



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



**MAYRA MACHADO DE MEDEIROS FERRO**

**CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CLONES INFECCIOSOS DOS  
BEGOMOVÍRUS *Bean golden mosaic virus* E *Macrotidium yellow spot virus***

Rio Largo - AL  
2019

**MAYRA MACHADO DE MEDEIROS FERRO**

**CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CLONES INFECCIOSOS DOS  
BEGOMOVÍRUS *Bean golden mosaic virus* E *Macroptilium yellow spot virus***

Tese de Doutorado 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 Doutora em Proteção de Plantas.

Orientadora: Prof. Dra. Iraildes Pereira Assunção  
Coorientador: Dr. Roberto Ramos Sobrinho  
Coorientador: Prof. Dr. Tatsuya Nagata

Rio Largo - AL  
2019

Catálogo na fonte  
Universidade Federal de Alagoas  
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias  
Bibliotecário: Erisson Rodrigues de Santana

F395c Ferro, Mayra Machado de Medeiros

Construção e caracterização de clones infecciosos dos  
begomovírus *Bean golden mosaic virus* e *Macrotium yellow spot  
virus*. Rio Largo-AL – 2019.

72 f.; il; 33 cm

Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) - Universidade Federal  
de Alagoas, Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2019.

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iraildes Pereira  
Assunção

Coorientador: Dr. Roberto Ramos Sobrinho

Coorientador: Prof. Dr. Tatsuya Nagata

1. Gibson assembly. 2. Clone infeccioso. 3. geminivírus. I.  
Título.

CDU: 632: 635.652

MAYRA MACHADO DE MEDEIROS FERRO

CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CLONES INFECCIOSOS DOS  
BEGOMOVÍRUS *Bean golden mosaic virus* E *Macropodium yellow spot virus*

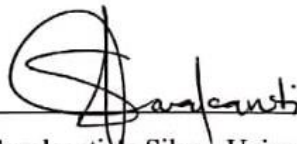
Tese submetida ao corpo docente do Programa de  
Pós-Graduação em Proteção de Plantas, do Centro  
de Ciências Agrárias da Universidade Federal de  
Alagoas.



---

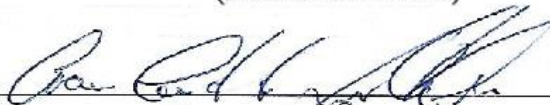
Prof.ª Dr.ª Iraildes Pereira Assunção - Universidade Federal de Alagoas (Orientadora)

**Banca Examinadora:**



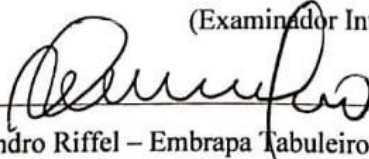
---

Prof.ª Dr.ª Sarah Jacqueline Cavalcanti da Silva - Universidade Federal de Alagoas  
(Examinador Interno)



---

Prof. Dr. Cícero Carlos de Souza Almeida - Universidade Federal de Alagoas  
(Examinador Interno)



---

Dr. Alessandro Riffel – Embrapa Tabuleiros Costeiros (Examinador Externo)

Rio Largo - AL  
2019

## AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo, por sempre me guiar em todos os momentos da minha trajetória e por dar-me coragem para enfrentar todos os desafios;

Aos meus queridos pais, Benedito Ferro e Rosangela Ferro, pelo amor, incentivo e apoio em todas as horas;

Aos meus irmãos Mayara Ferro e Madson Ferro por sempre estarem ao meu lado;

A todos familiares e amigos que contribuíram para meu crescimento;

Aos professores Drs. Iraildes Assunção e Gaus Silvestre pela oportunidade, confiança, orientação, incentivo, paciência, pelo apoio durante toda minha jornada desde a graduação, ensinamentos que foram fundamentais para minha formação. Serei sempre grata;

Ao Dr. Roberto Ramos pela amizade, pelos ensinamentos, orientação, por sempre acreditar na minha capacidade, paciência e apoio durante minha trajetória no mestrado e doutorado. Serei sempre grata;

Ao professor Dr. Tatsuya Nagata pelo acolhimento, oportunidade, ensinamentos, orientação, pela paciência nas discussões, compreensão nas horas de dificuldade e pelo exemplo de profissionalismo. Serei sempre grata;

A Dra. Sarah Cavalcanti pela amizade, confiança depositada em mim, apoio de sempre e pelos ensinamentos. Serei sempre grata;

A todos os companheiros que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Fitopatologia Molecular e Virologia Vegetal pela amizade, ajuda mútua e ensinamentos durante todo esse período;

A todos os companheiros do Departamento de Biologia Celular – UnB, pela receptividade, pela amizade, ensinamentos, risos diários, amei conhecê-los;

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Proteção de Plantas CECA-UFAL pelos conhecimentos passados, que contribuíram para a minha formação;

A todos os meus colegas do Programa de Pós-graduação em Proteção de Plantas do CECA-UFAL;

À CAPES pela bolsa de doutorado concedida, o que me permitiu adquirir inúmeros conhecimentos incluindo os fundamentais para a realização desse trabalho;

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*Obrigada!*

## RESUMO GERAL

Os feijoeiros (*Phaseolus* spp.) são de grande importância socioeconômica em regiões tropicais e subtropicais e estão entre os itens mais tradicionais da culinária brasileira, apresentando notável valor nutricional. O gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) está entre o grupo de patógenos mais prejudiciais que infectam essas culturas, sendo considerado fator limitante em áreas produtoras. Os begomovírus possuem DNA circular de fita simples, são transmitidos por um complexo de espécies crípticas da mosca-branca *Bemisia tabaci*, com hospedeiros não-cultivados atuando como reservatórios desses vírus. *Bean golden mosaic virus* (BGMV) e *Macrotium yellow spot virus* (MaYSV) são as duas espécies de maior importância econômica infectando feijoeiros no Brasil. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo a obtenção de clones infecciosos a partir de isolados de BGMV e MaYSV usando a técnica de Gibson Assembly (GA), e a determinação da gama de hospedeiros de MaYSV. Clones dos componentes DNA-A e DNA-B de BGMV (173AL) e MaYSV (100AL) foram usados para aplicação da metodologia de construção de clones infecciosos por GA. Alíquotas das reações de GA foram utilizadas para transformar células eletrocompetentes de *Escherichia coli* DH10B, a ligação dos fragmentos virais em vetor binário pJL-89 foi confirmada por digestão enzimática e sequenciamento. DNA plasmidial das construções confirmadas foi utilizado para transformação de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa GV3101), e a infectividade dos clones de cada espécie viral foi testada individualmente via agroinoculação em plantas de feijão comum 'cv. Pérola', as quais foram monitoradas por 30 dias para observação do aparecimento de sintomas. DNA total foi extraído a partir de amostras foliares (infectadas sistemicamente) coletadas aos 15 e 30 dias após agroinfiltração (daa), e utilizado como template para detecção viral utilizando primers espécie-específicos. As plantas agroinoculadas com os clones infecciosos apresentaram sintomas de mosaico amarelo severo 15 daa, enquanto as plantas controle (agroinoculadas com pJL-89 sem insertos virais) foram assintomáticas. Ambos os componentes genômicos DNA-A e DNA-B de BGMV e MaYSV foram detectados em folhas infectadas sistemicamente. Gibson Assembly mostrou ser uma técnica rápida e útil para a construção de clones infecciosos de fitovírus com DNA circular. Nos testes de gama de hospedeiros, dentre as espécies testadas, foi constatada a infecção viral nas espécies *P. vulgaris*, *N. benthamiana* e *S. lycopersicum*. Sintomas de mosaico e subdesenvolvimento foram observados apenas em feijão-comum.

**Palavras-chave:** Gibson Assembly, clone infeccioso, geminivírus.

## ABSTRACT

Bean plants (*Phaseolus* spp.) are of great socioeconomic importance in tropical and subtropical regions and are among the most traditional Brazilian culinary items, presenting remarkable nutritional value. The genus *Begomovirus* (family *Geminiviridae*) is among the group of most harmful pathogens that infect these crops, being considered a limiting factor in producing areas. Begomoviruses have single-stranded circular DNA and are transmitted by a complex of cryptic species of *Bemisia tabaci*, with noncultivated hosts acting as reservoirs of these viruses. *Bean golden mosaic virus* (BGMV) and *Macroptilium yellow spot virus* (MaYSV) are the two most economically important species infecting beans in Brazil. In this context, the present study aimed to obtain infectious clones from BGMV and MaYSV isolates using the Gibson Assembly (GA) technique, and to determine the host range of MaYSV. Clones of the DNA-A and B-DNA components of BGMV (173AL) and MaYSV (100AL) were used to apply the methodology for constructing infectious clones by GA. Aliquots of the GA reactions were used to transform *Escherichia coli* DH10B electrocompetent cells, binding of the viral fragments into pJL-89 binary vector was confirmed by enzymatic digestion and sequencing. Plasmid DNA from the confirmed constructs was used for transformation of *Agrobacterium tumefaciens* (strain GV3101), and the infectivity of the clones of each viral species was tested individually via agroinoculation in common bean 'cv. Pérola', which were monitored for 30 days to observe the appearance of symptoms. Total DNA was extracted from leaf samples (systemically infected) collected at 15- and 30-days post agroinfiltration (dpa), and used as template for viral detection using species-specific primers. Inoculated plants with infectious clones showed symptoms of severe yellow mosaic 15 daa, whereas control plants (agroinoculated with pJL-89 without viral inserts) were asymptomatic. Both genomic DNA-A and B-DNA components of BGMV and MaYSV were detected in systemically infected leaves. GA has been shown to be a rapid and useful technique for the construction of infectious clones of plant viruses with circular DNA. For the host range experiments, among the analyzed species, viral infection was verified in the species *P. vulgaris*, *N. benthamiana* and *S. lycopersicum*. Symptoms of mosaic and stunting were observed only in common bean.

**Key words:** Gibson Assembly, infectious clone, geminiviruses.

## LISTA DE FIGURAS

### *Revisão de literatura*

- Figura 1 – Organização genômica dos begomovírus..... 15  
Figura 2 - Etapas da reação de Gibson Assembly..... 17

### *Capítulo 1*

- Figura 1 - Strategy to construct dimeric agroinfectious clone of BGMV into pJL-89 binary vector ..... 46  
Figura 2 - Agroinoculation tests using infectious clone of BGMV..... 47  
Figura suplementar 1 - PCR-GA approach for construction of infectious clones of circular DNA plant viruses as begomoviruses.....48

### *Capítulo 2*

- Figura 1 - Estratégia para construção do clone agroinfectioso dimérico de MaYSV em vetor binário pJL-89. .... 62  
Figura 2 - Padrão eletroforético das reações de digestão com *Bam*HI (DNA-A) e *Spe*I (DNA-B) dos clones de MaYSV.....63  
Figura 3 - Teste de agroinoculação usando o clone infeccioso de MaYSV.....63  
Figura 4 - Sintomas observados em plantas de *P. vulgaris* agroinoculadas com o clone infeccioso de MaYSV.....64  
Figura 5 - Padrão eletroforético da confirmação da infecção viral via PCR em plantas de *N. benthamiana*.....64



## LISTA DE TABELAS

### *Capítulo 1*

Table 1 - Primer sequences used for amplification of BGMV DNA-A and DNA-B genomic components and pJL-89 binary vector.....	44
--	----

### *Capítulo 2*

Tabela 1 - Sequências de primers usados para amplificação dos componentes genômicos DNA-A e DNA-B de MaYSV e do vetor binário pJL89.....	60
Tabela 2 - Avaliação da infecção de plantas agroinoculadas com clone infeccioso de MaYSV.....	61

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	9
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	11
2.1 A cultura dos feijoeiros .....	11
2.2 A família <i>Geminiviridae</i> .....	12
2.3 O gênero <i>Begomovirus</i> .....	13
2.4 Métodos utilizados para identificação de espécies de begomovírus e construção de clones infecciosos.....	15
2.5 Organização genômica e papel desempenhado pelas proteínas dos <i>Begomovirus</i> .....	17
2.6 Diversidade de <i>Begomovirus</i> infectando feijoeiros e <i>Macroptilium lathyroides</i> .....	20
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	23
<b>3 CAPÍTULO I: NEW APPROACH FOR THE CONSTRUCTION OF AN INFECTIOUS CLONE OF A CIRCULAR DNA PLANT VIRUS USING GIBSON ASSEMBLY</b> .....	35
ABSTRACT.....	37
MANUSCRIPT.....	38
REFERENCES.....	41
<b>4 CAPÍTULO II: CONSTRUÇÃO DE CLONE INFECCIOSO E DETERMINAÇÃO DA GAMA DE HOSPEDEIROS DO BEGOMOVÍRUS <i>Macroptilium yellow spot virus</i></b> .....	49
RESUMO.....	50
ABSTRACT.....	51
<b>4.1 INTRODUÇÃO</b> .....	52
<b>4.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	53
4.2.1 Isolado viral e obtenção dos clones de MaYSV.....	53
4.2.2 Construção de clone infeccioso de MaYSV por Gibson Assembly.....	53
4.2.3 Ensaios de agroinfiltração do clone infeccioso de MaYSV.....	54
4.2.4 Determinação da gama de hospedeiros de MaYSV.....	55
<b>4.3 RESULTADOS</b> .....	55
4.3.1 Confirmação da construção do clone infeccioso de MaYSV por Gibson Assembly. ....	55
4.3.2 Infectividade do clone infeccioso de MaYSV .....	56
4.3.3 Determinação da gama de hospedeiros de MaYSV .....	56
<b>4.4 DISCUSSÃO</b> .....	56
<b>4.5 CONCLUSÃO</b> .....	59
<b>4.6 REFERÊNCIAS</b> .....	65

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

*Phaseolus vulgaris* (feijão comum) e *P. lunatus* (feijão-fava) são hortaliças pertencentes à família Fabaceae, e apresentam elevada importância socioeconômica (CARNEIRO, 2005). O Brasil é um importante produtor mundial de feijão. No ano de 2018, o país produziu cerca de 2,9 milhões de toneladas de feijão plantadas em uma área de 2,9 milhões de hectares, com a região Nordeste produzindo cerca de 560 mil toneladas (IBGE, 2018). Dentre os fatores que proporcionam a queda de produtividade na cultura do feijoeiro, destacam-se as begomoviroses, as quais provocam perdas econômicas que podem variar de 40% a 100% (QUINTELA et al., 2008).

A família *Geminiviridae* engloba vírus cujo genoma é constituído por DNA circular de fita simples (ssDNA) encapsidado em partícula geminada de morfologia quasi-icosaédrica (BROWN et al., 2012). A família é composta pelos gêneros *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Mastrevirus*, *Topocovirus*, *Turncurtovirus*, separados por características como gama de hospedeiros, tipo de inseto vetor, organização genômica e relacionamento filogenético (VARSANI et al, 2014; 2017). O gênero *Begomovirus* possui um (monopartido) ou dois (bipartido) componentes genômicos conhecidos como DNA-A e DNA-B, são transmitidos por um complexo de espécies crípticas da mosca-branca *Bemisia tabaci* (BARBOSA et al., 2014; NAVAS-CASTILLO et al., 2011) e infectam plantas dicotiledôneas. No DNA-A encontram-se os genes envolvidos na replicação e encapsidação da progênie viral, enquanto no DNA-B encontram-se os genes responsáveis pelos movimentos intra e intercelular (LAZAROWITZ, 1992). Geralmente, ambos os componentes são requeridos para a infecção sistêmica do hospedeiro (BROWN et al., 2012; 2015).

Diversas espécies de begomovírus têm sido relatadas infectando hospedeiras leguminosas cultivadas, sendo *Bean golden mosaic virus* (BGMV) e *Macroptilium yellow spot virus* (MaYSV) os de maior importância econômica no Brasil (FAUQUET et al., 2008; LIMA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Além de infectarem plantas cultivadas, os begomovírus também infectam hospedeiras não-cultivadas pertencentes à família Fabaceae como *Macroptilium lathyroides* (MORALES; ANDERSON, 2001). As espécies *Macroptilium yellow mosaic virus* (MaYMV-[JM]), *Macroptilium yellow mosaic Florida virus* (MaYMFV), *Macroptilium mosaic Puerto Rico virus* (MaMPRV) e MaYSV são vírus descritos a partir de *Macroptilium* e 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).

No Brasil, o BGMV foi inicialmente descrito em 1960 no Estado de São Paulo, não sendo relatada importância econômica (COSTA, 1975). Posteriormente, este vírus foi identificado como pertencente ao gênero *Begomovirus*, passando a ter grande relevância já na década seguinte, sobretudo em função da forte expansão de lavouras de soja e populações do inseto vetor (INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016). O BGMV foi considerado durante muito tempo como o único begomovírus de importância econômica em feijoeiros no Brasil, levando a aprovação do feijão comum transgênico Embrapa 5.1 resistente ao BGMV (ARAGÃO et al., 2013). Entretanto, estudos sugerem a emergência do MaYSV como um dos principais begomovírus em campos de cultivo no Nordeste do Brasil, indicando que BGMV já não é mais o único begomovírus de relevância econômica para os feijoeiros (RAMOS-SOBRINHO et al., 2014).

Devido à grande importância dos begomovírus descritos em feijoeiros, faz-se necessário a realização de estudos adicionais para uma melhor compreensão da interação vírus/hospedeiro/vetor. A obtenção de clones infecciosos tem se mostrado fundamental para avaliação do processo infeccioso dos diferentes vírus isoladamente ou em infecções mistas. Além disso, auxilia programas de melhoramento genético de plantas cultivadas visando resistência. Portanto, o presente estudo teve como objetivo a obtenção de clone infeccioso a partir de isolados de BGMV e MaYSV, usando a técnica de Gibson Assembly, e a determinação da gama de hospedeiros de MaYSV.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A cultura dos feijoeiros

A família Fabaceae possui cerca de 727 gêneros e 19.325 espécies amplamente distribuídas em todo o mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (LEWIS et al., 2005). Com origem tanto nos Andes como na Mesoamérica, *Phaseolus* é um dos principais gêneros dentro dessa família, sendo constituído por cerca de 55 espécies, das quais cinco são cultivadas: *Phaseolus vulgaris* (feijão comum), *P. lunatus* (feijão-fava), *P. coccineis* (ayocate), *P. acutifolius* (tepari) e *P. polyanthus* (petaco) (CARNEIRO, 2005). No Brasil, a espécie mais amplamente cultivada é *P. vulgaris*, porém *P. lunatus* é também bastante utilizada na alimentação humana e animal, fornecendo proteína vegetal e diminuindo a dependência quase exclusiva dos feijões do grupo Carioca (VIEIRA, 1992; PEGADO et al., 2008).

