é o componente genômico utilizado para identificação e classificação taxonômica dos vírus bipartidos. Além disso, contém genes que estão envolvidos na replicação e encapsidação

viral. Já o DNA-B possui genes responsáveis pelo movimento intra e intercelular (HANLEY-BOWDOIN et al., 2013). O genoma dos begomovírus possuem ORFs (*open reading frames*) que codificam proteínas multifuncionais (WALSH; MOHR, 2006).

Os componentes genômicos dos begomovírus bipartidos não apresentam homologia de sequências entre si, exceto por uma região intergênica com cerca de 200 nucleotídeos, a região comum (RC). A RC é altamente conservada entre os dois componentes de uma determinada espécie, atingindo mais de 90% de homologia. A partir dessa região, os genes presentes em cada componente divergem nos sentidos virais e complementar. É na RC que está localizada a origem de replicação e os promotores de síntese do RNAs mensageiros virais (LAZAROWITZ, 1992).

O componente DNA-A em begomovírus bipartidos é homólogo ao dos monopartidos e compreende entre cinco e seis ORFs (Figura 1). No componente DNA-A, um gene é transcrito no sentido viral, denominado *CP* (Coat Protein), que codifica para a proteína da capa proteica, e quatro no sentido complementar, *Rep*, *TrAP*, *Ren* e *C4*, que codificam, respectivamente, para a proteína associada à replicação (*Replication associated Protein* - Rep), a proteína da transcrição (*Trans-Acting Protein* - TrAP), uma proteína que aumenta a replicação do genoma viral (*Replication Enhancer* - REn) e uma proteína envolvida na supressão do silenciamento gênico (C4) (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999; FARIA; ZERBINI, 2000).

Figura 1. Organização gerômica dos begomovirus LIR, região intergênica longa; SIR, região intergênica curta; CR, região comum; nsp (BV1), proteína de movimento nuclear; cp (V1/AV1), proteína capsidial; mp (V2/BC2), proteína de movimento; rep (C1), proteína associada a replicação; ren (C3/AC3), proteína potencializadora de replicação; trap (C2/AC2), proteína de transcrição/supressor de silenciamento gênico



Fonte: Modificada de VARSANI et al., 2017.

O produto da ORF AV1/V1, capa proteica (CP), é uma proteína multifuncional e estrutural responsável pela proteção do material genético, além de atuar na mediação da

transmissão pelo inseto vetor (AZZAM et al., 1994; BRIDDON et al., 1990; FRISCHMUTH; STANLEY, 1998; HARRISON; SWANSON; FARGETTE, 2002). Uma outra proteína sintetizada no sentido viral é a V2 presente apenas em begomovírus monopartidos do VM, sendo denominada ‘*Pre-coat protein*’ e está relacionada ao movimento sistêmico mais eficiente do vírus na planta, além de atuar inibindo ou suprimindo o silenciamento gênico do hospedeiro (PADIDAM; BEACHY; FAUQUET, 1996; CHOWDA-REDDY et al., 2008; ZHANG et al., 2012).

No sentido complementar, a ORF AC1/C1 codifica a proteína Rep, sendo uma proteína essencial para replicação viral, apesar de não possuir atividade polimerase, depende exclusivamente das enzimas polimerases da planta hospedeira para facilitar a replicação do DNA viral (JESKE, 2009; BRIDDON, 2015). A Rep se liga a regiões intergênicas conhecidas como iterons e cliva a fita de DNA no nonanucleotídeo 5'-TAATATTAC-3', dando início ao processo de replicação (FONTES; LUCKOW; HANLEYBOWDOIN, 1992; LAUFS et al., 1995). Além disso, a Rep é capaz de autorregulação, uma vez que sua ligação à origem de replicação reprime a expressão de genes no sentido complementar (incluindo sua própria expressão) (EAGLE et al., 1994), mas aparentemente não reprime a expressão de genes no sentido viral (SHIVAPRASAD et al., 2005).

A TrAP, produto da ORF AC2/C2, é uma proteína codificada pelo gene *trap* e atua nos promotores de genes de sentido viral CP (AV1/V1) e NSP (*nuclear shuttle protein*; BV1). Sendo assim, os transcritos relacionados a estes genes só são observados na célula após a expressão do gene *trap*. A TrAP ainda está envolvida na supressão de silenciamento gênico transcricional (TGS) e pós-transcricional (PTGS) (VANITHARANI et al., 2004; RAJA et al., 2008).

A ORF3 ou AC3/C3 codifica a proteína REn, e sua presença é um fator de amplificação da replicação viral, porém, não é essencial para que a mesma ocorra. Quando presente, é observado um acúmulo de DNA viral. A diminuição de sintomas ocasionados por begomovirose podem estar associados a mutações na AC3 (SUNG; COUTTS, 1995; SUNTER et al., 1990; ZERBINI; CARVALHO; MACIEL-ZAMPOLIM, 2002).

A AC4/C4 é uma ORF que está inserida na ORF AC1, mas possui uma leitura diferente, com função variável entre os begomovírus do VM e NM. Nos begomovírus do VM, a C4 atua na determinação da severidade dos sintomas e movimento viral, já no NM, também atua na movimentação viral, porém não é essencial para que ocorra infecção

(FONTENELLE et al., 2007). A rápida manifestação de sintomas na planta esta comumente relacionada a supressão do sistema de defesa da planta, a qual é induzida pelo produto do gene *AC4* (VANITHARANI et al., 2004).

A ORF *AC5/C5* não é presente em todas as espécies de begomovírus e sua função ainda não está bem elucidada, mas estudos realizados por Melgarejo et al. (2013) mostram que sua ausência em mutantes induziu sintomas menos severos. Enquanto Li et al. (2015), trabalhando com *Mungben yellow mosaic India virus*, descrevem o papel multifuncional desta proteína, que aparentemente atua na patogenicidade viral e supressão de silenciamento de RNA, empregando novos mecanismos capazes de suprimir as defesas da planta.

No componente DNA-B, no sentido viral, o gene *NSP* codifica uma proteína responsável pelo transporte do DNA através do envelope nuclear. A *NSP* se liga ao DNA viral formando o complexo *NSP-ss/dsDNA*, que é transportado para o citoplasma, e assim interage com a *MP*, que conduz o complexo para a periferia da célula vegetal para ser transportado à célula adjacente (SANDERFOOT; LAZAROWITZ, 1995; 1996; SANDERFOOT; INGHAM; LAZAROWITZ, 1996). No sentido complementar, a ORF *BC1*, é responsável por codificar a proteína *MP*, com função no transporte célula-à-célula através do mecanismo de aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas (NOUEIRY; LUCAS; GILBERTSON, 1994).

2.4 Begomovírus em leguminosas cultivadas no Brasil

Begomovírus que infectam feijoeiros (*Phaseolus* spp.) são distribuídos através das Américas e considerados fator limitante para a produtividade dessa cultura (MORALES, 2010). Diversas espécies já foram relatadas naturalmente infectando esses hospedeiros, *Bean calico mosaic virus*, *Bean dwarf mosaic virus*, *Bean golden yellow mosaic virus*, *Sida micrantha mosaic virus*, *Tobacco leaf curl Cuba virus*, *Sida golden mosaic virus*, *Common bean severe mosaic virus*, *Common bean mottle virus*, *Bean golden mosaic virus* e *Macroptilium yellow spot virus*, sendo os dois últimos de maior importância econômica no Brasil (FAUQUET et al., 2005; FERNANDES-ACIOLI et al., 2014; SILVA et al., 2012; LIMA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014; CHANG-SIDORCHUK et al., 2016).

O primeiro begomovírus relatado infectando leguminosas no Brasil, o BGMV, foi observado infectando *P. vulgaris* na década de 1960. O mosaico dourado do feijoeiro foi a primeira doença causada por esse grupo de vírus que atingiu níveis epidêmicos no Novo

Mundo, os quais foram associadas ao aumento das populações de mosca-branca que se desenvolveram em áreas com plantio de soja (INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016). Surtos epidêmicos do BGMV em plantios de feijoeiros foram, durante muito tempo, impulsionados por populações nativas da mosca-branca *B. tabaci* New World (NW, antigo biótipo A). Após a introdução da *B. tabaci* Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1, nativa do VM) no país, mesmo com o deslocamento da NW, surtos de BGMV continuaram a ser relatados, indicando que ambas as espécies crípticas de *B. tabaci* são vetores eficientes na transmissão do BGMV (INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016).

Apesar da associação esporádica de begomovírus à soja (*Glycine max*), diferentes espécies já foram relatadas infectando essa cultura, *Bean golden mosaic virus*, *Leonurus mosaic virus*, *Sida micrantha mosaic virus*, *Sida mottle virus*, *Okra mottle virus* e *Soybean chlorotic spot virus* (INOUE-NAGATA et al., 2016; FERNANDES et al., 2009; FARIA, 1994; MELLO et al., 2000; MELLO et al., 2002). No Brasil, apenas dois begomovírus foram relatadas em feijão-caupi, o *Cowpea golden mosaic virus*, em Goiânia e, mais recentemente, *cowpea bright yellow mosaic virus* (CoBYMV), em Pernambuco (NAITO et al., 2019). Os begomovírus *Rhyncosia mosaic virus* e *Mugbean yellow mosaic India virus*, são os mais frequentemente associados ao feijão-guandu na África, Ásia e Caribe (BISAWAS; MALATHI; VARMA, 2008; IDRIS et al., 2002). Até o nosso conhecimento, não existem relatos de ocorrência dessas espécies infectando feijão-guandu no Brasil.

Diferentes espécies de plantas não-cultivadas da família Fabaceae têm sido relatadas como hospedeiras de *Begomovirus* como *Macroptilium lathyroides*, espécie comumente encontrada em associação com campos de cultivo de feijoeiros. *Macroptilium yellow mosaic virus*, *Macroptilium yellow mosaic Florida virus*, *Macroptilium mosaic Puerto Rico virus* e MaYSV são capazes de infectar sistemicamente plantas de feijão-comum e feijão-fava (AMARAKOON et al., 2008; IDRIS et al., 2003; LIMA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). O primeiro relato de MaYSV ocorreu em 2009, infectando *Macroptilium lathyroides*, nos estados de Alagoas, Sergipe e Paraíba (SILVA et al., 2012).

Em Alagoas, o begomovírus BGMV tem sido o mais importante patógeno associado ao mosaico dourado do feijão-comum (LIMA, 2008; SILVA et al., 2012; RAMOS-SOBRINHO ET AL., 2014). Perdas de 61,3% foram estimadas na produção de feijão-comum sob infecção de BGMV (LIMA, 2008). Em 2005, O BGMV, foi o único

begomovírus encontrado infectando fava em Alagoas (RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). No entanto, em 2011, MaYSV emergiu como um importante patógeno passando a infectar hospedeiras cultivadas, tornando-se o begomovírus mais frequentemente encontrado em feijão-comum, feijão-fava e *M. lathyroides* no Estado (RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Isto indica que MaYSV estaria, possivelmente, substituindo as populações de BGMV, até então considerado o principal begomovírus em feijoeiros (RAMOS-SOBRINHO et al., 2014).

Estudos prévios revelaram que a variabilidade genética molecular é maior nas populações de MaYSV do que nas populações de BGMV, sendo esta atribuída aos numerosos eventos de recombinação em MaYSV. Ambos MaYSV e BGMV diferem quanto a estrutura genética, com a população de BGMV (mas não MaYSV) sendo estruturada tanto por hospedeira como pela geografia (FARIA, 1999; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). O BGMV ocorre predominantemente em feijão-comum na região central do país (Minas Gerais, Goiás e Distrito Federal), ao passo que o MaYSV é o begomovírus predominante em *Phaseolus* spp. na região Nordeste.

Devido a importância econômica do BGMV em leguminosas no Brasil, foi desenvolvido o feijoeiro-comum transgênico (evento Embrapa 5.1) resistente a esse vírus, no qual a resistência é baseada na tecnologia de silenciamento de RNA (BONFIM et al., 2007; ARAGÃO et al., 2013). No entanto, a utilização da cultivar transgênica representa apenas uma estratégia para o manejo de infecções por BGMV, não sendo resistente a outros begomovírus que infectam feijoeiros, incluindo MaYSV e *Sida micrantha mosaic virus* (INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016). Esses surtos contínuos de begomovírus demonstram que o manejo eficaz da doença continua sendo um desafio.

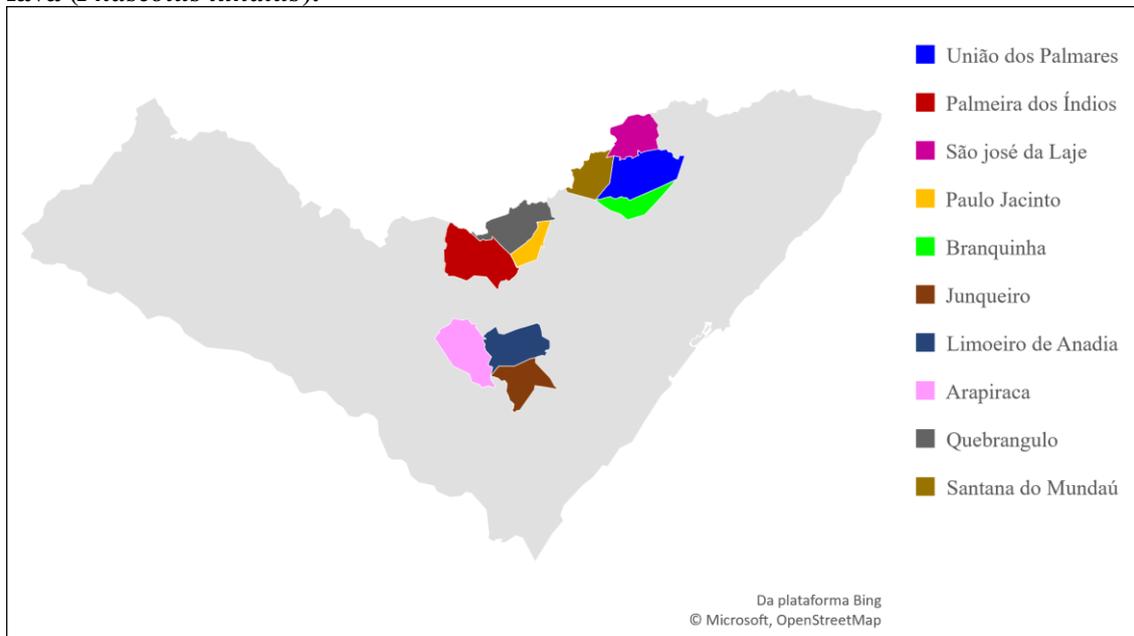
3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e armazenamento do material vegetal

Foram coletadas amostras foliares de fava apresentando sintomas indicativos de infecção por begomovírus como mosaico, deformação foliar, nanismo e amarelecimento. As coletas foram realizadas nas cidades de União dos Palmares, Palmeira dos Índios, São José da Laje, Paulo Jacinto, Branquinha, Junqueiro, Limoeiro de Anadia, Arapiraca, Quebrangulo e Santana do Mundaú, no Estado de Alagoas, durante 2022 (Figura 2). Todas as amostras foram fotografadas, a fim de manter um registro visual dos sintomas observados, além de terem as coordenadas geográficas e data de coleta registradas. Posteriormente, foram armazenadas como exsiccatas e mantidas em ultra freezer (-80°C)

no Laboratório de Fitopatologia Molecular e Virologia Vegetal do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas.

Figura 2. Municípios do Estado de Alagoas em que foram realizadas as coletas de feijão-fava (*Phaseolus lunatus*).



Fonte: Autora (2023)

3.2 Extração de DNA e detecção de begomovírus por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

O DNA total de cada amostra foi extraído, individualmente, usando o método CTAB (DOYLE e DOYLE, 1987). A qualidade do DNA foi estimada visualmente em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e observado sob luz UV com auxílio de fotodocumentador. A infecção por begomovírus foi confirmada, via PCR, usando os primers degenerados PAR1c496/PAL1v1978 (ROJAS et al., 1993). As condições de amplificação para o par de primers PAR1c496/PAL1v1978 foram: desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 54°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, e por fim, extensão final a 72°C por 10 minutos. Ao final da reação, foi observada a amplificação de um fragmento de aproximadamente 1,2 kb, proveniente do componente genômico DNA-A.

Após a confirmação de infecção por begomovírus, foi realizada a detecção dos componentes genômicos DNA-A e DNA-B de BGMV e MaYSV, usando os pares de primers específicos descritos por Ferro et al. (2019; tabela 1).

Tabela 1. Primers específicos descritos por Ferro et al. (2019) utilizados para detecção dos componentes genômicos (DNA-A e DNA-B) das espécies BGMV e MaYSV

		Primer	Sequência
BGMV	DNA-A	BGMV-Det_1191_For	5'-CCTTGTGTAGACCCAGTTTGT-3'
		BGMV-Det_1768_Rev	5'-CAAAGGTGTTTTCAAATCATGCTG-3'
	DNA-B	BGMV-B-Det_1506_For	5'-GGTTCTCCGTGCTCCTACTATA-3'
		BGMV-B-Det_2444_Rev	5'- AAACAGAGCCTATATGTCATA -3'
MaYSV	DNA-A	MaYSV-Det_1137_For	5'-GGAGGTGGAGGTCCAAAAA-3'
		MaYSV-Det_1427_Rev	5'- TCTGGGACGACATATTTAGT-3'
	DNA-B	MaYSV-Det_1311_For	5'-GTTGTTTATTATTTCCAAGCATTG-3'
		MaYSV-Det_1640_Rev	5'-TCTATAGGAGTCAGCTCAAAT-3'

Fonte: Adaptado de Ferro (2019)

Para os primers de detecção BGMV-Det_1191_For/BGMV-Det_1768_Rev, BGMV-B-Det_1506_For/BGMV-B-Det_2444_Rev, MaYSV-Det_1137_For/MaYSV-Det_1427_Rev e MaYSV-Det_1311_For/MaYSV-Det_1640_Rev, a termociclagem utilizada foi: desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos, e por fim, extensão final a 72°C por 10 minutos. Ao final da reação, foram observados produtos de amplificação de ~578 pb para BGMV DNA-A, 939 pb para BGMV DNA-B, 324 pb para MaYSV DNA-B e 291 pb para MaYSV DNA-A. Os produtos das reações de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%, corados em brometo de etídio e visualizados sob luz UV.