Espécies do gênero *Phaseolus* fornecem componentes fundamentais na dieta humana como proteínas (é a principal fonte deste nutriente em populações de baixa renda), ferro, cálcio, magnésio, zinco, vitaminas (sobretudo do complexo B), carboidratos e fibras. Trata-se de um dos mais tradicionais alimentos presentes na culinária brasileira, apresentando notável valor nutricional e socioeconômico (MESQUITA et al., 2007).

A produção mundial de feijões situa-se em torno de 31,4 milhões de toneladas, ocupando uma área de 36,4 milhões de hectares (FAO, 2017). Segundo dados do IBGE, no ano de 2018, o Brasil produziu cerca de 2,9 milhões de toneladas de feijão, plantados em uma área de 2,9 milhões de hectares, sendo os principais estados produtores Paraná, Minas Gerais e Bahia. No mesmo ano, a região Nordeste produziu cerca de 560 mil toneladas (IBGE, 2018). O rendimento médio da produção nacional de fava em grão, no ano de 2015, foi de 217 kg/ha e na região Nordeste foi de 215 kg/ha (IBGE, 2015).

Existem diversos agentes fitopatogênicos que podem incidir na cultura dos feijoeiros e provocar perdas na qualidade e rendimento. As begomoviroses, por exemplo, provocam perdas econômicas 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).

## 2.2 A família *Geminiviridae*

A família *Geminiviridae* é composta pelos gêneros *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Mastrevirus*, *Topocovirus*, *Turncurtovirus*. Essa divisão é baseada em características como gama de hospedeiros, tipo de inseto vetor, organização genômica e relacionamento filogenético (VARSANI et al, 2014; 2017; ZERBINI et al., 2017). Os geminivírus possuem genoma constituído por DNA circular de fita simples (ssDNA), com tamanho variando entre 2,6 a 5,2 kb e encapsidados em partículas geminadas de morfologia quasi-icosaédrica (BROWN et al., 2012; 2015). A maioria dos gêneros da família é monopartido, com exceção do *Begomovirus* que pode possuir um ou dois (bipartidos) componentes genômicos. Cada partícula geminada possui uma única molécula de ssDNA e, no caso dos *Begomovirus* bipartidos, dois vírions contendo os diferentes componentes genômicos (DNA-A e DNA-B) são necessários para o estabelecimento da infecção sistêmica da planta hospedeira (BROWN et al., 2012; 2015).

Esta família de vírus infecta plantas mono e dicotiledôneas, sendo frequentemente responsáveis por perdas de rendimento em culturas economicamente importantes (INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016), além de infectar plantas ornamentais e daninhas/silvestres (HANLEY-BOWDOIN et al., 2013). Vários geminivírus causam impacto econômico e social em diferentes continentes. Por exemplo, os begomovírus *Bean golden mosaic virus* (BGMV) e *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) têm importância em feijoeiros nas Américas; *Beet curly top virus* (BCTV; *Curtovirus*) em beterraba açucareira na América do Norte e Oriente Médio; *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV; *Begomovirus*) infecta tomateiros na Europa, África, Ásia, América Central, Caribe, Estados Unidos e Austrália; *African cassava mosaic virus* (ACMV; *Begomovirus*) causa prejuízos em mandioca, e *Maize streak virus* (MSV; *Mastrevirus*) em milho na África; *Wheat dwarf virus* (WDV; *Mastrevirus*) em trigo na Europa; *Cotton leaf curl virus* (CLCuV; *Begomovirus*) em algodoeiro na Ásia (HANLEY-BOWDOIN et al., 2013; SCHUBERT et al., 2014; INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016), com algumas espécies sendo capazes de provocar perdas de até 100% (LEGG; FAUQUET, 2004; SHEPHERD et al., 2010; SATTAR et al., 2013).

Os geminivírus são transmitidos por insetos que se alimentam do floema, incluindo diferentes espécies de cigarrinhas, moscas-brancas do complexo de espécies crípticas *Bemisia tabaci*, membracídeos e afídeos (INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016). Os gêneros *Eragrovirus* e *Grablovirus* são os únicos membros da família onde os vetores permanecem desconhecidos (VARSANI et al., 2014; 2017). Os sintomas típicos de infecções

causados por geminivírus incluem deformação foliar, enrolamento, amarelecimento, nanismo, mosaico e/ou estriações (VARSANI et al., 2017).

### 2.3 O gênero *Begomovirus*

Dentre os geminivírus, o gênero *Begomovirus* (espécie tipo *Bean golden yellow mosaic virus* - BGYMV) é aquele que conta com o maior número de espécies (VARSANI et al., 2014). Atualmente são reconhecidas 388 espécies pelo *International Comitee on Taxonomy of Viruses* – ICTV (<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>), enfatizando assim a importância desse gênero dentro da família (BROWN et al., 2015). Este gênero inclui os mais importantes vírus nas regiões tropicais e subtropicais, são transmitidos por um complexo de espécies crípticas de *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) (BROWN et al., 2012; 2015; NAVAS-CASTILLO; FIALLO-OLIVÉ; SÁNCHEZ-CAMPOS, 2011) e infectam plantas dicotiledôneas (STANLEY et al., 2005; FARIA et al., 2000).

Baseado na organização genômica, diversidade genética e distribuição geográfica, os begomovírus são divididos em dois grupos: begomovírus do “Velho Mundo” (VM) (Europa, África, Ásia e Austrália) e do “Novo Mundo” (NM) (Américas). Os begomovírus do VM apresentam um ou dois componentes genômicos e frequentemente estão associados a moléculas de ssDNA satélites denominados alfassatélites (anteriormente DNA-1) e betassatélites (anteriormente DNA  $\beta$ ) (FAUQUET; STANLEY, 2005; ZHOU et al., 2013; LOZANO et al., 2016; ROSARIO et al., 2016) (Figura 1).

O primeiro begomovírus relatado em associação com um betassatélites foi o *Ageratum yellow vein virus* (AYVV). Desde então, vários outros begomovírus têm sido reportados e, devido ao número crescente de relatos de betassatélites, um sistema de classificação e nomenclatura foi proposto para estes componentes (BRIDDON et al., 2008), no qual já se observam listadas 61 espécies no ICTV. Nenhum betassatélite foi detectado em associação com vírus nativos do NM, apesar das tentativas de detecção direcionadas especificamente para estas moléculas enquanto se investigava alfassatélites (ROMAY et al., 2010; ROSARIO et al., 2016).

A maioria dos begomovírus encontrados no NM apresenta dois componentes genômicos denominados DNA-A e DNA-B, com relatos de ocorrência de associação a alfassatélites (PAPROTKA; METZLER; JESKE, 2010; ROMAY et al., 2010). Os poucos begomovírus monopartidos nativos do NM são: *Tomato leaf deformation virus* (ToLDeV; SÁNCHEZ-CAMPOS et al., 2013; MELGAREJO et al., 2013), *Tomato mottle leaf curl virus* (ToMoLCV; VU et al., 2015) e *Tomato severe leaf curl virus* (ToSLCV; GILBERTSON et al., 2015). No

início da década de 1990, o TYLCV, um begomovírus monopartido nativo do VM, foi introduzido na República Dominicana e, atualmente encontra-se presente em toda América Central, Caribe e Estados Unidos (NAHKLA et al., 1994; DUFFY; HOLMES, 2007).

Alfassatélites foram identificados no Brasil e na Venezuela associados aos begomovírus bipartidos *Cleome leaf crumple virus* (CILCrV), *Euphorbia mosaic virus* (EuMV) e *Melon chlorotic mosaic virus* (MeCMV), sendo esses os primeiros relatos de alfassatélites associados a begomovírus ocorrendo naturalmente no NM (PAPROTKA; METZLER; JESKE, 2010; ROMAY et al., 2010). Recentemente, DNAs satélites foram detectados em mosca-branca com a abordagem VEM (*vector enabled metagenomics*) na Guatemala e em Porto Rico, sendo demonstradas associações entre begomovírus e alfassatélites, o que sugere que a distribuição destas moléculas está bem difundida pelo continente americano (ROSARIO et al., 2016).

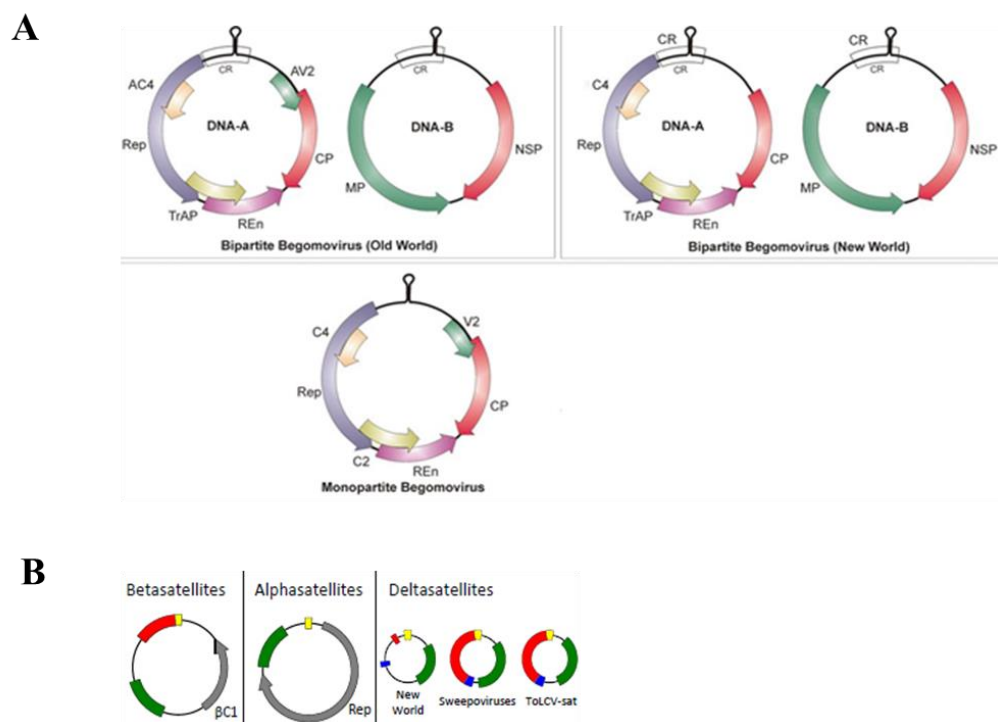
Moléculas de DNAs satélites associadas a begomovírus monopartidos do VM foram relatadas interferindo na replicação do vírus auxiliar, na maioria das vezes atenuando os sintomas, porém em alguns casos, induzindo a manifestação de sintomas mais severos (ROOSSINCK; SLEAT; PALUKAITIS, 1992). Briddon; Stanley (2006) afirmam que as funções dos satélites ainda não são claras, pois variam dependendo do vírus auxiliar. Entretanto parecem estar associados à virulência do patógeno, exercendo função na supressão do silenciamento gênico da planta, com a proteína  $\beta C1$ , codificada pelo betassatélite, sendo responsável por essa função (CUI et al., 2005). Foi demonstrado ainda que begomovírus distintos quando interagem com um mesmo DNA satélite produzem os mesmos sintomas nas plantas infectadas (MANSOOR et al., 2003), indicando que os satélites de DNA podem atuar como fatores de patogenicidade. A associação de alfassatélites com begomovírus (com ou sem betassatélites) não apresenta uma relação direta com o desenvolvimento de sintomas na planta hospedeira, porém, em alguns casos pode resultar na atenuação dos sintomas (ZHOU et al., 2013).

Uma nova classe de DNAs satélites foi descrita associada a begomovírus bipartidos do NM infectando plantas não-cultivadas (família Malvaceae) em Cuba (FIALLO-OLIVÉ et al., 2012). Moléculas semelhantes foram detectadas em adultos de mosca-branca utilizando a abordagem VEM no sul da Flórida (WfVEM-Sat) (NG et al., 2011), porém a estrutura do genoma não foi descrita em detalhes (FIALLO-OLIVÉ et al., 2012). O nome proposto para a classe foi deltassatélites (LOZANO et al., 2016) que inclui ToLCV-Sat, primeiro DNA satélite associado ao begomovírus *Tomato leaf curl virus* (DRY et al., 1997), os satélites relatados em Cuba (que juntamente com os satélites da Flórida são chamados de deltassatélites do NM)



(FIALLO-OLIVÉ et al., 2016) e os DNAs satélites associados a sweepovírus infectando convolvuláceas na Espanha e Venezuela (LOZANO et al., 2016; FIALLO-OLIVÉ et al., 2016).

Os begomovírus causam sintomas extremamente variáveis, dependendo principalmente da espécie viral, da planta hospedeira e da fase da cultura em que a infecção se estabeleceu (PICÓ; DIAZ; NUEZ, 1996). Porém, frequentemente observa-se nanismo, deformação foliar, uma combinação de mosaico/mosqueado de verde-claro a amarelo-dourado, amarelecimento venal ou intervenal, e pontos amarelos nas folhas (INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016).



**Figura 1.** (a) Organização genômica dos begomovírus encontrados no VM e NM. (b) DNAs satélites associados a begomovírus. Fonte: SATTAR et al., 2013; FIALLO-OLIVÉ et al., 2016.

## 2.4 Métodos utilizados para identificação de espécies de begomovírus e construção de clones infecciosos

O método mais seguro para identificação de espécies de begomovírus tem sido a determinação da sequência completa de nucleotídeos do DNA-A. Critérios para demarcação de espécies dentro do gênero *Begomovirus* foram revisados (BROWN et al., 2015), ficando estabelecido o limiar (para demarcação de espécies) de  $\geq 91\%$  de identidade para sequências nucleotídicas do DNA-A em comparações pareadas utilizando-se o programa *Sequence*

*Demarcation Tool* (SDT; MUHIRE; VARSANI; MARTIN, 2014). Em 2004, Inoue-Nagata e colaboradores desenvolveram um método simples para clonagem de genomas completos de begomovírus baseado na amplificação dos componentes genômicos por círculo rolante (*rolling-circle amplification* - RCA) seguido por digestão com enzima de restrição e ligação ao vetor plasmidial. Este método tem facilitado os procedimentos de clonagem e rápido de sequenciamento de um grande número de isolados (MAR et al. 2017; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014; ROCHA et al., 2013; SILVA et al., 2012).

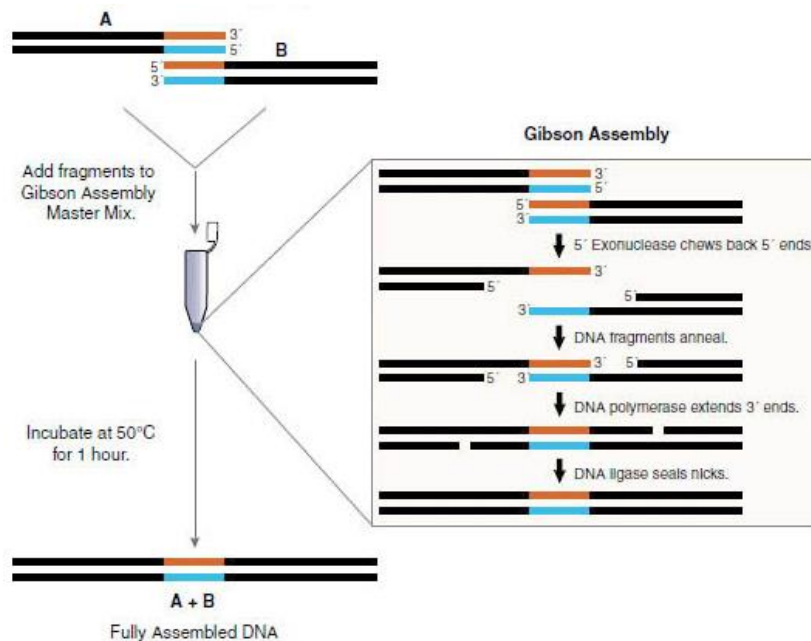
Por outro lado, na investigação da biologia viral, tem sido utilizada a tecnologia de clones infecciosos, uma ferramenta poderosa que facilita estudos de diferentes viroses isoladamente ou em infecções mistas controladas, e uma melhor compreensão da interação vírus/hospedeiro/vetor (BREWER et al., 2018). Clones infecciosos de vírus de plantas têm uma ampla gama de aplicabilidade e a utilização dessas técnicas tem permitido a realização de estudos de variabilidade genética, epidemiologia molecular, além de fornecer suporte a programas de melhoramento genético de espécies cultivadas.

Uma abordagem mais convencional para obtenção de clones diméricos de begomovírus leva em consideração as técnicas de DNA recombinante e restrição enzimática (BURAGOHAİN et al., 1994), gerando construções correspondentes a 1,5 cópias do genoma, contendo duas origens (*ori*) de replicação. A *ori* duplicada permite a liberação do genoma completo na célula e a recuperação do genoma viral intacto (NAGATA; INOUE-NAGATA, 2015).

Em 2008, Ferreira e colaboradores descreveram um procedimento mais simples para construir clones agro-infecciosos de isolados de begomovírus, o qual baseia-se na geração de duas unidades do genoma por digestão enzimática parcial dos concatêmetos produzidos pela reação da DNA polimerase phi-29. Esse método é amplamente utilizado (FERREIRA et al., 2008; WU et al., 2008; NAGATA; INOUE-NAGATA, 2014; BANG et al., 2014), no entanto, a digestão enzimática parcial requer ajustes adicionais na concentração adequada da enzima e do DNA alvo, exigindo um maior tempo de execução e, em muitos casos, não sendo bem-sucedida.