3.3 Clonagem e sequenciamento do genoma completo de begomovírus

As amostras positivas para infecção por begomovírus, e negativas para as espécies BGMV e MaYSV, foram submetidas à amplificação do genoma viral completo com a enzima DNA polimerase do bacteriófago phi29, do Kit TempliPhi (GE Healthcare), de acordo com o método descrito por Inoue-Nagata et al. (2004). Aliquotas de 2µL das amplificações foram submetidas, individualmente, a clivagens com a enzima de restrição *SpeI* para linearizar o genoma. Posteriormente, os produtos das reações foram analisados em gel de agarose a 0,8%, corados com brometo de etídio (5 µg/mL) e visualizados sob luz UV. Aliquotas das reações de clivagem contendo fragmentos correspondente a uma cópia de cada componente genômico foram utilizadas para ligação no vetor pBluescript KS+ (Stratagene) previamente linearizado com a mesma enzima e defosforilado. O produto da reação de ligação foi utilizado para transformação de células ultracompetentes de *Escherichia coli* estirpe DH10B pelo método de choque térmico (SAMBROOK, 2001). As colônias contendo os possíveis plasmídeos recombinantes foram repicadas para

meio LB líquido contendo ampicilina (Ampicilin, sodium salt USB©) e incubadas a 37°C sob agitação orbital de 180 rpm durante 12h. Após incubação, as culturas foram submetidas à extração de DNA plasmidial, e o padrão eletroforético do DNA plasmidial digerido com a enzima utilizada para clonagem foi utilizado para confirmação da clonagem. Os clones foram então completamente sequenciados comercialmente por *primer walking* (Macrogen Inc., Seul, Coréia do Sul).

3.4 Análise de sequências e demarcação de espécies

As sequências dos componentes genômicos virais completos foram montadas utilizando-se o programa CodonCode Aligner v. 4.1.1 (www.codoncode.com). Estas foram inicialmente analisadas com o algoritmo BLASTn (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 nucleotídica. Um conjunto de dados contendo as sequências novas e isolados de begomovírus que infectam *Phaseolus* spp., obtidas no GenBank, foram utilizadas para demarcação de espécie dos novos isolados virais utilizando-se o programa Sequence Demarcation Tool v. 1.2 (MUHIRE et al., 2013).

3.5 Análise filogenética

Para a determinação do relacionamento filogenético entre os begomovírus obtidos nessa pesquisa e demais begomovírus obtidas a partir do GenBank, foram realizados alinhamentos múltiplos das sequências nucleotídicas utilizando o algoritmo MUSCLE implementado no pacote MEGA6 e ajustados manualmente. As árvores filogenéticas foram reconstruídas utilizando inferência Bayesiana com a ferramenta MrBayes (RONQUIST et al., 2012) v.3.2.6 disponibilizada no portal CIPRES (MILLER et al., 2010). O modelo de substituição de nucleotídeos e o modelo para distribuição de heterogeneidade foram escolhidos com o auxílio dos programas PAUP v.4.0b10 (SWOFFORD, 2003) e MrModelTest2 v.2.3 (NYLANDER, 2004). As árvores foram visualizadas e editadas nos programas FigTree v. 1.4.23 (ztree.bio.ed.ac.uk/software/figtree) e Inkscape (<https://inkscape.org/pt/>).

3.6 Análise de recombinação

Possíveis locais (breakpoints) de recombinação no componente genômico dos isolados foram determinados utilizando-se os métodos RDP, Geneconv, Boot-scan, Maximum Chi Square, Chimaera, SisterScan e 3Seq implementados no pacote RDP v. 4.0 (MARTIN et al., 2015). Os alinhamentos foram analisados 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 por no mínimo cinco diferentes métodos foram considerados confiáveis. Possíveis evidências de evolução em rede foram avaliadas utilizando-se o método Neighbor-Net implementado no programa SplitsTree v. 4.10 (HUSON; BRYANT, 2006).

4. Resultados

4.1 Detecção de begomovírus via PCR com primers universais e específicos

Foram coletadas um total de 195 amostras de fava exibindo sintomas de mosaico dourado. Sintomas de deformação foliar e bolhosidade também foram observados (Figura 3). O par de primers universais para o gênero *Begomovirus*, PAR1c496/PAL1v1978, direcionou a amplificação de um fragmento de aproximadamente 1,2 kb do DNA-A, que compreende a Região Comum (RC) e as extremidades amino terminal dos genes *Rep* e *cp*, a partir de todas as amostras avaliadas. Tais resultados confirmam que as 195 amostras estavam infectadas por vírus que pertencem ao gênero *Begomovirus*. Os primers espécie-específicos BGMG-Det-1191_For/BGMV-Det-1768_Rev, BGMV-B-Det-1506_For/BGMV-B-Det-2444_Rev, MaYSV-Det_1137_For/MaYSV-Det_1427_Rev e MaYSV-Det_1311_For/MaYSV-Det_1640_Rev, foram usados para detectar BGMV e MaYSV, respectivamente. O BGMV está amplamente distribuído, tendo os componentes DNA-A e DNA-B detectados em 192/195 amostras (Anexo 1), o que corresponde a uma taxa de infecção de 98,97%. Já o MaYSV foi detectado em cerca de 27,69% (54/195) das amostras. Além da menor taxa de infecção, o MaYSV teve uma distribuição mais restrita nas áreas de coleta, não sendo detectado nos municípios de São José da Laje, Paulo Jacinto e Branquinha. A maior ocorrência de MaYSV foi observada em Arapiraca, com 90% de amostras positivas para este vírus (Tabela 2). MaYSV foi predominantemente encontrada em infecções mistas com BGMV (53/54 amostras) (Figura 4). Infecção simples de MaYSV, foi detectada apenas para o isolado FPI22, proveniente de Palmeira dos Índios. Adicionalmente, o DNA-B de MaYSV foi encontrado apenas em amostras provenientes do município de Arapiraca (Anexo 1). Duas amostras provenientes de Palmeira dos Índios, FPI21 e FPI39, testaram negativo para ambos BGMV e MaYSV, porém positivo para detecção com primers universais para o gênero *Begomovirus*. Tal resultado sugere que um outro begomovírus pode estar infectando as plantas de fava em Alagoas. Portanto, estas amostras foram selecionadas para sequenciamento do genoma viral completo, com o objetivo de determinar o posicionamento taxonômico em nível de espécie.

Figura 3. Amostras com sintomas de mosaico encontradas no campo.



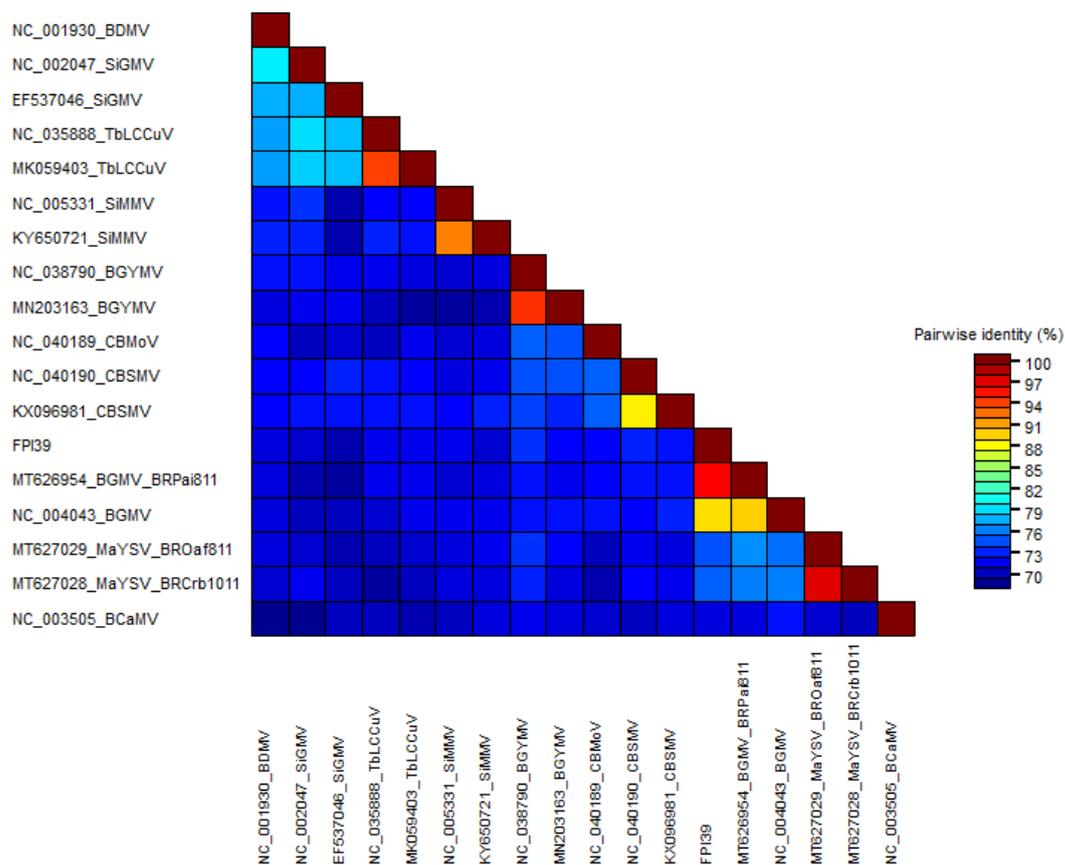
Fonte: Autora (2022)