Recentente, foi empregada a técnica de Gibson Assembly (GA) para construção de clone infeccioso de BGMV, em vetor binário pJL-89, capaz de infectar eficientemente *Phaseolus vulgaris* (FERRO et al., 2019). GA é um método de clonagem molecular usado para montar eficientemente moléculas de DNA em uma única reação isotérmica, pela ação combinada de três enzimas: uma T5 exonuclease, uma DNA polimerase de alta fidelidade e uma DNA ligase (GIBSON et al., 2009) (Figura 2). Essa abordagem pode ser mais eficiente que a clonagem

convencional e acelerar o desenvolvimento de clones infecciosos de muitos begomovírus num vetor binário.



**Figura 2.** Etapas da reação de Gibson Assembly. Fonte: Gibson Assembly® Cloning Kit, NEW ENGLAND BIOLABS.

## 2.5 Organização genômica e papel desempenhado pelas proteínas dos *Begomovirus*

O genoma da maioria dos *Begomovirus* descritos no NM apresenta dois componentes denominados DNA-A e DNA-B. 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, não apresentando homologia de sequência, exceto por uma região intergênica com cerca de 200 pb, a região comum (RC). A RC é altamente conservada entre dois componentes de uma determinada espécie viral (acima de 90% de identidade). A partir desta região, os genes virais divergem nos sentidos virais e complementar (LAZAROWITZ, 1992; PILARTZ; JESKE, 2003) e nela está localizada uma sequência de nove nucleotídeos (5'-TAATATT↓AC-3') conservada entre todos os geminivírus, onde se encontra o domínio funcional da origem de replicação (OROZCO; HANLEY-BOWDOIN, 1996), além de promotores da síntese dos mRNAs virais (LAZAROWITZ, 1992; LAZAROWITZ et al., 1992; FONTES et al., 1994). Entretanto, vale salientar que um nonanucleotídeo não usual (5'-TAGTATTAC-3') foi relatado no begomovírus *Malvaviscus yellow mosaic virus* (MYMV), obtido a partir de hospedeiros ornamentais da

família Malvaceae (LIMA et al., 2011). Este nonanucleotídeo é clivado durante o início da replicação viral e se localiza num contexto de 30 nucleotídeos capazes de formar uma estrutura em forma de grampo. Embora a sequência de 30 nucleotídeos varie entre espécies de geminivírus, a estrutura em forma de grampo está sempre presente, sendo considerado um elemento conservado estruturalmente (FARIA; ZERBINI, 2000).

A transcrição é bidirecional tanto no DNA-A, que possui genes envolvidos na replicação e encapsidação viral, quanto no DNA-B, que possui genes envolvidos na movimentação do vírus na planta (TIMMERMANS; DAS; MESSING, 1994; BROWN, 1997; FARIA et al., 2000) (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) (FARIA; ZERBINI, 2000).

A função da CP está relacionada com a proteção do genoma contra degradação, aquisição do vírus e transmissão pelo inseto vetor, infectividade e movimento sistêmico. Nos begomovírus monopartidos, a CP também tem a função de transportar o DNA viral do núcleo para o citoplasma e do citoplasma para o núcleo (LIU et al., 1999), função exercida pela NSP nos begomovírus bipartidos (NOUEIRY; LUCAS; GILBERTSON, 1994). Essa proteína é determinante da especificidade da transmissão do vírus e na interação entre o vírus e a planta hospedeira, parece ainda estar associada com o desenvolvimento de sintomas (GARDINER et al., 1998). A CP dos begomovírus se liga à proteína GroEL (sintetizada por endossimbiontes no intestino das moscas-brancas vetoras) e à proteína codificada pela própria mosca-branca HSP16 (*heat shock protein* 16; OHNESORGE; BEJARANO, 2009; RANA et al., 2012). Estas interações podem estabilizar o vírion durante a passagem pelo intestino e/ou facilitar sua transferência através do epitélio do intestino para a hemolinfa (HANLEY-BOWDOIN et al., 2013). As duas hipóteses são compatíveis com dados que mostram que diferentes isoformas de GroEL, sintetizadas por diferentes endossimbiontes, afetam a eficiência de transmissão (GOTTLIEB et al., 2010; HANLEY-BOWDOIN et al., 2013). Foi experimentalmente demonstrado que a troca do gene *CP* do *African cassava mosaic virus* (ACMV), um begomovírus transmitido por mosca-branca, pelo correspondente do *Beet curly top virus* (BCTV), um curtovírus transmitido por cigarrinha, resultou na alteração da especificidade do inseto vetor (BRIDDON et al., 1990). Uma outra proteína sintetizada no sentido viral é a

AV2/V2, que em begomovírus monopartidos do VM funciona como proteína do movimento (POORNIMA-PRIYADARSHINI et al., 2011), além de atuar supressora de silenciamento gênico (CHOWDA-REDDY et al., 2008; ZHANG et al., 2012).

O produto do gene *Rep* é uma enzima com propriedades de ligação a ácidos nucleicos, de endonucleases e absolutamente necessária para a replicação. A função da proteína Rep é de se ligar ao sítio de iniciação da replicação viral (5'-TAATATT//AC-3') e cortar uma das fitas de DNA iniciando a replicação por círculo rolante (*rolling circle replication* – RCR) (FONTES; LUCKOW; HANLEY-BOWDOIN, 1992). A fita de ssDNA circular recém-sintetizada pode ser convertida em dsDNA para entrar num novo ciclo de replicação ou encapsidada em vírions após a síntese da proteína capsidial (HANLEY-BOWDOIN et al., 2013). A Rep ainda está ligada à regulação gênica, uma vez que sua ligação à origem de replicação reprime a expressão de genes no sentido complementar (incluindo sua própria expressão) (EAGLE; OROZCO; HANLEY-BOWDOIN, 1994), mas aparentemente não reprime a expressão de genes no sentido viral (SHIVAPRASAD et al., 2005).

A proteína TrAP, codificada pelo gene *trap*, é um fator de transcrição, que atua nos promotores de genes de sentido viral (*CP* e *NSP*) em begomovírus bipartidos. Portanto, os transcritos correspondentes a estes genes só são observados na célula após a expressão de *trap* (SUNTER; BISARO, 1992). Outra função pode ser a de interagir e inativar Kinases, como adenosina kinase (ADK) e SNF1, enzimas envolvidas na defesa do hospedeiro (SUNTER; SUNTER; BISARO, 2001). A TrAP ainda está envolvida na supressão de silenciamento gênico transcricional (TGS) e pós-transcricional (PTGS) (VANITHARANI et al., 2004; WANG et al., 2005; RAJA et al, 2008).

A proteína REN, codificada pelo gene *REN*, é um fator de amplificação da replicação viral. Embora não seja essencial para que a replicação ocorra, o acúmulo de DNA viral é muito maior quando esta proteína está presente (ZERBINI; CARVALHO; MACIEL-ZAMBOLIM, 2002). Estudos envolvendo mutações nesta proteína têm mostrado retardamento e atenuação de sintomas (ELMER et al., 1988; ETESSAMI et al., 1991). Há a possibilidade de que a REN direcione a Rep para o domínio de ligação Rep/DNA viral no local de clivagem no início da replicação (LAZAROWITZ et al., 1999).

A C4 é responsável por suprimir a resposta do hospedeiro à ação da Rep (ROJAS et al, 2005; STANLEY et al, 2005), além disso é um importante fator na determinação dos sintomas, estando comprometida no controle do ciclo celular, podendo se envolver com outras proteínas virais e interagir com proteínas relacionadas com o processo de ubiquitinação pelo hospedeiro na tentativa de garantir o avanço da infecção (CASTILLO et al., 2004; EINI et al., 2009;

LOZANO-DURAN; BEJARANO, 2011; LOZANO-DURÁN et al., 2011; SÁNCHEZ-DURÁN et al., 2011; ZHANG et al., 2011). Em begomovírus monopartidos atua no movimento célula-à-célula em conjunto com outras proteínas como CP e V2 (ROJAS et al., 1998; ROJAS et al., 2001).

A C5 codifica uma proteína que aparentemente não tem papel essencial no ciclo da infecção viral para alguns begomovírus ou isolados virais (KHEYR-POUR et al., 2000; FONTENELLE et al., 2007; MELGAREJO et al., 2013), mas sua ausência em mutantes ocasionou sintomas menos severos (MELGAREJO et al., 2013). Um estudo mais detalhado com o *Mungbean yellow mosaic India virus* (MYMIV; LI et al., 2015) revelou o papel multifuncional desta proteína, que pode atuar no desenvolvimento de sintomas, na supressão do TGS e do PTGS, e na indução de uma resposta similar a de hipersensibilidade (*hipersensitive-like response* – HLR).

No componente DNA-B, no sentido viral, o gene *NSP* codifica uma proteína que realiza o transporte do DNA através do envelope nuclear (*Nuclear Shuttle Protein* - NSP). A NSP se liga ao DNA viral formando o complexo NSP-ss/dsDNA, que é transportado para o citoplasma, onde interage com a MP, que direciona 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, o gene *MP* (*Movement Protein* - MP) tem funções de movimento célula-a-célula através do mecanismo de aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas (NOUEIRY; LUCAS; GILBERTSON, 1994). A MP de *Squash leaf curl virus* (SqLCV) interage com o retículo endoplasmático de células procambiais (células vasculares imaturas) para formar túbulos que conectam uma célula a outra, sugerindo que o complexo NSP-ssDNA viral pode ser transportado através de tais estruturas (WARD et al., 1997).

## **2.6 Diversidade de *Begomovirus* infectando feijoeiros e *Macroptilium lathyroides***

Os begomovírus têm emergido como um dos principais fitopatógenos, particularmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (MORALES, 2010), prejudicando importantes culturas como feijão (*Phaseolus vulgaris*), mandioca (*Manihot esculenta*), algodão (*Gossypium* sp.), tabaco (*Nicotiana tabacum*) e tomate (GRAHAM; MARTIN; ROYE, 2010). No Brasil, o feijoeiro e tomateiro são as culturas mais severamente afetadas (FARIA; MAXWELL, 1999; ZERBINI et al., 2005).

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* (BCaMV), *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV), *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV), *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV), *Tobacco leaf curl Cuba virus* (TbLCCuV), *Sida golden mosaic virus* (SiGMV), *Common bean severe mosaic virus* (CBSMV), *Common bean mottle virus* (CBMoV), *Bean golden mosaic virus* (BGMV) e *Macrotidium yellow spot virus* (MaYSV), sendo os dois últimos de maior importância econômica no Brasil (FAUQUET et al., 2008; FERNANDES-ACIOLI et al., 2011; SILVA et al., 2012; LIMA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014; LEYVA et al., 2016; DURHAM et al., 2010; CHANG-SIDORCHUK et al., 2017).

O primeiro begomovírus relatado no Brasil, o BGMV, foi observado infectando *P. vulgaris* na década de 1960 (COSTA, 1975). O mosaico dourado do feijoeiro foi a primeira doença causada por esse grupo de vírus que atingiu níveis epidêmicos no NM, 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). Surto epidêmico do BGMV em plantios de feijoeiros foram, durante muito tempo, impulsionados por populações nativas da mosca-branca *B. tabaci* espécie New World (NW, antigo biótipo A). Após introdução da *B. tabaci* espécie Middle East-Asia Minor 1 [MEAM1, nativa do Velho Mundo (antigo biótipo B)] no país, mesmo com o deslocamento da espécie NW, surtos de BGMV continuaram a ser relatados, indicando que ambas espécies crípticas de *B. tabaci* são vetores eficientes na transmissão do BGMV (INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016).

Além de plantas cultivadas, muitas espécies de plantas silvestres/daninhas têm sido relatadas como hospedeiras de *Begomovirus* (IDRIS et al., 2003; JOVEL et al., 2004; FIALLO-OLIVE et al., 2013; MUBIN et al., 2010), principalmente dentro das famílias Malvaceae, Euphorbiaceae e Fabaceae (MORALES; ANDERSON, 2001; ASSUNÇÃO, 2006; TAVARES et al., 2012; SILVA et al., 2011, 2012; FIALLO-OLIVÉ; ZERBINI; NAVAS-CASTILLO, 2015). Alguns begomovírus descritos a partir *Macrotidium lathyroides* (espécie silvestre leguminosa comumente encontrada em associação com campos de cultivo de feijoeiros) como *Macrotidium yellow mosaic virus* (MaYMV-[JM]), *Macrotidium yellow mosaic Florida virus* (MaYMFV), *Macrotidium mosaic Puerto Rico virus* (MaMPRV) 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 *Macrotidium lathyroides*, nos estados de Sergipe e

Paraíba (SILVA et al., 2012). Este mesmo vírus já foi descrito em outras hospedeiras leguminosas não-cultivadas como *Calopogonium mucunoides*, *Canavalia* sp. (SILVA et al., 2012) e, mais recentemente, em *Desmodium glabrum* (FONTENELE et al., 2016). É também conhecido que *M. lathyroides* pode servir como hospedeiro alternativo para BGMV e BGYMV, begomovírus de grande importância econômica na cultura dos feijoeiros (BRACERO; RIVERA; BEAVER, 2003; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). No Brasil, outros begomovírus infectando *M. lathyroides* foram relatados como *Soybean chlorotic spot virus* (SoCSV, COCO et al., 2013), vírus inicialmente descrito em soja, *Macrotidium yellow net virus* (MaYNV) e *Macrotidium yellow vein virus* (MaYVV) (SILVA et al., 2012; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014).

Análises de populações brasileiras de BGMV e MaYSV mostraram que a variação genética entre os isolados de cada uma das espécies de begomovírus é similar em ambos hospedeiros cultivados (*P. vulgaris* e *P. lunatus*) e não-cultivados (*M. lathyroides*), indicando que os hospedeiros (*a priori*) não afetam a variabilidade genética desses vírus. Por outro lado, resultados sugerem que a distribuição geográfica dos hospedeiros influencia na estrutura genética de subpopulações do BGMV, mas não de MaYSV (RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). O alto grau de variabilidade genética nas populações de MaYSV, em comparação com as populações de BGMV, foi atribuído aos numerosos eventos de recombinação em MaYSV. Finalmente, MaYSV foi o begomovírus mais frequentemente encontrado em hospedeiras leguminosas cultivadas no estado Alagoas em 2011, indicando uma possível substituição de BGMV por MaYSV (RAMOS-SOBRINHO et al., 2014).

Acreditava-se que BGMV era o único begomovírus de importância econômica em feijoeiros no Brasil, levando a aprovação do feijão comum transgênico Embrapa 5.1 resistente ao BGMV, no qual resistência é devido ao silenciamento de RNA (BONFIM et al., 2007; ARAGÃO et al., 2013). Entretanto, resultados mais recentes sugerem a emergência do MaYSV como um dos principais begomovírus em campos de cultivo no Nordeste do Brasil, indicando que BGMV já não é mais o único begomovírus de relevância econômica para os feijoeiros. É importante salientar que a utilização da cultivar transgênica representa apenas uma estratégia para o manejo de infecções por BGMV, não sendo resistente a outros vírus que infectam feijão, incluindo *Cowpea mild mottle virus* (carlavírus transmitido por mosca-branca) e, possivelmente, MaYSV e SiMMV (INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016). Esses surtos contínuos de begomovírus demonstram que o manejo eficaz da doença continua sendo um desafio.



## REFERÊNCIAS

- AMARAKOON, I. I. et al. Molecular and biological characterization of *Macropodium yellow mosaic virus* from Jamaica. **Plant Pathology**, v. 57, n. 3, p. 417-426, 2008.
- ARAGÃO, F.J. et al. 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.
- ASSUNÇÃO, I.P. et al. Diversidade genética de Begomovirus que infectam plantas invasoras na Região Nordeste. **Planta Daninha**, v. 24, n. 2, p. 239-244, 2006.
- BANG, B.; LEE, J.; KIM, S.; PARK, J.; NGUYEN, T.T.; SEO, Y.S. A Rapid and Efficient Method for Construction of an Infectious Clone of *Tomato yellow leaf curl virus*. **Plant Pathology Journal**, p. 310-315, 2014.
- BARBOSA, L.F. et al. Indigenous American species of the *Bemisia tabaci* complex are still widespread in the Americas. **Pest Management Science**, Sussex, Inglaterra, **70**: 1440–1445, 2014.
- BONFIM, K. et al. RNAi-mediated resistance to *Bean golden mosaic virus* in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 6, p. 717-726, 2007.
- BRACERO, V.; RIVERA, L.; BEAVER, J. DNA analysis confirms *Macropodium lathyroides* as alternative host of *Bean golden yellow mosaic virus*. **Plant Disease**, v. 87, n. 9, p. 1022-1025, 2003.
- BREWER, H.C.; HIRD, D.L.; BAILEY, A.M.; SEAL S.E.; FOSTER G.D. A guide to the contained use of plant virus infectious clones. **Plant Biotechnol. J**, v.16, p. 832–843, 2018.
- BRIDDON, R. W. et al. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. **Virology**, v. 177, p. 85-94, 1990.
- BRIDDON, R.W. et al. Recommendations for the classification and nomenclature of the DNA-β satellites of begomoviruses. **Archives of Virology**, v. 153, p. 763-781, 2008.
- BRIDDON, R.W.; STANLEY, J. Subviral agents associated with plant single-stranded DNA viruses. **Virology**, v. 344, p. 198-210, 2006.

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

BURAGOHAİN, A.K.; SUNG, Y.K.; COFFIN, R.S.; COUTTS, R.H.A. The infectivity of dimeric potato yellow mosaic geminivirus clones in different hosts. **Journal of General Virology**, p. 2857-2861, 1994.

CARNEIRO, H.S. Comida e sociedade: significados sociais na história da alimentação. **História: Questões & Debates**, Curitiba, n. 42, p. 71-80, 2005.

CASTILLO, A.G., et al. Interaction between a geminivirus replication protein and the plant simulation system. **Journal of Virology**, v. 78, p. 2758–2769, 2004.

CHANG-SIDORCHUK, L. et al. Complete genome sequences of two novel bipartite begomoviruses infecting common bean in Cuba. **Arch. Virol.**, v. 162, p. 1431- 1433, 2017.

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.

COCO, D. et al. Soybean chlorotic spot virus, a novel begomovirus infecting soybean in Brazil. **Archives of Virology**, v. 158, p. 457-462, 2013.

COSTA, A.S. Increase in the population density of *Bemisia tabaci*, a threat of widespread virus infection of legumes crops in Brazil. In Bird J.; Maramorosch K. (eds) **Tropical diseases of legumes**. **Academic Press**, p. 27-49, 1975.

CUI, X.F. et al. 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.

DRY, I.B. et al. A novel subviral agent associated with a geminivirus: the first report of a DNA satellite. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 13, p. 7088-7093, 1997.

DUFFY, S.; HOLMES, E.C. Multiple introductions of the old world Begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus* into the new world. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 7114-7117, 2007.

DURHAM, T.C.; BAKER, C., JONES, L.; SNYDER, L.U. First Report of *Sida golden mosaic virus* Infecting Snap Bean (*Phaseolus vulgaris*) in Florida. **Plant Dis.**, v. 94, p. 487, 2010.

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

EINI, O. et al. Interaction with a host ubiquitin-conjugating enzyme is required for the pathogenicity of a geminiviral DNA beta satellite. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 22, p. 737-746, 2009.

ELMER, J. S. et al. Genetic analysis of the tomato golden mosaic virus. II. The product of the AL1 coding sequence is required for replication. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 7043-60, 1988.

ETESSAMI, P. et al. Mutational analysis of complementary-sense genes of African cassava mosaic virus DNA A. **Journal General Virology**, v. 72, p. 1005-12, 1991.

FAO-FAOSTAT - **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso: 10 de janeiro de 2019.

FARIA, J.C.; ZERBINI, F. M. Família *Geminiviridae*: Taxonomia, replicação e movimento. In: (Luz, W. C; Fernandes, J. M; Prestes, A. M; e Picinini, E. C.) **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 8, p. 27-57, 2000.

FARIA, J.C. et al. Situação atual das geminiviroses no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 125-137, 2000.

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

FAUQUET, C.M.; 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. et al. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. **Archives of Virology**, New York, v. 153, p. 783-821, 2008.

FERNANDES-ACIOLI, N.A.N. et al. First report of *Sida micrantha mosaic virus* in *Phaseolus vulgaris* in Brazil. **Plant Disease**, v. 95, p.1196, 2011.

FERREIRA, P.T.O.; LEMOS, T.O.; NAGATA, T.; INOUE-NAGATA, A.K. One-step cloning approach for construction of agroinfectious begomovirus clones. **Journal of Virological Methods**, p. 351-354, 2008.

FERRO, M.M.M. et al. New approach for the construction of infectious clones of a circular DNA plant virus using Gibson Assembly. **Journal of Virological Methods**, v. 263, p. 20–23, 2019.

FIALLO-OLIVÉ, E. et al. Begomoviruses infecting weeds in Cuba: increased host range and a novel virus infecting *Sida rhombifolia*. **Archives of Virology**, v. 157, p. 141-146, 2012.

FIALLO-OLIVÉ, E. et al. Complete genome sequences of two begomoviruses infecting weeds in Venezuela. **Archives of Virology**, v. 158, p. 277-280, 2013.

FIALLO-OLIVÉ, E.; ZERBINI, F.M.; NAVAS-CASTILLO, J. Complete nucleotide sequences of two new begomoviruses infecting the wild malvaceous plant *Melochia* sp. in Brazil. **Arch Virol.**, v. 160, 3161-4, 2015.

FIALLO-OLIVÉ, E.; TOVAR, R.; NAVAS-CASTILLO, J. Deciphering the biology of deltasatellites from the New World: maintenance by New World begomoviruses and whitefly transmission. **New Phytologist**, v. 212, n. 3, p. 680-692, 2016.

FONTENELE, R.S. First Report of *Macroptilium yellow spot virus* in *Desmodium glabrum* in Brazil. **Plant Disease**, v. 100, p. 657, 2016.

FONTES, E.P.B. et al. Geminivirus replication origins have a modular organization. **Plant Cell**, v. 6, p. 405-416, 1994.

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

GARDINER, W. et al. Genetic analysis of *Tomato golden mosaic virus*: The coat protein is not required for systemic spread or symptom development. **EMBO Journal**, v. 7, p. 899-904, 1998.

GIBSON, D.G. et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. **Nat. Methods**, p. 343-345, 2009.

GILBERTSON, R.L. et al. Role of the Insect Supervectors *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis* in the Emergence and Global Spread of Plant **Viruses Annu. Rev. Virol.**, v. 2, p. 67-93, 2015.

GOTTLIEB, Y. et al. The transmission efficiency of tomato yellow leaf curl virus by the whitefly *Bemisia tabaci* is correlated with the presence of a specific symbiotic bacterium species. **Journal of Virology**, v. 84, p. 9310-9317, 2010.

GRAHAM, A.P.; MARTIN, D.P.; ROYE, M.E. Molecular characterization and phylogeny of two begomoviruses infecting *Malvastrum americanum* in Jamaica: evidence of the contribution of inter-species recombination to the evolution of malvaceous weed-associated begomoviruses from the Northern Caribbean. **Virus Genes**, v. 40, p. 256-266, 2010.

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

IBGE, 2015. Levantamento Sistemático da Produção. Disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Levantamento\\_Sistematico\\_da\\_Producao\\_Agricola\\_\[mensal\]/Fasciculo/lspa\\_201504.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/lspa_201504.pdf). Acessado em 6 de Maio de 2018.

IBGE, 2018. Levantamento Sistemático da Produção. Disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Levantamento\\_Sistematico\\_da\\_Producao\\_Agricola\\_\[mensal\]/Fasciculo/lspa\\_201504.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/lspa_201504.pdf). Acessado em 10 de janeiro de 2019.

IDRIS, A.M. et al. Two newly described begomoviruses of *Macroptilium lathyroides* and common bean. **Phytopathology**, v. 93, n. 7, p. 774-783, 2003.

INOUE-NAGATA, A.K. et al. A simple method for cloning of the complete begomovirus using the bacteriophage phi 29 DNA polymerase. **Journal of Virological Methods**, v. 11, p. 209-211, 2004.

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

JOVEL, J. et al. Sida micrantha mosaic is associated with a complex infection of begomoviruses different from *Abutilon mosaic virus*. **Archives of Virology**, v.149, p. 829-841, 2004.

LAZAROWITZ, S.G. et al. Sequence-specific interaction with the viral AL1 protein identifies a geminivirus DNA replication origin. **Plant Cell**, v. 4, p. 799-809, 1992.

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

LEGG, J. P.; FAUQUET, C. M. Cassava mosaic geminiviruses in Africa. **Plant Molecular Biology**, v. 56, n. 4, p. 585-599, 2004.

LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B.D.; MACKINDER, B.A.; LOCK, J.M. **Legumes of the World**. Royal Botanic Gardens, Kew, 577p., 2005.

LEYVA, R.M. et al. First report of *Tobacco leaf curl Cuba virus* infecting common bean in Cuba. **New Disease Reports**, v. 33, p. 17, 2016.

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.

LIU, L. et al. *Bean yellow dwarf virus* RepA, but not Rep, binds to maize retinoblastoma protein, and the virus tolerates mutations in the consensus binding motif. **Virology**, v. 256, p. 270-279, 1999.

LIMA, A.T.M., et al. *Malvaviscus* yellow mosaic virus, a weed-infecting begomovirus carrying a nanovirus-like nonanucleotide and a modified stem-loop structure. **Phytopathology**, v. 101, p. 104, (Abstract), 2011.

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. 162, 2016.

LOZANO-DURÁN, R., et al. Geminiviruses subvert ubiquitination by altering CSN-mediated derubylation of SCF E3 ligase complexes and inhibit jasmonate signaling in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell**, v. 23, p. 1014–1032, 2011.

LOZANO-DURÁN, R.; BEJARANO, E.R. Geminivirus C2 protein might be the key player for geminiviral co-option of SCF-mediated ubiquitination. **Plant Signaling and Behavior**, v. 6, p. 999–1001, 2011.

MANSOOR, S. et al. Geminivirus disease complexes: an emerging threat. Trends in **Plant Science**, v. 8, p. 128-134, 2003.

MAR, T.B. et al. Genetic variability and population structure of the New World begomovirus *Euphorbia yellow mosaic virus*. **Journal of General Virology**, v. 98, p. 1537–155, 2017.

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, American Society for Microbiology**, v. 87, p. 5397-5413, 2013.

MESQUITA, F. R. et al. Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade protéica. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 1114–1121, 2007.

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.

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.

MUBIN, M. et al. Characterization of begomovirus components from a weed suggests that begomoviruses may associate with multiple distinct DNA satellites. **Virus Genes**, v. 40, p. 452–457, 2010.

MUHIRE, B.M.; VARSANI, A., MARTIN, D.P. SDT: A Virus Classification Tool Based on Pairwise Sequence Alignment and Identity Calculation. **PLoS ONE**, v. 9, p. 1-8, 2014.

NAGATA, T.; INOUE-NAGATA, A.K. Simplified Methods for the Construction of RNA and DNA Virus Infectious Clones. *Plant Virology Protocols*, **Methods Mol Biol.**, p. 241-254, 2015.

NAVAS-CASTILLO, J. ELVIRA FIALLO-OLIVE, F.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S. Emerging Virus Diseases Transmitted by Whiteflies. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 49, p. 219–48, 2011.

NAHKLA, M.K. et al. Two geminiviruses associated with tomatoes in Central America. **Phytopathology**, v. 84, p. 467, 1994.

NG, T. F. F. et al. Exploring the diversity of plant DNA viruses and their satellites using vector-enabled metagenomics on whiteflies. **PloS One**, v. 6, n. 4, p. e19050, 2011.

NOUEIRY, A.O., LUCAS, W.J., GILBERTSON, R.L. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. **Cell.**, v. 76, p. 925-32, 1994.

OHNESORGE, S.; BEJARANO, E. R. Begomovirus coat protein interacts with a small heat-shock protein of its transmission vector (*Bemisia tabaci*). **Insect Molecular Biology**, v. 18, p. 693-703, 2009.

OROZCO, B.M.; HANLEY-BOWDOIN, L. A. DNA structure is required for geminivirus replication origin function. **Virology Journal**, London, v. 70, p. 148-158, 1996.

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.

PEGADO, C. M. A. et al. Decomposição superficial e subsuperficial de folhas de fava (*Phaseolus lunatus* L.) na região do brejo da Paraíba, Brasil. **Revista Caatinga**, v.21, p. 218-223, 2008.

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. In: **Scientia Horticulturae**, v.67, p. 151-196, 1996.

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



POORNIMA PRIYADARSHINI, C. G. et al. Functional characterization of coat protein and V2 involved in cell to cell movement of *Cotton leaf curl Kokhran virus*-Dabawali. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e26929, 2011.

QUINTELA, E.D.; MORAES, M.M.D.; ROSA A.S. Controle de Adultos e Ninfas da Mosaca Branca (*Bemisia tabaci*) Biótipo B com Chlorantraniliprole + Thiamethoxan. **Embrapa Arroz e Feijão**, p. 1-4, 2008.

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.

RANA, V. P. et al. *Arsenophonus* GroEL interacts with CLCuV and is localized in midgut and salivary gland of whitefly *B. tabaci*. **PLoS One**, v. 7, p. e42168, 2012.

ROCHA, C.S. et al. Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly evolving, and segregated based on geographical location. **Journal of Virology**, v. 87, p. 5784–5799, 2013.

RODRÍGUEZ-NEGRETE, E. et al. Geminivirus Rep protein interferes with the plant DNA methylation machinery and suppresses transcriptional gene silencing. **New Phytologist**, v. 199, p. 464–475, 2013.

ROJAS, M. R. et al. Bean Dwarf mosaic geminivirus movement proteins recognize DNA in a form- and size-specific manner. **Cell**, v. 95, n. 1, p. 105-113, 1998.

ROJAS, M. R. et al. Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, *Tomato yellow leaf curl virus*. **Virology**, v. 291, n. 1, p. 110-25, 2001

ROJAS, M.R. et al. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 361–394, 2005.

ROMAY, G. et al. Association of an atypical alphasatellite with a bipartite New World begomovirus. **Archives of Virology**, New York, v. 155, p. 1843-1847, 2010.

ROOSSINCK, M.J.; SLEAT, D.; PALUKAITIS, P. Satellite RNAs of plant viruses: structures and biological effects. **Microbiological Reviews**, v. 56, p. 265–79, 1992.

ROSARIO, K. et al. Begomovirus-associated satellite dna diversity captured through vector-enabled metagenomic (VEM) surveys using whiteflies (Aleyrodidae). **Viruses**, v. 8, p. 36, 2016.

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, p. 286-293, 2013.

SÁNCHEZ-DURÁN M.A., et al. Interaction between geminivirus replication protein and the SUMO conjugating enzyme is required for viral infection. **Journal of Virology**, v. 85, p. 9789–9800, 2011.

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.

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

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.

SATTAR, M.N. et al. Cotton leaf curl disease - an emerging threat to cotton production worldwide. **Journal of General Virology**, v. 94, p. 695-710, 2013.

SCHUBERT, J. Analysis of complete genomes of isolates of the Wheat dwarf virus from new geographical locations and descriptions of their defective forms. **Virus Genes**, v. 48, p. 133–9, 2014.

SHEPHERD, D.N. et al. *Maize streak virus*: an old and complex 'emerging' pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2010.

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. 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, p. 2205–2213, 2011.

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.

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

STANLEY, J. et al. Family *Geminiviridae*. In Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Elsevier**, p. 301–326, 2005.

SUNTER, G.; BISARO, D.M. Transactivation of geminivirus AR1 and BR2 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. **Plant Cell**, v. 4, p. 1321-1331, 1992.

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

TAVARES, S.S. et al. Further molecular characterization of weed-associated begomoviruses in Brazil with an emphasis on *Sida* spp. **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 2, p. 305-315, 2012.

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.

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, p. 9487-9498, 2004.

VARSANI, A. et al. Establishment of three new genera in the family Geminiviridae: Becurtovirus, Eragrovirus and Turncurovirus. **Archives of Virology**, Springer Vienna, v. 159, p. 2193-2203, 2014.

VARSANI, A. et al. *Capulavirus* and *Grablovirus*: two new genera in the family

*Geminiviridae*. **Archives of Virology**, p. 1-13, 2017.

VIEIRA, C. Leguminosas de grãos: importância econômica na agricultura e na alimentação humana. **Informe Agropecuário**, v.16, p. 5-11, 1992.

VU, S. et al. Evidence that Tomato mottle leaf curl virus from Northeastern Brazil is an indigenous new world monopartite begomovirus (abstr act). *Phytopathology* (Supplement 4), p. 501, 2015.

WANG, H. et al. Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. **Journal of Virology**, v. 79, p. 7410-7418, 2005.

WARD, B. M. et al. The geminivirus BL1 movement protein is associated with endoplasmic reticulum-derived tubules in developing phloem cells. **Journal of Virology**, v. 71, p. 3726-3733, 1997.

WU, C.Y.; LAI, Y.C.; LIN, N.S.; HSU, Y.H.; TSAI, H.T.; LIAO, J.Y.; HU, C.C. A simplified method of constructing infectious clones of begomovirus employing limited restriction enzyme digestion of product of rolling circle amplification. **Journal of Virological Methods**, p. 355-359, 2008.

ZERBINI, F.M. et al. Traditional and novel strategies for geminivirus management in Brazil. **Australasian Plant Pathology**, Perth, v. 34, p. 475-480, 2005.

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

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

ZHANG Z, et al. BSCTV C2 attenuates the degradation of SAMDC1 to suppress DNA methylation-mediated gene silencing in Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 23, p. 273–28, 2011.

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, p. 357-81, 2013.

**3 CAPÍTULO I:**

NEW APPROACH FOR THE CONSTRUCTION OF INFECTIOUS CLONES OF A  
CIRCULAR DNA PLANT VIRUS USING GIBSON ASSEMBLY

PUBLICADO - JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS

1 **New approach for the construction of infectious clones of a circular DNA plant virus using**  
2 **Gibson Assembly**

3

4 Ferro, M.M.M.<sup>1</sup>, Ramos-Sobrinho, R.<sup>2\*</sup>, Xavier, C.A.D.<sup>3</sup>, Zerbini, F.M.<sup>3</sup>, Lima, G.S.A.<sup>1</sup>,  
5 Nagata, T.<sup>2</sup>, Assunção, I.P.<sup>1</sup>

6

7 <sup>1</sup>Setor de Fitossanidade/Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Rio  
8 Largo, AL, 57100-000, Brazil

9 <sup>2</sup>Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília,  
10 Brasília, DF, 70910-900, Brazil

11 <sup>3</sup>Departamento de Fitopatologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG,  
12 36570-900, Brazil

13

14 \*Corresponding authors: R. Ramos-Sobrinho, e-mail: robertorsobrinho@gmail.com

15

16

17 Declarations of interest: none.

18

19

20

21

22

23

24

25

26 **ABSTRACT**

27 Viruses belonging to the genus *Begomovirus* (family *Geminiviridae*) have circular single-strand  
28 DNA genome encapsidated into quasi-icosahedral particles, being transmitted by whiteflies of  
29 the *Bemisia tabaci* complex. Biological and molecular properties of begomoviruses have been  
30 studied efficiently with infectious clones, with dimeric constructions of genome components  
31 being required for clone infectivity. However, current approaches employing enzymatic  
32 digestion and ligation to binary vectors are laborious, mostly due to many cloning steps or  
33 partial digestion by restriction enzyme. Here, an infectious clone of the bipartite begomovirus  
34 *Bean golden mosaic virus* (BGMV) was obtained using PCR and Gibson Assembly (GA).  
35 Common bean (*Phaseolus vulgaris*) seedlings displayed severe yellow mosaic and stunt  
36 symptoms 15 days after agroinoculation with DNA-A and DNA-B of BGMV. The approach  
37 based on PCR-GA protocol is a fast and useful tool to obtain infectious clones of a circular  
38 DNA plant virus.