Tabela 2. Quantidade total de amostras coletadas e seus resultados nos testes de detecção para BGMV e MaYSV

Local de Coleta	Total de amostras coletadas	BGMV DNA-A	BGMV DNA-B	MaYSV DNA -A	MaYSV DNA-B	infecção mista DNA-A	infecção mista DNA-B
União dos Palmares	20	20/20	20/20	4/20	0/20	4/20	0/20
Palmeira dos Índios	40	38/40	38/40	15/40	0/40	14/40	0/20
São José da Laje	20	20/20	20/20	0/20	0/20	0/20	0/20
Paulo Jacinto	20	20/20	20/20	0/20	0/20	0/20	0/20
Branquinha	20	20/20	20/20	0/20	0/20	0/20	0/20
Junqueiro	12	12/12	12/12	9/12	0/12	9/12	0/20
Limoeiro de Anadia	13	13/13	13/13	4/13	0/13	4/13	0/20
Arapiraca	20	20/20	20/20	18/20	12/20	18/20	12/20
Quebrangulo	14	14/14	14/14	2/14	0/14	2/14	0/14
Santana do Mundaú	16	16/16	16/16	2/16	0/16	2/16	0/16

Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Figura 5. Matriz de identidade de seqüências do DNA-B do isolado FPI39 e demais begomovírus que infectam *Phaseolus* spp.

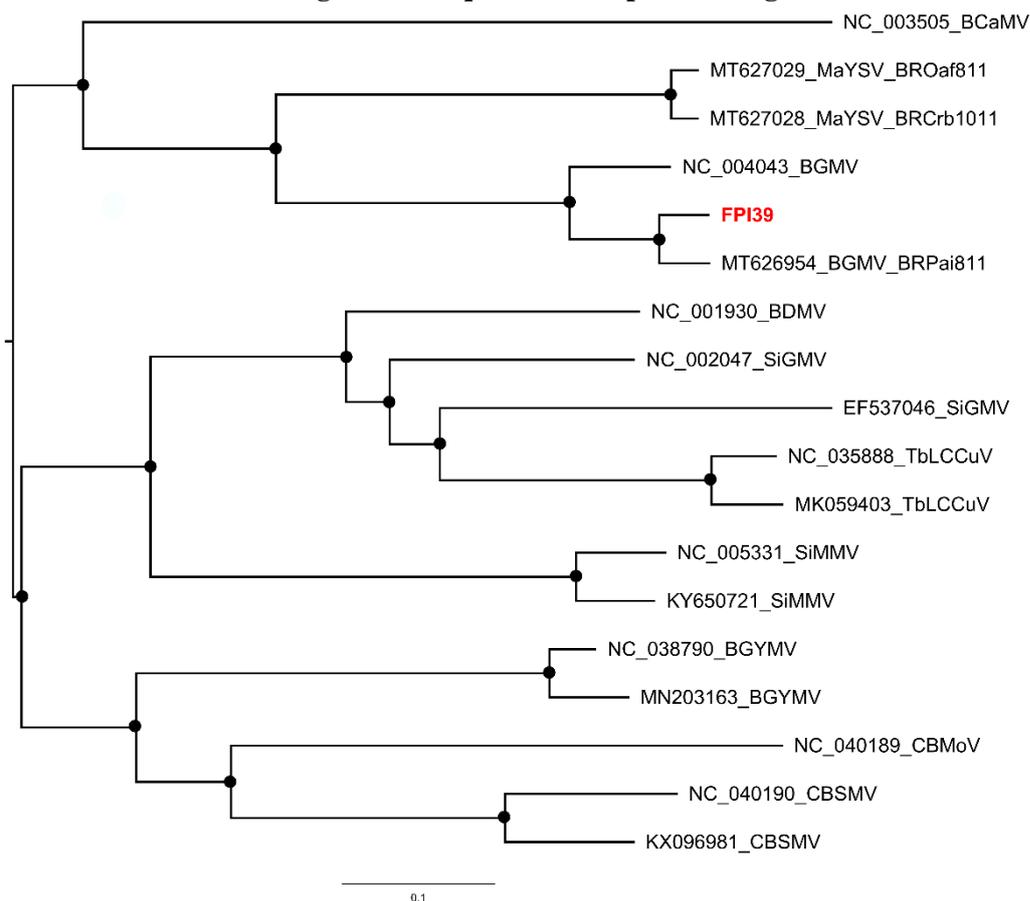


Fonte: Dados da pesquisa (2023)

4.3 Análise Filogenética

A árvore filogenética baseada na seqüência completa do DNA-B mostrou que o isolado FPI39 e demais begomovírus que infectam *Phaseolus* spp. foram distribuídos em 3 principais Clados (figura 6). FPI39 agrupou num ramo monofilético com a espécie BGMV, sendo mais proximamente relacionado ao isolado BR:Pai8:11, proveniente de fava do Município Palmeira dos Índios, Alagoas. Este resultado corrobora aqueles encontrados nas análises BLAST e de comparações de sequencias pareadas. Neste mesmo clado, encontram-se isolados da espécie MaYSV obtidos de feijão comum nos municípios de Craíbas e Olho d'água das Flores em Alagoas. O Clado II, engloba begomovírus obtidos de feijão comum e espécies não cultivadas provenientes das Américas (Cuba, Estados Unidos e República Dominicana). Enquanto, o Clado III agrupa begomovírus que infectam feijão comum predominantemente em Cuba, exceto o isolado NC_038790 de BGYMV, proveniente da República Dominicana.

Figura 6. Árvore filogenética de inferência bayesiana baseada na sequência completa do isolado FPI39 e outros begomovírus que infectam plantas do gênero *Phaseollus*.



Fonte: Dados da pesquisa (2023)

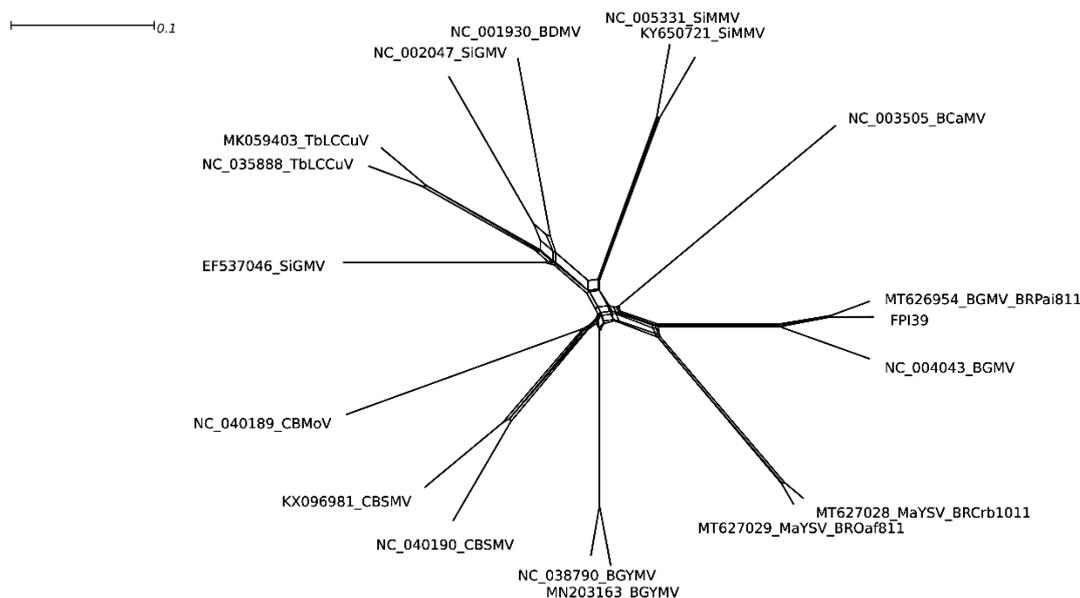
4.4 Análise de recombinação

O relacionamento filogenético inferido por análise reticulada baseada no dataset consistindo de FPI39 e outros begomovírus que infectam leguminosas, revelaram clara evidência de eventos de recombinação. Na rede para o DNA-B pode ser observada forte evidência que o isolado FPI39 foi originado a partir de evento de recombinação intraespecífica de outros isolados de BGMV, e recombinação intespecífica com MaYSV (Figura 07).

Para identificar os breakpoints de recombinação e possíveis sequências parentais o mesmo dataset foi analisado usando o Recombination Detection Program (RDP) 4 package (Tabela 2 em Anexo). Para excluir sinais de recombinação não confiáveis, apenas eventos suportados por ao menos 5 diferentes métodos foram selecionados. Dois eventos fortemente suportados foram encontrados. O primeiro evento, envolveu o isolado FPI39 com *breakpoints* na grande região comum (LIR) e extremidade N-terminal do gene *Nsp*, identificando a espécie BGMV como possível maior e menor parentais. Enquanto

o segundo evento em FPI39 foi detectado na região N-terminal do gene *Mp*, identificando como prováveis parentais MaYSV (menor) e BGMV (maior).