39

40 **Keywords:** *Geminiviridae*, seamless cloning, Gibson Assembly, begomovirus, infectious  
41 clones

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51 Viruses belonging to the genus *Begomovirus* (family *Geminiviridae*) infect cultivated  
52 and wild plants in tropical and subtropical regions, causing serious economic losses (Navas-  
53 Castillo et al., 2011; Rojas et al., 2018). Bipartite begomoviruses have two genomic  
54 components known as DNA-A and DNA-B, while the genomes of monopartite begomoviruses  
55 resemble the DNA-A segment. Both mono and bipartite are transmitted by whitefly cryptic  
56 species into the sibling group *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) (Zerbini et al., 2017).  
57 *Bean golden mosaic virus* (BGMV) is among the main begomoviruses infecting leguminous  
58 plants, being considered the most important constraints to crops into the genus *Phaseolus* in  
59 Brazil (Rojas et al., 2018).

60 The conventional approach to construct infectious clones of begomoviruses employs  
61 restriction enzymes to generate more than one copy of the viral genome which contain two  
62 replication origins (v-ori) (Buragohain et al., 1994; Bang et al., 2014; Nagata and Inoue-Nagata,  
63 2015). The duplicated v-ori allow the release of the full-length viral genome, improving the  
64 infectivity of the genomic components after agroinoculation (Stenger et al., 1991; Nagata and  
65 Inoue-Nagata, 2015). A method based on rolling circle amplification (RCA) of viral genomes  
66 followed by partial digestion with endonucleases has been described and largely used to obtain  
67 infectious clones into the genus *Begomovirus* (Ferreira et al., 2008; Wu et al., 2008; Bang et  
68 al., 2014; Nagata and Inoue-Nagata, 2015). Unfortunately, the partial enzymatic digestion  
69 requires a laborious process of adjustments in conditions of the target DNA and enzyme  
70 concentrations. Here, a new and simple approach to obtain infectious clones of begomoviruses  
71 employing PCR-Gibson Assembly (GA) is described.

72 For this study, DNA-A and DNA-B genomic components of the begomovirus BGMV  
73 isolate 173 AL (GenBank accession KJ939749 for DNA-A, MH925107 for DNA-B; Ramos-  
74 Sobrinho et al., 2014), previously cloned into pBluescript KS+ plasmid vectors were used as  
75 PCR templates.



76 For geminivirus infectious clone assembly, it is necessary dimeric constructions  
77 (containing at least two replication origins) for each genome segment. For this purpose, primers  
78 were designated to amplify two slightly different units (1 and 2) with 20-22 nucleotides (nt)  
79 overlap region between units 1 and 2, and 20 nt overlap between genome segments and plasmid  
80 (Fig. 1, Table 1). Primer pairs BGMV-A-U1-For/BGMV-A-U1-Rev or BGMV-A-U2-  
81 For/BGMV-A-U2-Rev were used to amplify units 1 and 2 of the BGMV DNA-A (Fig. 1a),  
82 respectively, while BGMV-B-U1-For/BGMV-B-U1-Rev or BGMV-B-U2-For/BGMV-B-U2-  
83 Rev were used for BGMV DNA-B (Fig. 1b). Primer pair pJL89-Nos-For/pJL89-no35S-Rev  
84 was used to amplify the pJL-89 binary vector (Lindbo, 2007) excluding the 35S region of the  
85 vector. DNA-A and DNA-B components were individually amplified using the Q5<sup>®</sup> High-  
86 Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs, Ipswich, USA). Amplified fragments were  
87 analyzed by electrophoresis using agarose gel (1%), individually purified using Gel Band  
88 Purification Kit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), and treated with DpnI restriction enzyme  
89 for degradation of methylated plasmid DNA used as template. Dimers of DNA-A and DNA-B  
90 were assembled using Gibson Assembly<sup>®</sup> Cloning Master Mix (New England BioLabs)  
91 following the manufacturer's protocol. Briefly, 2.5  $\mu$ L of pJL-89 amplified product (40 ng/ $\mu$ L),  
92 2.2  $\mu$ L of units 1 and 2 (DNA-A or DNA-B; 50 ng/ $\mu$ L), 1.0  $\mu$ L of 10X CutSmart buffer, 1.1  $\mu$ L  
93 of ultrapure H<sub>2</sub>O, and 1.0  $\mu$ L of DpnI were mixed and incubated at 37 °C for 1 h, and then 10.0  
94  $\mu$ L of GA master mix was added and incubated at 50 °C during 1h (an illustration for the PCR-  
95 GA approach is shown in Supplementary Fig. 1). Finally, GA products were dialyzed during  
96 15 min using VSWP 0.025  $\mu$ m cellulose membrane (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany),  
97 and used to transform electrocompetent cells of *Escherichia coli* DH10B strain.

98 Colonies of transformed *E. coli* DH10B were grown on Luria-Bertani (LB) medium at  
99 37 °C for 18 h, and plasmid DNA was extract using the Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA  
100 Purification System (Promega, Madison, USA). In order to confirm the cloning process,

101 assembled plasmid DNA were individually digested with *Bam*HI (DNA-A) or *Spe*I (DNA-B)  
102 (Fig. 1). For DNA-A, fragments of about 3.0 and 6.9 kb, corresponding to the second copy of  
103 the viral genome (unit 2) plus part of the binary vector (~0.4 kb) and the first copy of the viral  
104 insert (unit 1) plus vector (~4.3 kb) were obtained. For DNA-B, fragments of 9.9 kb  
105 corresponding to the linearized plasmid containing two copies (units 1 and 2) of the genomic  
106 component plus the pJL-89 were obtained. Restriction enzyme sites used for cloning are shown  
107 in Fig. 1. Viral inserts were sequenced at Macrogen Inc., and nucleotide sequences were  
108 analyzed using the Geneious program (Kearse et al., 2012).

109         Constructions of DNA-A and DNA-B clones of BGMV (confirmed by enzymatic  
110 digestion and sequencing) were used to transform *Agrobacterium tumefaciens* GV3101:pMP90  
111 strain (background C58; pTiC58DT-DNA), and infectivity was tested by agroinfiltration  
112 according to the protocol described in Hou et al. (1998). For agroinoculation of both viral  
113 components, DNA-A and DNA-B *A. tumefaciens* GV3101 cultures were adjusted to an OD of  
114 0.5 and mixed in equal volumes. Then, 0.5 mL of these mixed cultures were used to  
115 agroinoculate 10 day-old seedlings of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. 'Pérola' at four  
116 sites approximately 1 cm below the shoot apex. Control plants were agroinoculated with *A.*  
117 *tumefaciens* GV3101 containing empty pJL-89 vector. Inoculated plants were kept into  
118 whitefly-proof cages at  $25 \pm 2$  °C and photoperiod of 12 h during 30 days post agroinfiltration  
119 (dpa). Symptoms of severe yellow mosaic and stunting were observed in inoculated plants 15  
120 dpa (Fig. 2a). No symptoms were observed in the control plants (Fig. 2b).

121         In order to confirm viral infection, systemically infected leaf samples were collected at  
122 15 and 30 dpa. Total DNA was extracted from each sample according to Doyle and Doyle  
123 (1987), and used as templates for BGMV detection using the primer pairs BGMV-A-U2-  
124 For/BGMV-A-U2-Rev or BGMV-B-U1-For/BGMV-B-U1-Rev, specific to the DNA-A and

125 DNA-B, respectively (Table 1). Expected fragments of about 2.6 kb (DNA-A or DNA-B) were  
126 observed only from symptomatic plants in both sampling times (Fig. 2c and d).

127 Although the construction of infectious clones is a laborious process, this procedure has  
128 been successfully used to better-understand the biological and molecular characteristics of  
129 viruses and their interactions with plant hosts, with the single-step GA being a method used to  
130 easy assembly of DNA molecules into an isothermal reaction (Gibson et al., 2009). Here, it has  
131 been shown that this approach can be used to construct infectious clones of circular DNA plant  
132 viruses as begomoviruses.

133

#### 134 **Acknowledgments**

135 The authors wish to thank Dr. Alice Inoue-Nagata (Embrapa) for the support during plant  
136 inoculation assays. M.M.M.F. was a CAPES doctoral fellowship. G.S.A.L. was supported by  
137 CNPq grants (431109/2016-8). T.N. is research fellow of CNPq (CNPq 306377/2014-4). I.P.A.  
138 was supported by CAPES/FAPEAL grants (60030000022/2014).

139

#### 140 **References**

- 141 Bang, B., Lee, J., Kim, S., Park, J., Nguyen, T.T., Seo, Y.S., 2014. A Rapid and Efficient  
142 Method for Construction of an Infectious Clone of *Tomato yellow leaf curl virus*. *Plant*  
143 *Pathol. J.* 30, 310-315.
- 144 Buragohain, A.K., Sung, Y.K., Coffin, R.S., Coutts, R.H.A., 1994. The infectivity of dimeric  
145 potato yellow mosaic geminivirus clones in different hosts. *J Gen Virol.* 75, 2857-2861.
- 146 Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh  
147 leaf tissue. *Phytochemical Bulletin.* 19, 11-15.

- 148 Ferreira, P.T.O., Lemos, T.O., Nagata, T., Inoue-Nagata, A.K., 2008. One-step cloning  
149 approach for construction of agroinfectious begomovirus clones. *J. Virol. Methods.* 147,  
150 351-354.
- 151 Gibson, G.D., Young, L., Chuang, Y.R., Venter, C.J., Hutchison, C.A., Smith, H.O., 2009.  
152 Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods.*  
153 5, 343-345.
- 154 Hou, Y.M., Paplomatas, E.J., Gilbertson, R.L., 1998. Host Adaptation and Replication  
155 Properties of Two Bipartite Geminiviruses and Their Pseudorecombinants. *Mol Plant*  
156 *Microbe Interact.* 11, 208-217.
- 157 Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S.,  
158 Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond,  
159 A., 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for  
160 the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics.* 28, 1647-1649.
- 161 Lindbo, J., 2007. TRBO: A high-efficiency Tobacco mosaic virus RNA-based overexpression  
162 vector. *Plant Physiol.* 145, 1232-1240.
- 163 Nagata, T., Inoue-Nagata, A.K., 2015. Simplified Methods for the Construction of RNA and  
164 DNA Virus Infectious Clones. *Plant Virology Protocols, Methods Mol Biol.* 1236, 241-  
165 254.
- 166 Navas-Castillo, J. Elvira Fiallo-Olivé, F., Sánchez-Campos, S., 2011. Emerging Virus Diseases  
167 Transmitted by Whiteflies. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49, 219-48.
- 168 Ramos-Sobrinho, R., Xavier, C.A.D., Pereira, H.M.B., Lima, G.S.A., Assunção, I.P., Mizubuti,  
169 E.S.G., Duffy, S., Zerbini, F.M., 2014. Contrasting genetic structure between two  
170 begomoviruses infecting the same leguminous Hosts. *J. Gen. Virol.* 95, 2540-2552.
- 171 Rojas, M.R., Macedo, M.A., Maliano, M.R., Soto-Aguilar, M., Souza, J.O., Briddon, R.W.,  
172 Kenyon, L., Bustamante, R.F.R., Zerbini, F.M., Adkins, S., Legg, J.P., Kvarnheden, A.,

- 173 Wintermantel, W.M., Sudarshana, M.R., Peterschmitt, M., Lapidot, M., Martin, D.P.,  
174 Moriones, E., Inoue-Nagata, A.K., Gilbertson, R.L., 2018. World Management of  
175 Geminiviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 56, 637-677.
- 176 Stenger, D.C., Revington, G.N., Stevenson, M.C., Bisaro, D.M., 1991. Replicational release of  
177 geminivirus genomes from tandemly repeated copies: evidence for rolling-circle  
178 replication of a plant viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 8029-8033.
- 179 Wu, C.Y., Lai, Y.C., Lin, N.S., Hsu, Y.H., Tsai, H.T., Liao, J.Y., Hu, C.C., 2008. A simplified  
180 method of constructing infectious clones of begomovirus employing limited restriction  
181 enzyme digestion of product of rolling circle amplification. *J. Virol. Methods.* 147, 355-  
182 359.
- 183 Zerbini, F.M., Briddon, R.W., Idris, A., Martin, D.P., Moriones, E., Navas-Castillo, J., Rivera-  
184 Bustamante, R., Roumagnac, P., Varsani, A., ICTV Report Consortium, 2017. ICTV  
185 Virus Taxonomy Profile: *Geminiviridae*. *J. Gen. Virol.* 98, 131-133.
- 186
- 187
- 188
- 189
- 190
- 191
- 192
- 193
- 194
- 195
- 196
- 197

198 **Table 1.** Primer sequences used for amplification of BGMV DNA-A and DNA-B genomic  
 199 components and pJL-89 binary vector.

Name	Sequence (5' – 3')	Target
BGMV-A-U1-For	AACATGGTGGAGCACGACACTCTACGTTGTACATCTTGAA	DNA-A
BGMV-A-U1-Rev	AACGTAGAGGATCCACTTCACACAACGACC	
BGMV-A-U2-For	TGTGAAGTGGATCCTCTACGTTGTACATCT	DNA-A
BGMV-A-U2-Rev	GAACGATCGGGGAAATTCGAACTTCACACAACGACCAGAA	
BGMV-B-U1-For	AACATGGTGGAGCACGACACTGAGCGTGTTTTTCAAATCC	DNA-B
BGMV-B-U1-Rev	AACACGCTCAACTAGTTGCGGAACTGAAAT	
BGMV-B-U2-For	GTTCCGCAACTAGTTGAGCGTGTTTTTCAA	DNA-B
BGMV-B-U2-Rev	GAACGATCGGGGAAATTCGATGCGGAACTGAAATAGACGG	
pJL89-Nos-For	TCGAATTTCCCGATCGTTC	pJL-89
pJL89-no35S-Rev	GTGTCGTGCTCCACCATGTT	

200

201

202

203

204

205

206

207

208

209

210

211

212

213

214

215

216

217 **List of figures**

218 **Fig. 1.** Strategy to construct dimeric agroinfectious clone of BGMV into pJL-89 binary vector.

219 (a) DNA-A genomic component; viral inserts (first and second units) are represented by grey  
220 rectangles; primer-pairs containing overlap sequences are indicated by grey arrows. (b) DNA-  
221 B genomic component; viral inserts (first and second units) are represented by grey rectangles;  
222 primer-pairs containing overlap sequences are indicated by grey arrows. *Bam*HI (DNA-A) and  
223 *Spe*I (DNA-B) restriction sites are represented by dotted rectangles.

224

225 **Fig. 2.** Agroinoculation tests using infectious clone of BGMV. (a) common bean cv. 'Pérola'  
226 displaying yellow mosaic symptoms; (b) symptomless control plant; (c) BGMV DNA-A  
227 detection from symptomatic plants 15 dpa (lanes 1-5) and 30 dpa (lanes 6-10); no amplification  
228 fragment was observed from control plants (lanes 11 and 12); (d) BGMV DNA-B detection  
229 from symptomatic plants 15 dpa (lanes 1-5) and 30 dpa (lanes 6-10); no amplification fragment  
230 was observed from control plants (lanes 11 and 12).

231

232 **Supplementary Fig. 1.** PCR-GA approach for construction of infectious clones of circular  
233 DNA plant viruses as begomoviruses. Grey color represents the plasmid vector where a full-  
234 length copy of the viral genomic component (indicated in green) was inserted; binary plasmid  
235 vector is represented by dark color; blue and yellow represent the two slightly different viral  
236 units (amplified from the monomeric clone) containing overlapping regions required for GA.

237

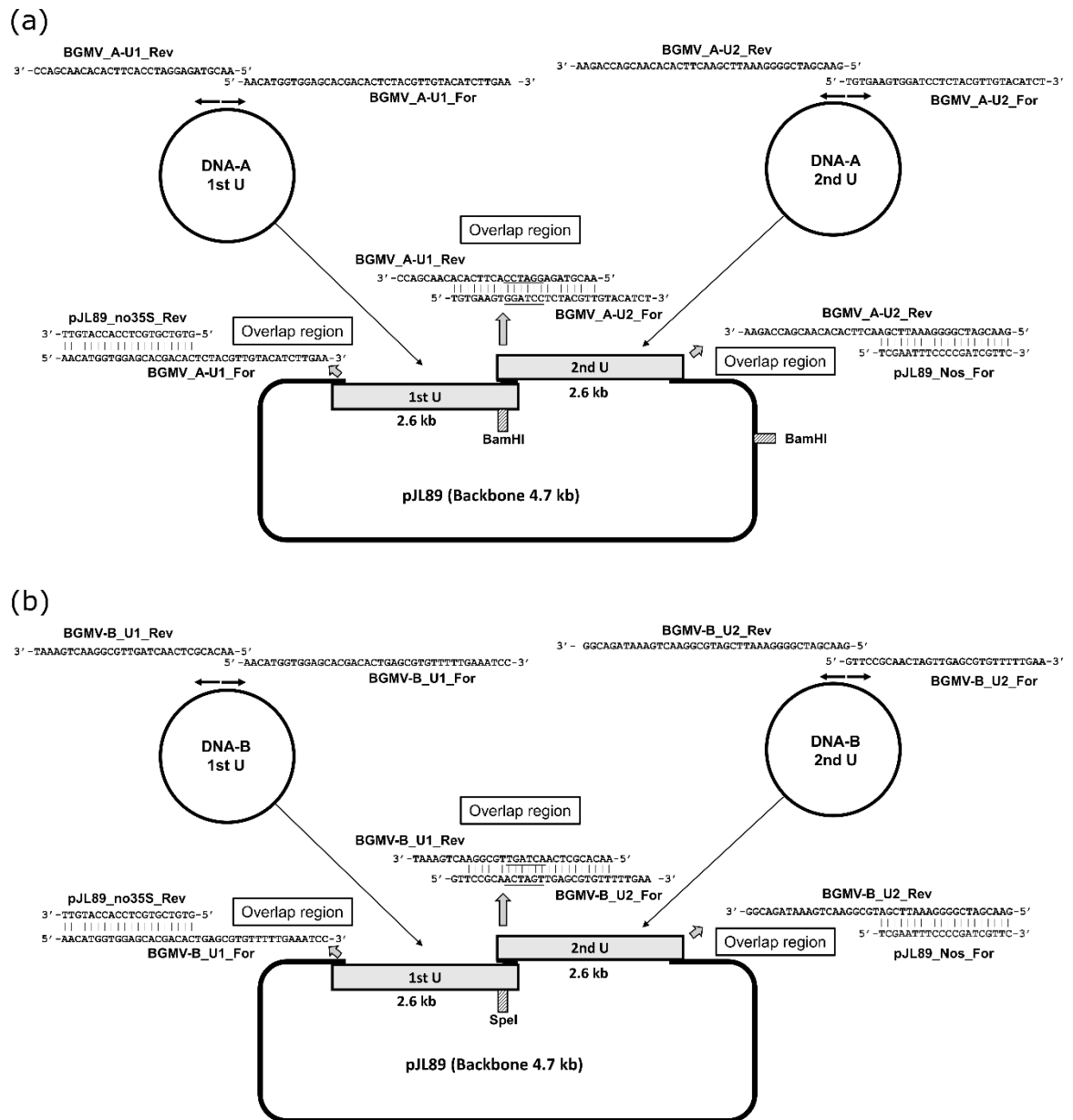
238

239

240

241

242 Fig. 1.



243

244

245

246

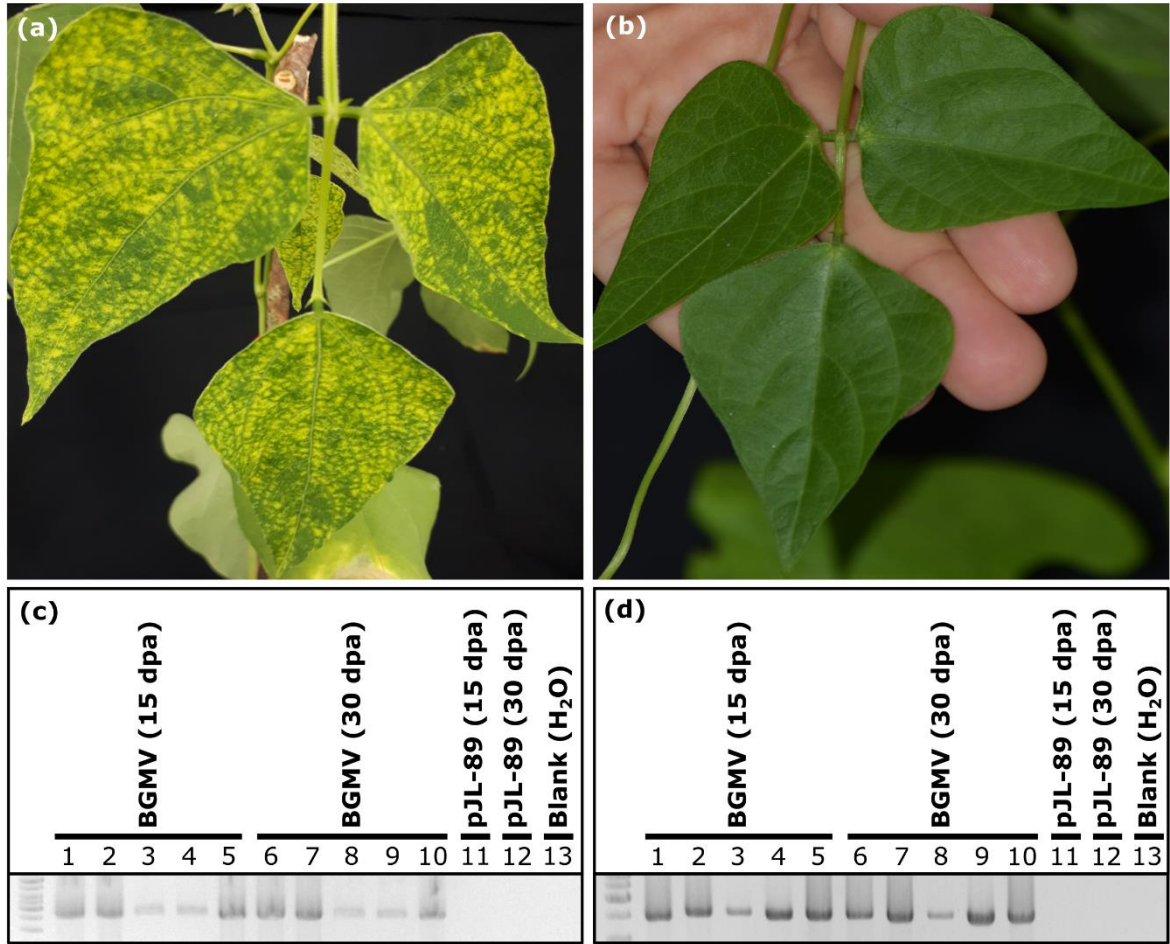
247

248



249 **Fig. 2.**

250



251

252

253

254

255

256

257

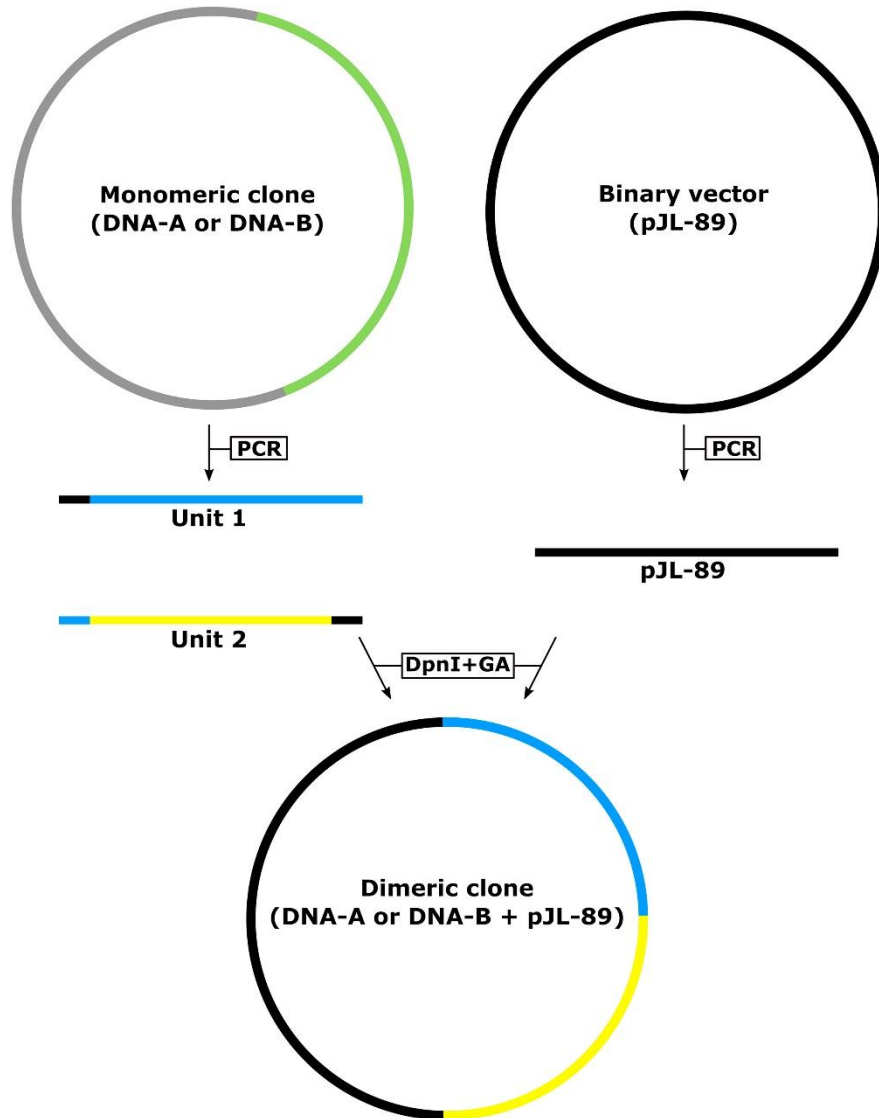
258

259

260

261 **Supplementary Fig. 1.**

262



263

## **4 CAPÍTULO II**

CONSTRUÇÃO DE CLONE INFECCIOSO E DETERMINAÇÃO DA GAMA DE  
HOSPEDEIROS DO BEGOMOVÍRUS *Macrotilium yellow spot virus*

## 1 Construção de clone infeccioso e determinação da gama de hospedeiros do begomovírus

2 *Macrotilium yellow spot virus*

### 4 RESUMO

6 O gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*) inclui vírus com genoma composto por uma ou  
7 duas moléculas de DNA fita simples, são transmitidos por um complexo de espécies crípticas  
8 de *Bemisia tabaci* e infectam plantas dicotiledôneas. Dentre os principais problemas  
9 fitossanitários que afetam a cultura dos feijoeiros, destacam-se as begomoviroses, que podem  
10 causar até 100% de perdas. No Brasil, *Bean golden mosaic virus* (BGMV) e *Macrotilium*  
11 *yellow spot virus* (MaYSV) são os begomovírus de maior importância econômica para os  
12 feijoeiros. A emergência do MaYSV como um dos principais begomovírus em campos de  
13 cultivo de feijoeiros no Nordeste do Brasil ressalta a importância de melhor compreender a  
14 biologia desta espécie viral. Portanto, o objetivo do presente estudo foi a obtenção de clone  
15 infeccioso de MaYSV, utilizando-se o método PCR-GA, e a determinação da sua gama de  
16 hospedeiros. Clones dos componentes DNA-A e DNA-B de MaYSV (isolado 100AL) foram  
17 utilizados para construção de clones infecciosos via Gibson Assembly (GA). Alíquotas das  
18 reações de GA foram utilizadas para transformar células eletrocompetentes de *Escherichia coli*  
19 DH10B, e a ligação dos fragmentos virais em vetor binário pJL-89 foi confirmada por digestão  
20 enzimática e sequenciamento. DNA plasmidial das construções confirmadas foi utilizado para  
21 transformação de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa GV3101), e a infectividade dos clones foi  
22 testada via agroinoculação em plantas de feijão comum 'cv. Pérola'. DNA total foi extraído a  
23 partir de amostras foliares (infectadas sistemicamente) coletadas aos 15 e 30 dias após  
24 agroinfiltração (daa), e utilizado como template para detecção viral utilizando primers espécie-  
25 específicos. As plantas agroinfiltradas com o clone infeccioso apresentaram sintomas de  
26 mosaico amarelo severo 15 daa, enquanto as plantas controle (pJL-89 sem insertos virais) foram  
27 assintomáticas. Ambos os componentes genômicos DNA-A e DNA-B de MaYSV foram  
28 detectados em folhas infectadas sistemicamente. Este é o primeiro relato da construção de um  
29 clone agroinfeccioso do begomovírus *Macrotilium yellow spot virus* usando Gibson  
30 Assembly. Nos testes de gama de hospedeiros, o clone infeccioso de MaYSV, foi capaz de  
31 infectar sistemicamente e causar sintomas de mosaico e subdesenvolvimento em *P. vulgaris*.

33 **Palavras-chave:** Geminivírus, *Macrotilium lathyroides*, Gibson Assembly, MaYSV.

41 **ABSTRACT**

42

43 The genus *Begomovirus* (family *Geminiviridae*) includes viruses with a genome composed of  
44 one or two single-stranded DNA molecules, are transmitted by a complex of cryptic *Bemisia*  
45 *tabaci* species and infect dicotyledonous plants. Among the major phytosanitary problems that  
46 affect bean culture, begomoviruses stand out, which can cause up to 100% losses. In Brazil,  
47 *Bean golden mosaic virus* (BGMV) and *Macroptilium yellow spot virus* (MaYSV) are the  
48 begomovirus of major economic importance for the leguminous. The emergence of MaYSV as  
49 one of the main begomoviruses in bean fields in Northeast Brazil highlights the importance of  
50 better understanding the biology of this viral species. Therefore, the objective of the present  
51 study was to obtain an infectious clone of MaYSV, using the PCR-GA method, and the  
52 determination of its host range. Clones of the DNA-A and DNA-B components of MaYSV  
53 (isolated 100AL) were used to construct infectious clones by Gibson Assembly (GA). Aliquots  
54 of the GA reactions were used to transform *Escherichia coli* DH10B electrocompetent cells,  
55 and binding of the viral fragments into pJL-89 binary vector was confirmed by enzymatic  
56 digestion and sequencing. Plasmid DNA from the confirmed constructs was used for  
57 transformation of *Agrobacterium tumefaciens* (strain GV3101), and the infectivity of the clones  
58 was tested by agroinoculation in common bean 'cv. Pérola'. Total DNA was extracted from leaf  
59 samples (systemically infected) collected at 15- and 30-days post agroinfiltration (dpa), and  
60 used as template for viral detection using species-specific primers. Inoculated plants with the  
61 infectious clone showed symptoms of severe yellow mosaic and stunting 15 dpa, whereas  
62 control plants (pJL-89 without viral inserts) were asymptomatic. Both genomic DNA-A and B-  
63 DNA components of MaYSV were detected in systemically infected leaves. This is the first  
64 report of the construction of an agroinfectious clone of begomovirus *Macroptilium yellow spot*  
65 *virus* using Gibson Assembly. For the host range experiments, the MaYSV infectious clone  
66 was able to infect systemically and cause mosaic and stunting symptoms in *P. vulgaris*.

67

68 **Keywords:** Geminiviruses, *Macroptilium lathyroides*, Gibson Assembly, MaYSV.

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

## 79 4.1 INTRODUÇÃO

80

81 A família *Geminiviridae* possui vírus com genoma de DNA circular de fita simples  
82 encapsidados em partículas geminadas de morfologia quasi-icosaédrica, e inclui nove gêneros  
83 estabelecidos com base na organização genômica, filogenia, inseto-vetor e gama de hospedeiros  
84 (VARSANI et al., 2014, 2017; ZERBINI et al., 2017). O gênero *Begomovirus* é considerado o  
85 mais importante economicamente e maior em número de espécies, as quais possuem genomas  
86 monopartidos ou bipartidos, conhecidos como DNA-A e DNA-B, e são transmitidas por um  
87 complexo de espécies crípticas de *Bemisia tabaci* (BROWN et al., 2015; NAVAS-CASTILLO  
88 et al., 2011; ROJAS et al., 2005).

89 Dentre as espécies de begomovírus que infectam leguminosas, *Bean golden mosaic*  
90 *virus* (BGMV) e *Macrottilium yellow spot virus* (MaYSV) são consideradas as mais  
91 importantes no Brasil (RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Além de plantas cultivadas,  
92 *Macrottilium lathyroides*, planta não-cultivada encontrada comumente em associação com  
93 feijoeiros, tem sido relatada como hospedeira dos begomovírus *Macrottilium yellow mosaic*  
94 *virus*, *Macrottilium yellow mosaic Florida virus*, *Macrottilium mosaic Puerto Rico virus* e  
95 MaYSV, os quais são capazes de infectar sistemicamente plantas de feijão comum (*Phaseolus*  
96 *vulgaris*) e feijão-fava (*P. lunatus*) (AMARAKOON et al., 2008; IDRIS et al., 2003; SILVA et  
97 al., 2012; LIMA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). É também conhecido que *M.*  
98 *lathyroides* pode servir como hospedeiro alternativo para *Bean golden yellow mosaic virus* e  
99 BGMV, begomovírus de grande importância econômica na cultura dos feijoeiros nas américas  
100 (BRACERO; RIVERA; BEAVER, 2003; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Dada a  
101 emergência do MaYSV como um dos principais begomovírus em campos de cultivo de  
102 feijoeiros no Nordeste do Brasil, é crucial o melhor entendimento da biologia desta espécie  
103 viral.

104 A técnica de construção de clones infecciosos permite a elucidação de vários aspectos  
105 da replicação viral e interação vírus/hospedeiro/vetor, bem como auxiliar no *screening* de  
106 variedades resistentes em programas de melhoramento genético de espécies cultivadas.  
107 Diversas estratégias para a construção de clones infecciosos de begomovírus têm sido relatadas  
108 (BURAGOHAİN et al., 1994; FERREIRA et al., 2008; NAGATA; INOUE-NAGATA, 2015;  
109 STENGER et al., 1991), sendo recentemente descrita uma abordagem rápida empregando PCR  
110 e Gibson Assembly (PCR-GA) (FERRO et al., 2019). No presente trabalho, um clone  
111 infeccioso de MaYSV foi obtido através de PCR-GA, o qual foi infectivo em plantas de  
112 *Phaseolus vulgaris* cv. 'Pérola'.

## 113 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 114 4.2.1 Isolado viral e obtenção dos clones de MaYSV

115

116 Os componentes genômicos DNA-A e DNA-B de MaYSV (isolado 100AL; número de  
117 acesso GenBank KJ939861), previamente clonados em vetor plasmidial pBluescript KS+  
118 (RAMOS-SOBRINHO et al., 2014), foram utilizados para construção de clones infecciosos via  
119 PCR-GA (FERRO et al., 2019).