Figura 7. Análise reticulada baseada no DNA-B de FPI39 e outros Begomovirus que infectam leguminosas



Fonte: Dados da pesquisa (2023)

5. Discussão

Virose causadas por begomovírus são fatores limitantes para a produção de feijoeiro (*Phaseolus* spp.) na América do Sul (FARIA e MAXWELL, 1999; MORALES, 2006). Devido à grande importância socioeconômica dos feijoeiros no Brasil, a diversidade e estrutura genética de populações de begomovírus em feijão comum (*P. vulgaris*), feijão fava (*P. lunatus*) e hospedeiras não cultivadas como *Macroptilium* spp. têm sido acessada (FARIA e MAXWELL, 1999, SILVA et al., 2012; LIMA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014; XAVIER et al., 2021). No presente estudo, o levantamento sobre a diversidade de begomovírus em feijão fava mostrou que todas as amostras estavam infectadas, confirmando a elevada incidência e importância dessa virose em Alagoas. BGMV foi a espécie predominantemente encontrada em todas as áreas de coleta. Já MaYSV foi encontrada em menor frequência, e quase sempre em infecção mista com BGMV.

BGMV tem sido o begomovírus predominantemente encontrado infectando feijoeiros no Brasil (FARIA & MAXWELL, 1999; FARIA et al., 2000), sobretudo o feijão fava na Região Nordeste em 2005 (RAMOS-SOBRINHO, 2014). Este cenário vem sofrendo modificações desde que a espécie MaYSV foi descrita pela primeira vez em 2010 infectando leguminosas não cultivadas *Macroptilium lathyroides*, *Calopogonium mucunoides* e *Canavalia* sp. (SILVA et al., 2012). Em 2011, MaYSV expandiu sua gama de hospedeiras passando a infectar feijão comum e feijão fava destacando-se como o begomovírus mais comumente encontrado em leguminosas no nordeste brasileiro (LIMA et al 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Em Alagoas, MaYSV foi o único begomovírus ocorrendo em feijão comum, sobre o qual até então predominavam infecções causadas por BGMV. MaYSV também foi detectado em amostras de feijão fava e *Macroptilium lathyroides* provenientes respectivamente de Santana do Ipanema e Olho d'água das Flores. Sugerindo uma tendência da espécie MaYSV estar substituindo as populações dominantes de BGMV no Estado (RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Mas apesar de MaYSV ocorrer em fava, BGMV foi begomovírus obtido com maior frequência nessa hospedeira.

Dentre as 54 amostras positivas para o DNA-A de MaYSV apenas 12 foram positivas para DNA-B desta espécie, uma possível explicação para este ocorrido seria a dificuldade para se encontrar uma região comum em todos os isolados de MaYSV e, com isso, desenhar primers capazes de identificar todas as amostras deste vírus. Uma busca pela sequência dos primers MaYSV-Det_1311_For/ MaYSV-Det_1640_Rev em todos os isolados disponíveis no GenBank mostrou ao menos 2 isolados oriundos de Caruaru possuíam aproximadamente 7 nucleotídeos que diferiram na região em que os primers utilizados neste estudo deveriam ser anelados.

Considerando que todas as amostras negativas para o DNA-B de MaYSV foram positivas para o DNA-B de BGMV, não podemos descartar a possibilidade destas espécies serem cognatas e MaYSV estar usando o DNA-B de BGMV para movimentar-se no hospedeiro. Estudos adicionais são necessários para elucidar essas questões.

Nossos resultados em conjunto com os estudos realizados em 2005 e 2011 confirmam a predominância das infecções causadas por BGMV em feijão fava em Alagoas. No entanto, é possível observar avanço da propagação da espécie MaYSV que em 2011 estava restrita apenas a Santana do Ipanema (RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). MaYSV atualmente ocorre em sete outros municípios (Tabela 1 em Anexo), incluindo Arapiraca, Palmeira dos Índios, Santana do Mundaú e União dos Palmares onde apenas

havia relatos prévios de infecção por BGMV. Das 195 amostras de fava obtidas no presente trabalho, apenas duas, FPI21 e FPI39, testaram negativo para detecção com primers específicos para as espécies BGMV e MaYSV. No entanto, ambas as amostras testaram positivo para presença de begomovírus, indicando que outras espécies deste gênero poderiam estar ocorrendo em feijão fava em Alagoas. Em adição a BGMV e MaYSV, um isolado *Sida micranta mosaic virus* (SiMMV), uma begomovírus de planta não cultivada, foi encontrada causando sintomas de mosaico dourado, manchas cloróticas e distorção foliar em feijão no estado de Goiás (FERNANDES-ACIOLI et al., 2011).

Com o objetivo de realizar a identificação de espécies, relacionamento filogenético e contribuição da recombinação na variabilidade dos begomovírus provenientes das amostras FPI21 e FPI39, estas tiveram seu genoma completamente sequenciados. Uma única sequência do genoma completo do DNA-B foi obtida a partir da amostra FPI39, que compartilhou aproximadamente 96% de identidade nucleotídica com um isolado da espécie BGMV, também obtida de feijão fava no município de Palmeira dos Índios em 2011. De acordo com critérios estabelecidos pelo ICTV, isolados da mesma espécie de begomovírus devem compartilhar identidade nucleotídica do DNA-A maior ou igual a 91% (BROWN et al., 2015). Portanto, para confirmação da espécie faz-se necessária a obtenção da sequência completa do DNA-A cognato. Esse resultado não era esperado, uma vez que não foram obtidos amplicons para FPI39 quando usados primers específicos para a detecção dos componentes A e B de BGMV.

Na análise filogenética baseada na sequência completa do DNA-B, FPI39 agrupou em um clado contendo begomovírus brasileiros que infetam *Phaseolus* spp. FPI39 foi respectivamente, mais proximamente relacionado com o isolado de BGMV BR:Pai8:11 obtido de fava proveniente de Palmeira dos Índios-AL e um isolado de BGMV obtido de feijão comum oriundo de Goiás (Figura 6). Corroborando resultados encontrados por Ramos-Sobrinho et al. (2014), que demonstrou uma forte evidência de estruturação das populações de BGMV tanto por localização geográfica e/ou hospedeira. Onde nas árvores baseadas nas sequências dos genes Rep e Cp do DNA-A de BGMV, os isolados provenientes de feijão fava de Alagoas formaram clados separados das populações de BGMV obtidas de feijão comum em Minas Gerais, Goiás e Distrito Federal. Estudo baseado na análise do DNA-B mostrou que assim como ocorre no DNA-A, populações de begomovírus segregam com base na localização geográfica em escala global assim como em escala local. Adicionalmente foi observado que a subdivisão baseada na localização geográfica é clara para ambos os componentes (A e B) de BGMV, *Euphorbia*

yellow mosaic virus (EuYMV) e *Tomato rugose severe virus* (ToRSV), e em menor extensão para o DNA-A de MaYSV (XAVIER et al., 2021).

A recombinação é considerada uma das principais forças dirigindo a evolução de begomovírus (LEFEUVRE et al., 2007, 2009; LIMA et al. 2013, 2017; ROCHA et al., 2013; SALEEN et al. 2016, XAVIER et al., 2021). sendo responsável pelo surgimento de novas espécies e/ou isolados causando grandes prejuízos em culturas de importância econômica em todo o mundo (ZHOU et al., 1997; MONCI et al., 2002; IDRIS; BROWN, 2002; BRIDDON et al., 2014) A ocorrência de recombinação é estimulada pela infecção mista na qual duas ou mais espécies de vírus estão simultaneamente presentes em plantas individuais (ROCHA et al., 2013). Análises baseadas no DNA-A de populações de BGMV mostraram que a recombinação não ocorre com frequência, e os dois eventos detectados foram restritos a isolados obtidos de feijão fava em Alagoas. Além disso, a recombinação contribui para variabilidade relativamente mais alta em isolados de BGMV obtidos de feijão fava do que naqueles obtidos de feijão comum onde este mecanismo não foi detectado (RAMOS-SOBRINHO et al., 2014).

Elevada frequência de co-infecções das espécies BGMV e MaYSV numa mesma amostra foi aqui observada (Tabela 1 em Anexo). Evidência de recombinação intraespecífica e interespecífica foi encontrada na análise de filogenia reticulada respectivamente, entre o isolado FPI39 e BGMV, e FPI39 e MaYSV (Figura 7). Análises RDP confirmaram a presença de dois eventos únicos de recombinação: um evento identificando breakpoints na região intergênica maior (LIR) e *Nsp*; e o outro evento com breakpoints em *MP* (Tabela 2 em Anexo).