120

### 121 4.2.2 Construção de clone infeccioso de MaYSV por Gibson Assembly

122

123 Para a construção de clone infeccioso de geminivírus, é necessário clonar duas unidades  
124 (dímero) de cada segmento do genoma (no mínimo duas origens de replicação) no mesmo  
125 plasmídeo. Para isto, primers foram desenvolvidos para amplificar duas unidades do genoma  
126 (1 e 2) com 20-22 nucleotídeos (nt) de sobreposição entre as unidades 1 e 2, e 20 nt sobrepostos  
127 entre os segmentos genômicos e o vetor plasmidial (Figura 1; Tabela 1). Os pares de primers  
128 MaYSV\_A-U1\_For/MaYSV\_A-U1\_Rev e MaYSV\_A-U2\_For/MaYSV\_A-U2\_Rev foram  
129 utilizados para amplificar as unidades 1 e 2 do DNA-A de MaYSV, respectivamente, enquanto  
130 MaYSV-B-U1-For/MaYSV-B-U1-Rev e MaYSV-B-U2-For/MaYSV-B-U2-Rev foram  
131 utilizados para o DNA-B de MaYSV (Tabela 1). O vetor binário pJL-89 (LINDBO, 2007) foi  
132 amplificado com os primers pJL89\_Nos\_For/pJL89\_no35S\_Rev (Tabela 1).

133 Clones do DNA-A e DNA-B foram utilizados, individualmente, como molde para as  
134 reações de amplificação com a enzima Q5<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase (New England  
135 BioLabs, Ipswich, USA). Os fragmentos amplificados foram analisados em gel de agarose a  
136 1%, individualmente purificados usando Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Uppsala,  
137 Sweden) e tratados com a enzima DpnI para degradação do DNA plasmidial metilado usado  
138 como molde. Posteriormente, os dímeros do DNA-A e DNA-B foram montados usando Gibson  
139 Assembly<sup>®</sup> Cloning Master Mix (New England BioLabs) segundo o protocolo descrito pelo  
140 fabricante. Resumidamente, 2,5 µL do vetor pJL-89 purificado em gel (40 ng\µL), 2,2 µL das  
141 unidades 1 e 2 do genoma viral purificados em gel (DNA-A ou DNA-B; 50 ng\µL), 1 µL do  
142 Tampão 10X CutSmart, 1,1 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura, e 1,0 µL de DpnI foram misturados e  
143 incubados a 37°C por 1h. Aos 10 µL totais da reação foram adicionados 10 µL do mix GA  
144 (volume total de 20 µL) e incubados a 50°C por 1 h. Após a incubação, a reação foi dialisada,  
145 por 15 minutos, utilizando uma membrana de celulose (VSWP, 0.025 µm) (Merck-Millipore,  
146 Darmstadt, Germany).

147 Alíquotas das reações de GA (2  $\mu$ L) foram usadas para transformação de células  
148 eletrocompetentes de *E. coli* (cepa DH10B). Colônias bacterianas foram repicadas para meio  
149 Luria-Bertani (LB) líquido e incubadas a 37°C por 18 horas. Após incubação, as culturas foram  
150 submetidas à extração de DNA plasmidial com KIT Wizard® Plus SV Minipreps DNA  
151 Purification System (Promega, Madison, USA). Para a confirmação do processo de clonagem,  
152 DNA plasmidial foi digerido com as enzimas *Bam*HI (DNA-A) e *Spe*I (DNA-B), e também  
153 sequenciados na Macrogen, Inc. (Seul, Coréia do Sul). As sequências nucleotídicas dos  
154 possíveis clones infecciosos foram analisadas utilizando o software Geneious (KEARSE et al.,  
155 2012).

156

#### 157 **4.2.3 Ensaios de agroinfiltração do clone infeccioso de MaYSV**

158

159 As construções dos clones do DNA-A e DNA-B de MaYSV (confirmadas por digestão  
160 enzimática e sequenciamento) foram usadas para transformação de *Agrobacterium tumefaciens*  
161 cepa GV3101:pMP90 (background C58; pTiC58DT-DNA), e a infectividade testada por  
162 agroinfiltração de acordo com o protocolo descrito em Hou et al. (1998). Os ensaios foram  
163 realizados em casa de vegetação no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de  
164 Alagoas (CECA/UFAL). Para a agroinoculação de ambos os componentes virais, as culturas  
165 de *A. tumefaciens* GV3101 do DNA-A e DNA-B foram ajustadas para uma OD<sub>600</sub> de 0,5 e  
166 misturadas em volumes iguais. Em seguida, 0,5 mL dessas culturas em mistura foram utilizadas  
167 para agroinocular mudas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. 'Pérola', com 10 dias de idade,  
168 em quatro locais aproximadamente 1 cm abaixo do ápice da parte aérea. Plantas controle foram  
169 agroinfiltradas com *A. tumefaciens* GV310 contendo vetor pJL-89 vazio (sem inserto viral). As  
170 plantas agroinfiltradas foram mantidas em gaiolas com proteção de tela anti-mosca-branca a 25  
171  $\pm$  2 °C e fotoperíodo de 12 h.

172 DNA total foi individualmente extraído a partir amostras foliares coletadas aos 15 e 30  
173 dias após agroinfiltração (daa) (DOYLE; DOYLE, 1987), e utilizado como molde para detecção  
174 de MaYSV usando os pares de primers específicos MaYSV-Det\_1137\_For/MaYSV-  
175 Det\_1427\_Rev (DNA-A) ou MaYSV-B\_Det\_1311\_For/MaYSV-B\_Det\_1640\_Rev (DNA-B)  
176 (Tabela 1). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 15  $\mu$ L, contendo 1,5  
177  $\mu$ L de tampão 10X PCR, 1,2  $\mu$ L da mistura de dNTPs a 10 mM, 1  $\mu$ L de cada oligonucleotídeo  
178 a 10  $\mu$ M, 10 ng do DNA molde, e uma unidade de *Taq* DNA Polymerase, completando-se o  
179 volume com H<sub>2</sub>O ultrapura. As condições de termociclagem consistiram em uma desnaturação  
180 inicial de 94°C por 3 minutos e 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento



181 a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 90 segundos, seguindo de uma extensão final a  
182 72°C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1% sob  
183 luz UV.

184

#### 185 **4.2.4 Determinação da gama de hospedeiros de MaYSV**

186

187 O clone infeccioso dos componentes DNA-A e DNA-B de MaYSV foi agroinoculado  
188 pelo método de punção com agulha (HOU et al., , 1998) em plantas das famílias Solanaceae  
189 (*Solanum lycopersicum* ‘Cruz Cada Paulista’, *Capsicum annuum* ‘Casca Dura Ikeda’ e  
190 *Nicotiana benthamiana*) e Fabaceae (*Glycine max* ‘Davis’, *Phaseolus vulgaris* ‘Pérola’, *P.*  
191 *lunatus* ‘G51’ e *Macroptilium lathyroides*). Em *Nicotiana benthamiana*, três folhas jovens  
192 foram agroinfiltradas na face abaxial com seringas sem agulhas. As culturas de *A. tumefaciens*  
193 GV3101 do DNA-A e DNA-B foram ajustadas para uma OD<sub>600</sub> de 0,5, misturadas em volumes  
194 iguais e, em seguida, 0,5 mL da solução foi utilizada para agroinocular cinco mudas de cada  
195 espécie testada. Plantas controle foram agroinoculadas com culturas de *A. tumefaciens* (cepa  
196 GV3101) contendo vetor pJL-89 vazio (sem DNA viral). As plantas foram mantidas em gaiolas  
197 com proteção de tela anti-mosca-branca, com o surgimento de sintomas sendo monitorado por  
198 30 daa, e a infecção viral confirmada via PCR usando primers específicos (Tabela 1).

199

### 200 **4.3 RESULTADOS**

201

#### 202 **4.3.1 Confirmação da construção do clone infeccioso de MaYSV por Gibson Assembly**

203

204 Dímeros com aproximadamente 9,9 kb em comprimento (2,6 kb para cada unidade  
205 genômica viral e 4,7 kb para o vetor pJL-89) foram obtidos para ambos componentes DNA-A  
206 e DNA-B de MaYSV (isolado 100AL) utilizando a abordagem de Gibson Assembly (Figura 1a  
207 e b). Digestão das construções para o componente DNA-A com a endonuclease *Bam*HI mostrou  
208 a presença de dois fragmentos, um de 3,0 kb, correspondente a unidade 2 do genoma viral (2,6  
209 kb) mais 0,4 kb do vetor pJL-89, e outro de aproximadamente 6,9 kb, correspondente a unidade  
210 1 do genoma viral (2,6 kb) mais 4,3 kb do vetor binário pJL-89. Para o componente DNA-B,  
211 após digestão com *Spe*I, foi observada a presença de um fragmento com aproximadamente 9,9  
212 kb, correspondente à soma das unidades 1 e 2 do genoma viral (2,6 kb cada) e o vetor binário  
213 pJL89 (4,7 kb) (Figura 2a e b). Adicionalmente, construções foram confirmadas através de  
214 sequenciamento Sanger do DNA plasmidial.

### 215 4.3.2 Avaliação da infectividade do clone de MaYSV

216

217 As plantas de feijão-comum cv. ‘Pérola’ agroinoculadas com as construções diméricas  
218 de MaYSV apresentaram sintomas de mosaico dourado 15 daa, enquanto plantas agroinfiltradas  
219 com *Agrobacterium* contendo apenas vetor pJL-89 vazio (sem inserto viral) não demonstraram  
220 sintomas de infecção viral 30 daa (Figura 3a e b). Folhas sistêmicas (não inoculadas), a partir  
221 de plantas sintomáticas, foram PCR positivas para ambos componentes genômicos DNA-A  
222 (840 pb) e DNA-B (320 pb) aos 15 e 30 daa. As plantas controle foram PCR negativas em  
223 ambos tempos de amostragem (Figura 3c e d).

224

### 225 4.3.3 Determinação da gama de hospedeiros de MaYSV

226

227 Sintomas de infecção viral como mosaico e subdesenvolvimento foram observados em  
228 plantas de feijão-comum (Figura 4). O componente genômico DNA-A foi detectado, via PCR,  
229 em folhas de feijão-comum infectadas sistemicamente (não inoculadas) a partir de quatro das  
230 cinco plantas inoculadas. Já o DNA-B foi detectado em três das cinco plantas inoculadas.  
231 Apesar de assintomáticas, DNA-A e DNA-B foram detectados em cinco e quatro das cinco  
232 plantas de *N. benthamiana* inoculadas, respectivamente (Figura 6). Em *S. lycopersicum*, foi  
233 detectado apenas o componente genômico DNA-A em uma das cinco plantas inoculadas, sem  
234 sintoma sendo observado. As plantas de *G. max*, *P. lunatus*, *M. lathyroides* e *C. annuum* não  
235 apresentaram sintomas de infecção viral, e testaram negativas para ambos componentes  
236 genômicos (Tabela 2).

237

## 238 4.4 DISCUSSÃO

239

240 No Brasil, desde a década de 1970, o *Bean golden mosaic virus* (BGMV) tem sido um  
241 importante patógeno infectando *Phaseolus* spp. (COSTA, 1976; FARIA e MAXWELL, 1999;  
242 FARIA et al., 2000), causando perdas de produção entre 40 e 100% (MORALES, 2010). Além  
243 do BGMV, outras espécies de begomovírus como MaYSV e *Sida micrantha mosaic virus*  
244 (SimMV) foram relatadas infectando feijoeiros e hospedeiras leguminosas não-cultivadas no  
245 Brasil (FERNANDES-ACIOLI et al., 2011; SILVA et al., 2012; RAMOS-SOBRINHO et al,  
246 2014; INOUE-NAGATA; LIMA; GILBERTSON, 2016). O primeiro relato de MaYSV ocorreu  
247 em 2009, infectando *Macroptilium lathyroides*, nos estados de Sergipe e Paraíba (SILVA et al.,  
248 2012), sendo posteriormente descrito em outras hospedeiras leguminosas cultivadas e não-

249 cultivadas nos estados de Alagoas e Pernambuco (FONTENELE et al. 2016; RAMOS-  
250 SOBRINHO et al. 2014). Em 2011, MaYSV foi o begomovírus mais frequentemente  
251 encontrado em hospedeiras leguminosas cultivadas no estado Alagoas, indicando uma possível  
252 substituição do BGMV como principal begomovírus em feijoeiros (RAMOS-SOBRINHO et  
253 al., 2014). Esta situação pode já estar consolidada para o estado de Alagoas e, provavelmente,  
254 para outros estados da região Nordeste. Em contraste, MaYSV não foi descrito em lavouras de  
255 feijão-comum em áreas produtoras situadas nas regiões Centro-Oeste e Sudeste, onde BGMV  
256 foi o begomovírus prevalente (RAMOS-SOBRINHO et al. 2014).

257 A construção de clones infecciosos dos begomovírus que ocorrem em feijoeiros no  
258 Brasil é fundamental para ampliar as pesquisas de caracterização molecular e biológica,  
259 identificar a gama de hospedeiros desses patógenos, além de auxiliar programas de  
260 melhoramento genético visando resistência contra infecção viral. Para o gênero *Begomovirus*,  
261 a obtenção de clones infecciosos tem sido comumente realizada pela abordagem de RCA  
262 (*rolling circle amplification*) e posterior digestão enzimática (FERREIRA et al., 2008; WU et  
263 al., 2008; NAGATA; INOUE-NAGATA, 2015; BANG et al., 2014). Entretanto, um método  
264 rápido e eficiente baseado em PCR e Gibson Assembly (PCR-GA) foi recentemente publicado  
265 (FERRO et al., 2019), o qual foi empregado para a construção do clone agroinfeccioso de  
266 MaYSV relatado no presente estudo.

267 GA combina a ação de três enzimas em uma única reação: T5 exonuclease, DNA  
268 polimerase e DNA ligase termoestáveis (GIBSON et al., 2009). Esse método de clonagem foi  
269 utilizado com sucesso para montar o genoma de *Mycoplasma genitalium* (GIBSON et al.,  
270 2009), o genoma mitocondrial de camundongo (GIBSON et al., 2010), e produzir diferentes  
271 construções para análise de genes em *Trypanosoma brucei* (McALLASTER et al., 2016). A  
272 técnica foi ainda aplicada para montar os genomas do *Dengue virus* (DENV), *West nile*  
273 *virus* (WNV) e *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV)  
274 (SIRIDECHADILOK et al., 2013; VANDERGAAST et al., 2014; SUHARDIMAN et al.,  
275 2015).

276 O procedimento de clonagem GA também tem sido utilizado para a construção de clones  
277 infecciosos de vírus de plantas com genoma de RNA. Bordat et al. (2015) utilizaram GA para  
278 construir um clone infeccioso a partir do cDNA do potivírus *Lettuce mosaic virus* (LMV). A  
279 mesma estratégia foi empregada na obtenção de clones infecciosos do *Tomato blistering mosaic*  
280 *virus* (*Tymovirus*, BLAWID; NAGATA, 2015), *Bean rugose mosaic virus* (*Comovirus*,  
281 BIJORA et al., 2017), *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV; CARVALHO et al., 2017) e do  
282 polerovírus *Beet chlorosis virus* (WETZEL et al., 2018).

283 A infectividade das construções diméricas do MaYSV (isolado 100AL) foi confirmada  
284 em plantas de feijão-comum cv. 'Pérola', com sintomas sendo semelhante aos observados em  
285 condições de campo (RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Além disso, MaYSV foi capaz de  
286 infectar sistemicamente plantas de tomate e *N. benthamiana*. Em feijão-comum, os sintomas  
287 ocorreram apenas em plantas onde foram detectados DNA-A e DNA-B, ressaltando a  
288 importância da presença de ambos os componentes genômicos para o estabelecimento da  
289 infecção sistêmica na planta hospedeira (BROWN et al., 2012; 2015). Por outro lado, estudos  
290 demonstraram que o isolado do begomovírus bipartido *Tomato chlorotic mottle virus*  
291 [ToCMV-(MG-Bt1)] foi capaz de infectar sistemicamente e induzir sintomas em *N.*  
292 *benthamiana* e tomateiro na ausência do DNA-B (GALVÃO et al., 2003; FONTENELLE et  
293 al., 2007). Curiosamente, o clone infeccioso do MaYSV não foi capaz de infectar *P. lunatus*,  
294 planta hospedeira original do isolado 100AL, e *Macroptilium lathyroides*, reservatório natural  
295 dessa virose (SILVA et al., 2012; LIMA et al., 2013; RAMOS-SOBRINHO et al., 2014). Estes  
296 dados indicam uma melhor adaptação do MaYSV em *P. vulgaris*, podendo ser responsável pela  
297 predominância do MaYSV em plantações de feijoeiros no Nordeste do Brasil. Resultados  
298 similares foram observados para o begomovírus *Soybean chlorotic spot virus* (SoCSV), o qual  
299 foi descrito inicialmente em soja, porém induz sintomas mais severos em *P. vulgaris* que em  
300 *Glycine max*, sua planta hospedeira natural (COCO et al., 2013). O BGMV provoca sintomas  
301 devastadores em feijoeiros (seus hospedeiros naturais), porém sintomas mais leves em soja, não  
302 comprometendo a produtividade desta cultura (FERNANDES et al., 2009).

303 Os componentes genômicos DNA-A e DNA-B foram detectados na maioria das plantas  
304 de *N. benthamiana* agroinoculadas, porém não foram observados sintomas de infecção durante  
305 o período de avaliação. Já em *S. lycopersicum*, foi detectado apenas o componente genômico  
306 DNA-A em uma das plantas testadas, não sendo observado nenhum sintoma de infecção viral.  
307 Estes dados sugerem que a gama de hospedeiros de MaYSV seja restrita a membros da família  
308 Fabaceae, já que essa virose foi descrita apenas em leguminosas (SILVA et al., 2012; RAMOS-  
309 SOBRINHO et al., 2014; FONTENELE et al., 2016). Resultados similares foram observados  
310 para o begomovírus *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), o qual apresenta a gama de  
311 hospedeiros restrita a plantas da família Solanaceae (FERNANDES et al., 2006). Foi também  
312 demonstrada a capacidade de outros begomovírus infectarem mais de uma família botânica  
313 como *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV),  
314 *Passionfruit severe leaf distortion virus* (PSLDV) e SoCSV (CALEGARIO et al., 2007;  
315 RIBEIRO et al., 2007; FERREIRA et al., 2010; COCO et al., 2013). No teste de gama de  
316 hospedeiros, observou-se ainda uma baixa taxa de infectividade do agroclone de MaYSV em

317 hospedeiras leguminosas como *Macroptilium lathyroides* e *P. lunatus*, sendo necessária a  
318 utilização de outros métodos de inoculação antes de uma conclusão definitiva sobre a  
319 infectividade de MaYSV nessas hospedeiras. Finalmente, o clone infeccioso descrito no  
320 presente estudo pode ser útil para estudos de interações vírus-planta-vetor, e caracterização de  
321 genes virais.