Diferentes estudos mostram que o DNA-B possui uma propensão muito maior para recombinar quando comparado com o DNA-A (HANLEY-BOWDOIN et al., 2013; XAVIER et al., 2021; DUBEY et al., 2023), que pode ser explicada pela sua reduzida complexidade organizacional e menor número de interações inter e intragenômicas de proteínas codificadas (HANLEY-BOWDOIN et al., 2013). A maioria dos eventos de recombinação no DNA-B de begomovírus do novo mundo têm breakpoints na região intergênica maior (LIR) que funciona como um hot spot, mas nenhum ocorrendo na origem de replicação viral (*v-ori*) (LEFREUVE et al., 2009). Análises baseadas na sequência completa de nucleotídeos do DNA-B de BGMV identificaram 4 eventos únicos de recombinação, os quais envolveram breakpoints na LIR, e LIR + *Nsp*, sendo este também encontrado no nosso estudo. Nenhum evento de recombinação foi encontrado na região intergênica menor (SIR) e em *MP* (XAVIER et al., 2021). Em concordância com

Xavier et al. (2021), no nosso estudo o evento de recombinação 1 também identificou breakpoints na região intergênica maior (LIR) + *Nsp*. No entanto, o evento 2 envolveu breakpoints em MP, considerada um cold spot de recombinação. Estudos prévios baseados nas sequências de nucleotídeos e aminoácidos têm demonstrado reduzido número de eventos de recombinação dentro dos genes *MP* e *Nsp* (LEFEUVRE et al., 2009; DUBEY et al., 2010). Além disso, que *Nsp* é mais diversa em sequência que *MP*, porém a recombinação não é responsável pela diversidade de sequência ou padrões evolutivos de dessas proteínas (DUBEY et al., 2023). A baixa diversidade em sequência de MP nos begomovírus do Novo Mundo é consistente com a altas pressões de seleção purificadora, perda da proteína V2 e possível emergência de novos sítios de fosforilação (Ho et al., 2014), enquanto *Nsp* pode ser complementada pela CP produzida pelo DNA-A. (Qin et al. 1998). Seleção negativa ou purificadora tem sido detectada como uma das principais forças seletivas atuando sobre populações de begomovírus (SILVA et al., 2012; LIMA et al. 2013; ROCHA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014; XAVIER et al., 2021), provavelmente porque a maioria das mutações tendem a ser deletérias (GARCIA-ARENAL; FRAILE; MALPICA, 2003; SEAL; VAN DEN BOSCH; JEGER, 2006). Análises de seleção de proteínas do DNA-B de BGMV mostraram que 67 sítios de MP e 48 sítios de NSP estão sob seleção negativa. Nenhum sítio em seleção positiva foi encontrado para MP, enquanto 6 foram encontrados para NSP (XAVIER et al., 2021). Sugerindo que o mecanismo de seleção purificadora pode ocorrer para preservar a função essencial de movimento viral intracelular (*Nsp*), intercelular (MP) e funções adicionais como supressão das defesas da planta exercidas por essas proteínas.

6. Conclusões

BGMV foi a espécie predominantemente encontrada em *P. lunatus* em todas as áreas de coleta. Já MaYSV foi encontrada em menor frequência, e quase sempre em infecção mista com BGMV. O isolado FPI39 é um provável recombinante entre BGMV e MaYSV.

REFERENCIAS

ADAMS, M. J. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology**, v.162, n.8 p.2505-2538, 2017.

ASSUNÇÃO NETO, W. V. et al. **Seleção de variedades crioulas de feijão fava para agricultura familiar**. Revista Caatinga, v. 35, n. 1, p. 137-147, 2022. Disponível em: <https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/caatinga/article/view/9841> .

AZZAM, O. et al. Whitefly Transmission and Efficient ssDNA Accumulation of Bean Golden Mosaic Geminivirus Require Functional Coat Protein. **Virology**, v. 204, n. 1, p. 289–296, 1994.

BARBOSA, G. J.; ARRIEL, N. H. C. Feijão-fava e a agricultura familiar de Serraria, PB. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 35, n. 3, p. 387-403, 2018. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/189650/1/Feijao-fava-e-a-agricultura-familiar.pdf>. Acesso 11 dez 2022.

BENEVIDES, C. M. J. et al. **Aspectos tecnológicos do subproduto de panc (farinhas de cajanus cajan e phaseolus lunatus): fortalecimento da agricultura familiar**.

Brazilian Journal of Development, v. 5, n. 11, p. 23221-23233, 2019. Disponível em: <https://brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/4342/4072>. Acesso 10 dez 2022.

BRIDDON, R. W. et al. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. **Virology**, v. 177, n. 1, p. 85–94, 1990.

BRIDDON. Effects of genetic changes to the begomovirus/betasatellite complex causing cotton leaf curl disease in South Asia post-resistance breaking. **Virus Research**, v. 186, p. 114-119, 2014.

BROWN, J. K. et al. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. **Archives of Virology**, v. 160, n. 6, p. 1593–1619, 2015.

CAVALCANTE, G. R. S.; VIEIRA, W. A. S.; MICHEREFF, S. J.; BARGUIL, B. M.; DOYLE, V. P.; CAMARA, M. P. S. First Report of anthracnose caused by *Colletotrichum sichuanensis* on *Phaseolus lunatus* in Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 102, n. 3, p. 680, 2018.

CHANG-SIDORCHUK, L., GONZÁLEZ, H., MARTÍNEZ-ZUBIAUR, Y., NAVAS-CASTILLO, J., & FIALLO-OLIVÉ, E. (2016). First report of Rhynchosia golden mosaic Yucatan virus infecting soybean in Cuba. **Journal of Plant Pathology**, 98(1).

CHOWDA-REDDY, R. V. et al. Role of a geminivirus AV2 protein putative protein kinase C motif on subcellular localization and pathogenicity. **Virus Research**, v. 135, n. 1, p. 115-124, 2008.

DRY et al. A novel subviral agent associated with a geminivirus: The first report of a DNA satellite. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 7088-7093, 1997.

EAGLE, P. A.; OROZCO, B. M.; HANLEY-BOWDOIN, L. A DNA sequence required for geminivirus replication also mediates transcriptional regulation. **The Plant Cell**, v. 6, n. 8, p. 1157-1170, 1994.

FARIA, J. C. E.; ZERBINI, F. M. Familia Geminiviridae: Taxonomia, replicação e movimento. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 8, p. 27-57, 2000.

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.; STANLEY. et al. Sequence analysis and classification of apparent recombinant begomoviruses infecting tomato in the Nile and Mediterranean basins. **Phytopathology**, v. 5, p. 549-555, 2005.

FERNANDES-ACIOLI, N. A. N. et al. Report of Tomato yellow spot virus infecting *Leonurus sibiricus* in Paraguay and within tomato fields in Brazil. **Plant Disease**, v. 98, n. 10, p. 1445-1445, 2014.

FERRO, M.M.M.; RAMOS-SOBRINHO, R.; XAVIER, C.A.D.; ZERBINI, F.M.; LIMA, G.s.A.; NAGATA, T.; ASSUNÇÃO, I.P.. New approach for the construction of infectious clones of a circular DNA plant virus using Gibson Assembly. **Journal Of Virological Methods**, [S.L.], v. 263, p. 20-23, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.10.017>

FIALLO-OLIVÉ E, CHIRINOS DT, POUÉY FG et al. Complete genome sequences of two begomoviruses infecting weeds in Venezuela. **Arch Virol**, p.158:277–280, 2013.

FIALLO-OLIVÉ, E.; NAVAS-CASTILLO, J., Molecular and biological characterization of a New World mono-/bipartite begomovirus/deltasatellite complex infecting *Corchorus siliquosus*. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 1755, 2020.

FONTENELLE, M. R. et al. Functional analysis of the naturally recombinant DNA-A of the bipartite begomovirus Tomato chlorotic mottle virus. **Virus Research**, v. 126, n. 1, p. 262-267, 2007.

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

FRISCHMUTH, T.; STANLEY, J. Printed in Great Britain Recombination between viral DNA and the transgenic coat protein gene of African cassava mosaic geminivirus. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 1265–1271, 1998.

GILBERTSON, R.L., BATUMAN, O., WEBSTER, C.G., ADKINS, S. (2015) Role of the insect supervectors *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis* in the emergence and global spread of plant viruses. **Annu Rev Virol** 2:67-93

HANLEY-BOWDOIN, L. et al. Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 777- 788, 2013.

HANLEY-BOWDOIN, L. et al. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 18, p. 71-106, 1999.

INOUE-NAGATA, A. K., LIMA, M. F.; GILBERTSON, R. L. 2016. A review of geminivirus (begomovirus) diseases in vegetables and other crops in brazil: current status and approaches for management. **Hort. Bras.** 34, 8-18, 2016.

JESKE H. Geminiviruses. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 331, p.185–226, 2009.

KING, A.M., ADAMS, M.J., LEFKOWITZ, E.J. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Elsevier**; 2012.

LAUFS, J. et al. Geminivirus replication: Genetic and biochemical characterization of rep protein function, a review. **Biochimie**, v. 77, n. 10, p. 765–773, 1995.

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

LEVY A, CZOSNEK H. The DNA-B of the non-phloem-limited bean dwarf mosaic virus (BDMV) is able to move the phloem-limited Abutilon mosaic virus (AbMV) out of the phloem, but DNA-B of AbMV is unable to confine BDMV to the phloem. **Plant Mol Biolo.** 2003; 53: 789–803 <https://doi.org/10.1023/B:PLAN.0000023662.25756.43>

LI, F. et al. The AC5 protein encoded by Mungbean yellow mosaic India virus is a pathogenicity determinant that suppresses RNA silencing-based antiviral defenses. **New Phytologist**, v. 208, n. 2, p. 555-569, 2015.

LIMA, A.T.M. et al. 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.

LOZANO, G. et al. Characterization of non-coding DNA satellites associated with sweepoviruses (Genus Begomovirus, Geminiviridae) - Definition of a distinct class of begomovirus-associated satellites. **Frontiers in Microbiology**, v.7, p,1–13, 2016.

MARTIN, S.; ELENA, S.F. Application of game theory to the interaction between plant viruses during mixed infections. **Journal of General Virology**, v. 90, p. 2815-2820, 2009.

MELGAREJO, T. A. et al. Characterization of a new world monopartite begomovirus causing leaf curl disease of tomato in Ecuador and Peru reveals a new direction in geminivirus evolution. **Journal of Virology**, v. 87, n. 10, p. 5397-5413, 2013.

- MORALES, F.J. Distribution and dissemination of begomoviruses in Latin America and the Caribbean. In: *Bemisia* bionomics and management of global pest; **Stansly PA & Naranjo SE** (eds), pp: 283-318, 2010.
- NIGAM, D. Genomic Variation and Diversification in Begomovirus Genome in Implication to Host and Vector Adaptation. *Plants* 2021, *10*, 1706. <https://doi.org/10.3390/plants10081706>
- NOUEIRY, A. O.; LUCAS, W. J.; GILBERTSON, R. L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell*, v. 76, n. 5, p. 925–932, 11 mar. 1994.
- PADIDAM, M.; BEACHY, R. N.; FAUQUET, C. M. The role of AV2 ('precoat') and coat protein in viral replication and movement in tomato leaf curl geminivirus. *Virology*, v. 224, n. 2, p. 390–404, 1996.
- PAPROTKA T, METZLER V, JESKE H. The complete nucleotide sequence of a new bipartite begomovirus from Brazil infecting Abutilon. *Arch Virol.*, v.155, n.5, p.813-6, 2010.
- PILARTZ, M.; JESKE, H. Mapping of Abutilon mosaic geminivirus minichromosomes. *Journal of Virology*, v.77, p.10808-10818, 2003.
- RAJA P et al. Viral genome methylation as an epigenetic defense against geminiviruses. *Journal of Virology.*, v.82, p. 8997–9007, 2008.
- RAMOS-SOBRINHO, R., et al. Contrasting genetic structure between two begomoviruses infecting the same leguminous Hosts. *Journal of General Virology*, v. 95, p. 2540–2552, 2014.
- RIZVI, I.; CHOUDHURY, N.R.; TUTEJA, N. Insights into the functional characteristics of geminivirus rolling-circle replication initiator protein and its interaction with host factors affecting viral DNA replication. *Archives of Virology*, v. 160, p. 375-387, 2015.
- ROJAS, M.R.; HAGEN, C.; LUCAS, W.J.; GILBERTSON, R.L. Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology*, v. 43, p. 361-394, 2005.
- ROMAY, G. et al. Tomato Twisted Leaf Virus: A novel Indigenous New World Monopartite Begomovirus Infecting Tomato in Venezuela. *Viruses*, n.11, v.327, p. 2- 11, 2019.
- ROSARIO et al. The Effect of Electronic Word of Mouth on Sales: A Meta-Analytic Review of Platform, Product, and Metric Factors. *Journal of Marketing Research*. V.53. p. 297-318 2016.
- ROSEN, R., KANAKALA, S., KLIOT, A., PAKKIANATHAN, B. C., FARICH, B. A., SANTANA-MAGAL, N., ELIMELECH, M., KONTSEDALOV, S., LEBEDEV, G., CILIA, M., Persistent, circulative transmission of begomoviruses by whitefly vectors. *Current Opinion In Virology*, [S.L.], v. 15, p. 1-8, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2015.06.008>.

ROY B, CHAKRABORTY P, GHOSH A How many begomovirus copies are acquired and inoculated by its vector, whitefly (*Bemisia tabaci*) during feeding? **PLoS ONE** 2021; v.16;10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258933>

SÁNCHEZ-CAMPOS, S. et al. 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.

SANDERFOOT, A. A.; INGHAM, D. J.; LAZAROWITZ, S. G. A viral movement protein as a nuclear shuttle: the geminivirus BR1 movement protein contains domains essential for interaction with BL1 and nuclear localization. **Plant Physiology**, v. 110, n. 1, p. 23-33, 1996.

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

SATTAR, M. NAEEM, et al. "Cotton leaf curl disease—an emerging threat to cotton production worldwide." **Journal of General Virology** 94.4 (2013): 695-710.

SCHOLTHOF K. B., ADKINS S., CZOSNEK H., PALUKAITIS P., JACQUOT E., HOHN T., et al. (2011). Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. **Mol. Plant Pathol.** 12, 938–954. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x>

SHIVAPRASAD, P. V. et al. Promoters, transcripts, and regulatory proteins of Mungbean yellow mosaic geminivirus. **Journal of Virology**, v. 79, n. 13, p. 8149-8163, 2005.

SILVA, S.J.C. et al. Species diversity, phylogeny and genetic variability of begomovirus populations infecting leguminous weeds in northeastern Brazil. **Plant Pathology**, v. 61, p. 457-467, 2012.

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

SUNG, Y. K.; COUTTS, R. H. Mutational analysis of potato yellow mosaic geminivirus. **Journal of General Virology**, v. 76, n. 7, p. 1773-1780, 1995.

SUNTER, G. et al. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required for coat protein accumulation while ORF AL3 is necessary for efficient DNA replication. **Virology**, v. 179, n. 1, p. 69-77, 1990

VANITHARANI, R. et al. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. **Journal of Virology**, v. 78, n. 17, p. 9487-9498, 2004.

VARSANI, A et al. Capulavirus and Grablovirus: Two new genera in the family Geminiviridae. **Archives of Virology**, v.162, p.1819–1831, 2017.

WALSH, D.; MOHR, I. Assembly of an active translation initiation factor complex by a viral protein. **Genes & Development**, v. 20, n. 4, p. 461-472, 2006.

ZERBINI F. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae. **Journal of General Virology**, v. 98, p.131-133, 2017.

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

ZHANG, J. et al. V2 protein encoded by Tomato yellow leaf curl China virus is an RNA silencing suppressor. *Virus Research*, v. 163, n. 1, p. 51-58, 2012.

ZHOU, X. Advances in Understanding Begomovirus Satellites. *Annual Review of Phytopathology*, v.51, n.1, p. 357–381, 2013.

ANEXOS

Tabela Suplementar 1. Amostras coletadas no estudo e detecção por PCR. FU: União dos Palmares; FSJ: São José da Laje; FPI: Palmeira dos Índios; FPJ: Paulo Jacinto; FB: Branquinha; FA: Arapiraca; FJ: Junqueiro; FL; Limoeiro de Anadia; FQ: Quebrangulo; FSM: Santana do Mundaú. PAL/PAR: Primers degenerados PAR1c496/PAL1v1978 para detecção de *Begomovirus*. BGMV (DNA-A): Primers BGMG-Det-1191_For/BGMV-Det-1768_Rev. BGMV (DNA-B): Primers BGMV-B-Det-1506_For/BGMV-B-Det-2444_Rev. MaYSV (DNA-A): Primers MaYSV-Det_1137_For/ MaYSV-Det_1427_Rev. MaYSV (DNA-B): Primers MaYSV-Det_1311_For/MaYSV-Det_1640_Rev

Isolado	PAL/ PAR	BGMV (DNA – A)	BGMV (DNA – B)	MaYSV (DNA – A)	MaYSV (DNA – B)	Infecção mista (DNA – A)	Infecção mista (DNA – B)
FU 1	+	+	+	+	-	+	-
FU 2	+	+	+	+	-	+	-
FU 3	+	+	+	+	-	+	-
FU 4	+	+	+	+	-	+	-
FU 5	+	+	+	-	-	-	-
FU 6	+	+	+	-	-	-	-
FU 7	+	+	+	-	-	-	-
FU 8	+	+	+	-	-	-	-
FU 9	+	+	+	-	-	-	-
FU 10	+	+	+	-	-	-	-
FU 11	+	+	+	-	-	-	-
FU 12	+	+	+	-	-	-	-
FU 13	+	+	+	-	-	-	-
FU 14	+	+	+	-	-	-	-
FU 15	+	+	+	+	-	+	-
FU 16	+	+	+	-	-	-	-
FU 17	+	+	+	-	-	-	-
FU 18	+	+	+	-	-	-	-
FU 19	+	+	+	-	-	-	-
FU 20	+	+	+	-	-	-	-
FSJ 1	+	+	+	-	-	-	-
FSJ 2	+	+	+	-	-	-	-
FSJ 3	+	+	+	-	-	-	-
FSJ 4	+	+	+	-	-	-	-
FSJ 5	+	+	+	-	-	-	-
FSJ 6	+	+	+	-	-	-	-
FSJ 7	+	+	+	-	-	-	-
FSJ 8	+	+	+	-	-	-	-
FSJ 9	+	+	+	-	-	-	-
FSJ 10	+	+	+	-	-	-	-
FSJ 11	+	+	+	-	-	-	-
FSJ 12	+	+	+	-	-	-	-
FSJ 13	+	+	+	-	-	-	-
FSJ 14	+	+	+	-	-	-	-
FSJ 15	+	+	+	-	-	-	-
FSJ 16	+	+	+	-	-	-	-

FSJ 17	+	+	+	-	-	-	-
FSJ 18	+	+	+	-	-	-	-
FSJ 19	+	+	+	-	-	-	-
FSJ 20	+	+	+	-	-	-	-
FPI 1	+	+	+	+	-	+	-
FPI 2	+	+	+	+	-	+	-
FPI 3	+	+	+	+	-	+	-
FPI 4	+	+	+	-	-	-	-
FPI 5	+	+	+	-	-	-	-
FPI 6	+	+	+	-	-	-	-
FPI 7	+	+	+	+	-	+	-
FPI 8	+	+	+	+	-	+	-
FPI 9	+	+	+	+	-	+	-
FPI 10	+	+	+	-	-	-	-
FPI 11	+	+	+	+	-	+	-
FPI 12	+	+	+	-	-	-	-
FPI 13	+	+	+	-	-	-	-
FPI 14	+	+	+	-	-	-	-
FPI 15	+	+	+	-	-	-	-
FPI 16	+	+	+	-	-	-	-
FPI 17	+	+	+	-	-	-	-
FPI 18	+	+	+	-	-	-	-
FPI 19	+	+	+	-	-	-	-
FPI 20	+	+	+	-	-	-	-
FPI 21	+	-	-	-	-	-	-
FPI 22	+	-	-	+	-	-	-
FPI 23	+	+	+	-	-	-	-
FPI 24	+	+	+	-	-	-	-
FPI 25	+	+	+	+	-	+	-
FPI 26	+	+	+	+	-	+	-
FPI 27	+	+	+	+	-	+	-
FPI 28	+	+	+	+	-	+	-
FPI 29	+	+	+	+	-	+	-
FPI 30	+	+	+	-	-	-	-
FPI 31	+	+	+	-	-	-	-
FPI 32	+	+	+	-	-	-	-
FPI 33	+	+	+	-	-	-	-
FPI 34	+	+	+	-	-	-	-
FPI 35	+	+	+	-	-	-	-
FPI 36	+	+	+	-	-	-	-
FPI 37	+	+	+	-	-	-	-
FPI 38	+	+	+	-	-	-	-
FPI 39	+	-	-	-	-	-	-
FPI 40	+	+	+	-	-	-	-
FPJ 1	+	+	+	-	-	-	-
FPJ 2	+	+	+	-	-	-	-

FPJ 3	+	+	+	-	-	-	-
FPJ 4	+	+	+	-	-	-	-
FPJ 5	+	+	+	-	-	-	-
FPJ 6	+	+	+	-	-	-	-
FPJ 7	+	+	+	-	-	-	-
FPJ 8	+	+	+	-	-	-	-
FPJ 9	+	+	+	-	-	-	-
FPJ 10	+	+	+	-	-	-	-
FPJ 11	+	+	+	-	-	-	-
FPJ 12	+	+	+	-	-	-	-
FPJ 13	+	+	+	-	-	-	-
FPJ 14	+	+	+	-	-	-	-
FPJ 15	+	+	+	-	-	-	-
FPJ 16	+	+	+	-	-	-	-
FPJ 17	+	+	+	-	-	-	-
FPJ 18	+	+	+	-	-	-	-
FPJ 19	+	+	+	-	-	-	-
FPJ 20	+	+	+	-	-	-	-
FB 1	+	+	+	-	-	-	-
FB 2	+	+	+	-	-	-	-
FB 3	+	+	+	-	-	-	-
FB 4	+	+	+	-	-	-	-
FB 5	+	+	+	-	-	-	-
FB 6	+	+	+	-	-	-	-
FB 7	+	+	+	-	-	-	-
FB 8	+	+	+	-	-	-	-
FB 9	+	+	+	-	-	-	-
FB 10	+	+	+	-	-	-	-
FB 11	+	+	+	-	-	-	-
FB 12	+	+	+	-	-	-	-
FB 13	+	+	+	-	-	-	-
FB 14	+	+	+	-	-	-	-
FB 15	+	+	+	-	-	-	-
FB 16	+	+	+	-	-	-	-
FB 17	+	+	+	+	-	+	-
FB 18	+	+	+	-	-	-	-
FB 19	+	+	+	-	-	-	-
FB 20	+	+	+	-	-	-	-
FA 1	+	+	+	-	-	-	-
FA 2	+	+	+	+	-	+	-
FA 3	+	+	+	+	-	+	-
FA 4	+	+	+	+	-	+	-
FA 5	+	+	+	-	-	-	-
FA 6	+	+	+	+	-	+	-
FA 7	+	+	+	+	+	+	+
FA 8	+	+	+	+	+	+	+

FA 9	+	+	+	+	+	+	+
FA 10	+	+	+	+	+	+	+
FA 11	+	+	+	+	+	+	+
FA 12	+	+	+	+	+	+	+
FA 13	+	+	+	+	+	+	+
FA 14	+	+	+	+	+	+	+
FA 15	+	+	+	+	+	+	+
FA 16	+	+	+	+	+	+	+
FA 17	+	+	+	+	+	+	+
FA 18	+	+	+	+	+	+	+
FA 19	+	+	+	+	-	+	-
FA 20	+	+	+	+	-	+	-
FJ 1	+	+	+	+	-	+	-
FJ 2	+	+	+	+	-	+	-
FJ 3	+	+	+	+	-	+	-
FJ 4	+	+	+	+	-	+	-
FJ 5	+	+	+	+	-	+	-
FJ 6	+	+	+	-	-	-	-
FJ 7	+	+	+	-	-	-	-
FJ 8	+	+	+	+	-	+	-
FJ 9	+	+	+	-	-	-	-
FJ 10	+	+	+	+	-	+	-
FJ 11	+	+	+	+	-	+	-
FJ 12	+	+	+	+	-	+	-
FL 1	+	+	+	+	-	+	-
FL 2	+	+	+	+	-	+	-
FL 3	+	+	+	-	-	-	-
FL 4	+	+	+	+	-	+	-
FL 5	+	+	+	-	-	-	-
FL 6	+	+	+	+	-	+	-
FL 7	+	+	+	-	-	-	-
FL 8	+	+	+	-	-	-	-
FL 9	+	+	+	-	-	-	-
FL 10	+	+	+	-	-	-	-
FL 11	+	+	+	-	-	-	-
FL 12	+	+	+	-	-	-	-
FL 13	+	+	+	-	-	-	-
FQ 1	+	+	+	-	-	-	-
FQ 2	+	+	+	-	-	-	-
FQ 3	+	+	+	-	-	-	-
FQ 4	+	+	+	-	-	-	-
FQ 5	+	+	+	-	-	-	-
FQ 6	+	+	+	-	-	-	-
FQ 7	+	+	+	+	-	+	-
FQ 8	+	+	+	-	-	-	-
FQ 9	+	+	+	-	-	-	-

FQ 10	+	+	+	-	-	-	-
FQ 11	+	+	+	-	-	-	-
FQ 12	+	+	+	-	-	-	-
FQ 13	+	+	+	-	-	-	-
FQ 14	+	+	+	+	-	+	-
FSM 1	+	+	+	+	-	+	-
FSM 2	+	+	+	-	-	-	-
FSM 3	+	+	+	-	-	-	-
FSM 4	+	+	+	-	-	-	-
FSM 5	+	+	+	-	-	-	-
FSM 6	+	+	+	-	-	-	-
FSM 7	+	+	+	-	-	-	-
FSM 8	+	+	+	-	-	-	-
FSM 9	+	+	+	-	-	-	-
FSM 10	+	+	+	-	-	-	-
FSM 11	+	+	+	+	-	+	-
FSM 12	+	+	+	-	-	-	-
FSM 13	+	+	+	-	-	-	-
FSM 14	+	+	+	-	-	-	-
FSM 15	+	+	+	-	-	-	-
FSM 16	+	+	+	-	-	-	-

Fonte: Dados da pesquisa (2022)

Tabela suplementar 2. Eventos de Recombinação detectados na amostra FPI39 baseados na sequência completa de DNA -B.

Events	Breakpoints		Recombinant	Parents		Methods	P values	
	Begin	End		Minor	Major		Lowest	Highest
1	2574	582	19S1	NC_004043_BGMV	MT626954_BGMV_BRPai811	RBM C S3	3.19E-09	2.43E-02
2	1396	1478	19S1	MT627029_MaYSV_BROaf811	NC_004043_BGMV	R GMC3	1.03E-07	3.89E-02

¹ O início é marcado no primeiro nucleotídeo após o local de clivagem na origem da replicação e aumenta no sentido horário. ² R, RDP; G, GeneConv; B, Bootscan; M, MaxChi; C, Chimera; S, SisScan; 3, 3SEQ. ³ Os valores de P relatados são para os métodos indicados em vermelho e em negrito, em vermelho estão os valores P mais baixos e em negrito os valores P mais altos calculados para a região em questão.

Fonte: Dados da pesquisa (2023)