322

#### 323 **4.5 CONCLUSÕES**

324

325 Este é o primeiro relato da construção de um clone agroinfeccioso do begomovírus  
326 *Macroptilium yellow spot virus*, o qual é biologicamente ativo em plantas de feijão-comum (*P.*  
327 *vulgaris*), *N. benthamiana* e tomate (*S. lycopersicum*). O isolado 100AL de MaYSV apresentou  
328 melhor adaptação em *P. vulgaris*, onde foram observados sintomas e infecção sistêmica, que  
329 em *M. lathyroides* e *P. lunatus*, consideradas reservatórios naturais dessa espécie viral.  
330 Entretanto, os testes de gama de hospedeiros devem ser repetidos antes de uma conclusão  
331 definitiva.

332

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350 **Tabela 1.** Sequências de primers usadas para para amplificação dos componentes genômicos  
 351 DNA-A e DNA-B de MaYSV e do vetor binário pJL89.

352

Nome	Sequência (5' – 3')	Alvo
MaYSV_A-U1_For MaYSV_A-U1_Rev	AACATGGTGGAGCACGACACTCTACGTTGTACATCTTGAA AACGTAGAGGATCCACTTCACACAACGACC	DNA-A
MaYSV_A-U2_For MaYSV_A-U2_Rev	TGTGAAGTGGATCCTCTACGTTGTACATCT GAACGATCGGGGAAATTCGAACTTCACACAACGACCAGAA	DNA-A
MaYSV-B_U1_For MaYSV-B_U1_Rev	AACATGGTGGAGCACGACACTGAGCGTGTTTTTGAAATCC AACACGCTCAACTAGTTGCGGAACTGAAAT	DNA-B
MaYSV_B-U2_For MaYSV-B_U2_Rev	GTTCCGCAACTAGTTGAGCGTGTTTTTGAA GAACGATCGGGGAAATTCGATGCGGAACTGAAATAGACGG	DNA-B
pJL89_Nos_For pJL89_no35S_Rev	TCGAATTTCCCGATCGTTC GTG TCG TGC TCC ACC ATG TT	pJL-89
MaYSV_A_Det_308_For MaYSV_A_Det_1149_Rev	GGAGGTGGAGGTCCAAAAA TCTGGGACGACATATTTAGT	DNA-A
MaYSV-B_Det_1311_For MaYSV-B_Det_1640_Rev	GTTGTTTATTATTTCCAAGCATTG TCTATAGGAGTCAGCTCAAAT	DNA-B

353

354 **Tabela 2.** Avaliação da infecção de plantas agroinoculadas com clone infeccioso de MaYSV.

355

Espécie, 'cultivar'	MaYSV (DNA-A)	MaYSV (DNA-B)	Controle (DNA-A e B)	Sintomas
	Plantas infectadas/agroinoculadas	Plantas infectadas/agroinoculadas	Plantas infectadas/agroinoculadas	
<i>Phaseolus vulgaris</i> 'Pérola'	4/5	3/5	0/5	Mosaico e subdesenvolvimento
<i>Glycine max</i> 'Davis'	0/5	0/5	0/5	-
<i>Macroptilium lathyroides</i>	0/5	0/5	0/5	-
<i>P. lunatus</i> 'G51'	0/4	0/4	0/4	-
<i>Nicotiana benthamiana</i>	5/5	4/5	0/5	Sem sintomas aparentes
<i>Solanum lycopersicum</i> 'Cruz Kada Paulista'	1/5	0/5	0/5	-
<i>Capsicum annuum</i> 'Casca Dura Ikeda'	0/5	0/5	0/5	-

356 \* **DNA-A** (detecção com primer para o DNA-A);

357 **DNA-B** (detecção com primer para o DNA-B);

358 **Controle** (plantas agroinoculadas somente com o vetor pJL-89).

359

360

361

362

363

364

365

366

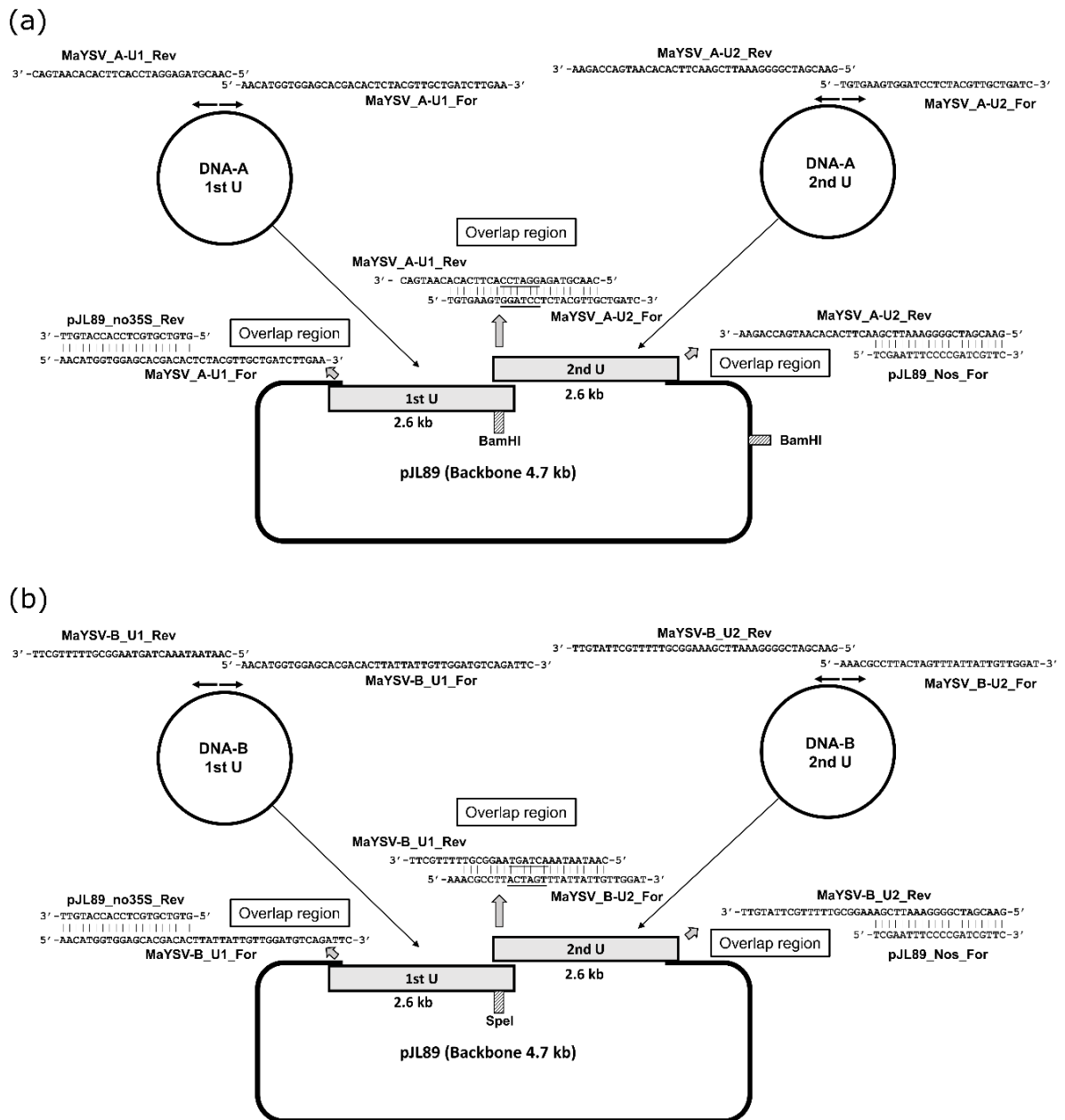
367

368

369

370

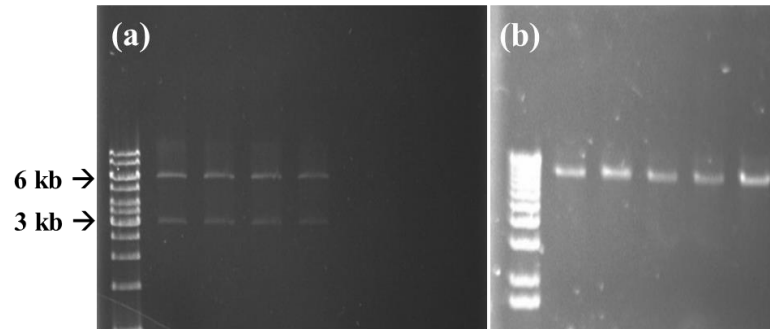
371



372

373 **Figura 1.** Estratégia para construção do clone agroinfeccioso dimérico de MaYSV em vetor  
 374 binário pJL-89. (a) componente genômico DNA-A; inserções virais (primeira e segunda  
 375 unidades) são representadas por retângulos cinzas; pares de iniciadores contendo sequências de  
 376 sobreposição são indicados por setas cinzas. (b) componente genômico DNA-B; inserções  
 377 virais (primeira e segunda unidades) são representadas por retângulos cinzas; pares de  
 378 iniciadores contendo sequências de sobreposição são indicados por setas cinzas. Os sítios de  
 379 restrição de BamHI (DNA-A) e SpeI (DNA-B) são representados por retângulos tracejados.

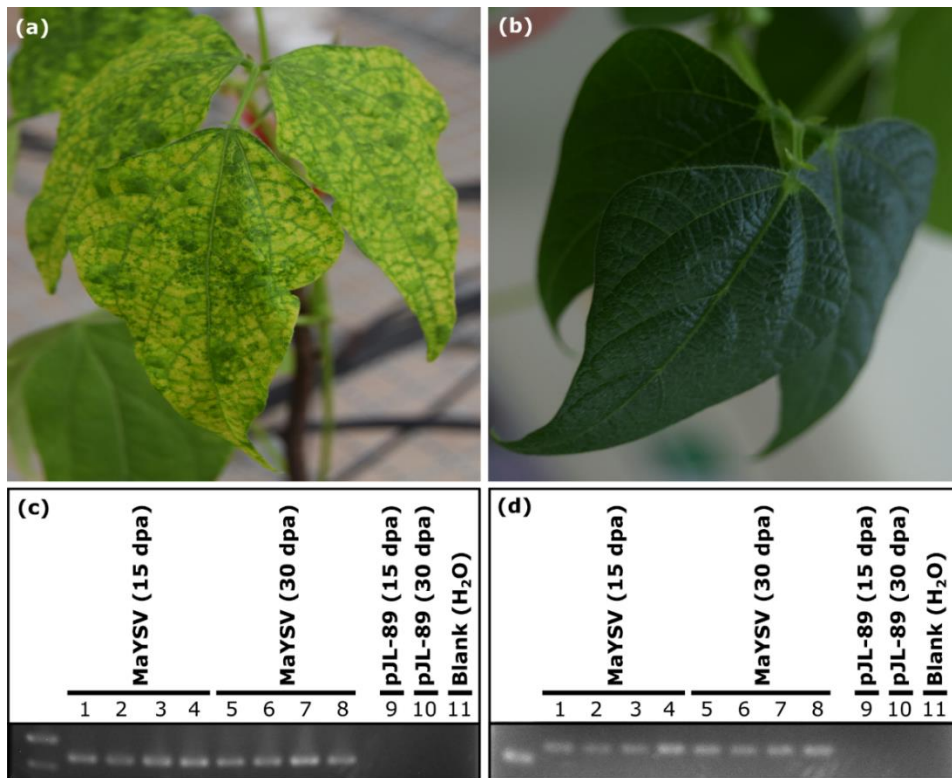




380

381 **Figura 2.** Padrão eletroforético das reações de digestão para confirmação da clonagem. (a)  
 382 Perfil da digestão do clone com *Bam*HI para o componente DNA-A de MaYSV (b) Perfil da  
 383 digestão do clone com *Spe*I para o componente DNA-B de MaYSV.

384



385

386

387 **Figura 3.** Teste de agroinfiltração usando o clone infeccioso de MaYSV. (a) feijão comum cv.  
 388 'Pérola' exibindo sintomas de mosaico dourado; (b) planta controle assintomática; (c) detecção  
 389 do DNA-A de MaYSV a partir de plantas sintomáticas 15 daa (linhas 1-4) e 30 daa (linhas 5-  
 390 8); nenhum fragmento de amplificação foi observado nas plantas controle (linhas 9 e 10); (d)  
 391 detecção do DNA-B de MaYSV a partir de plantas sintomáticas 15 daa (linhas 1-4) e 30 daa  
 392 (linhas 5-8); nenhum fragmento de amplificação foi observado nas plantas controle (linhas 9 e  
 393 10).

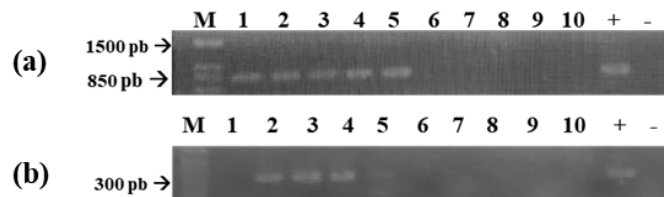


394

395

396 **Figura 4.** Sintomas observados em plantas de *P. vulgaris* agroinoculadas com o clone  
 397 infeccioso de MaYSV. (a) feijão comum cv. 'Pérola' exibindo sintomas de mosaico e  
 398 subdesenvolvimento; (b) planta controle assintomática.

399



400

401

402 **Figura 5.** Padrão eletroforético em gel de agarose (1%) da confirmação da infecção viral via  
 403 PCR em plantas de *N. benthamiana*. **M**, marcador de comprimento ("1Kb plus DNA ladder");  
 404 **(a) 1-5**, detecção do DNA-A de MaYSV; **6-10**, plantas controle (pJL-89); **(+)**, controle positivo;  
 405 **(-)**, controle H<sub>2</sub>O; **(b) 1-5**, detecção do DNA-B de MaYSV; **6-10**, plantas controle (pJL-89);  
 406 **(+)**, controle positivo; **(-)**, controle H<sub>2</sub>O.

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416 **4.6 REFERÊNCIAS**

417

418

419 AMARAKOON, I. I. et al. Molecular and biological characterization of *Macropodium yellow*  
420 *mosaic virus* from Jamaica. **Plant Pathology**, v. 57, n. 3, p. 417-426, 2008.

421

422

423 BANG, B. et al. A Rapid and Efficient Method for Construction of an Infectious Clone of  
424 *Tomato yellow leaf curl virus*. **Plant Pathol. J.**, v. 30, p. 310-315, 2014.

425

426

427 BIJORA, T.; BLAWID, R.; COSTA, D.T.; ARAGÃO, F.J.L.; SOUTO, E.R.; NAGATA, T.  
428 Construction of an agroinfectious clone of bean rugose mosaic virus using Gibson Assembly.  
429 **Virus Genes**, p. 495–499, 2017.

430

431

432 BLAWID, R.; NAGATA, T. Construction of an infectious clone of a plant RNA virus in a  
433 binary vector using one-step Gibson Assembly. **Journal of Virological Methods**, p. 11–15,  
434 2015.

435

436

437 BORDAT, A.; HOUVENAGHEL, M.C.; RETANA, S.G. Gibson assembly: an easy way to  
438 clone potyviral full-length infectious cDNA clones expressing an ectopic  
439 VPg. **Virology Journal**, p. 12:89, 2015.

440

441

442 BRACERO, V.; RIVERA, L.; BEAVER, J. DNA analysis confirms *Macropodium lathyroides*  
443 as alternative host of *Bean golden yellow mosaic virus*. **Plant Disease**, v. 87, n. 9, p. 1022-  
444 1025, 2003.

445

446

447 BROWN, J.K., et al. Family Geminiviridae. In: King A.M.Q, Adams M.J., Carstens E.B.,  
448 Lefkowitz E.J. (eds) *Virus Taxonomy 9th Report of the International Committee on*  
449 *Taxonomy of Viruses*. **Elsevier Academic Press**, p. 351-373, 2012.

450

451

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

454

455

456 BURAGOHAİN, A.K. et al. The infectivity of dimeric potato yellow mosaic geminivirus  
457 clones in different hosts. **J Gen Virol.**, v. 75, p. 2857-2861, 1994.

458

459

460 CALEGARIO, R.F. et al. Characterization of *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), a novel  
461 tomato-infecting begomovirus from Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p.  
462 1335-1343, 2007.

463

464

- 465 CARVALHO, S.L. et al. Construction of a full-length infectious cDNA clone of *Cowpea*  
466 *mild mottle virus*. **Virus Genes**, p. 137–140, 2017.  
467  
468
- 469 COCO, D. et al. Soybean chlorotic spot virus, a novel begomovirus infecting soybean in  
470 Brazil. **Archives of Virology**, v. 158, p. 457-462, 2013.  
471  
472
- 473 COSTA, A.S. Whitefly-transmitted plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v.  
474 14, p. 429-440, 1976.  
475  
476
- 477 DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf  
478 tissue. **Phytochemical Bulletin.**, v. 19, p. 11-15, 1987.  
479  
480
- 481 FARIA, J.C.; MAXWELL, D.P. Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus*  
482 spp. in Brazil. **Phytopathology**, v. 89, p. 262-268, 1999.  
483  
484
- 485 FARIA, J.C. et al. Situação atual das geminiviroses no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**,  
486 Brasília, v. 25, p. 125-137, 2000.  
487  
488
- 489 FERNANDES, F.R. Three distinct begomoviruses associated with soybean in central Brazil.  
490 **Archives of Virology**, v. 154, p. 1567–1570, 2009.  
491  
492
- 493 FERNANDES, J.J. et al. Biological and molecular properties of *Tomato rugose mosaic virus*  
494 (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. **Plant Pathology**, v. 55, p.513-  
495 522, 2006.  
496  
497
- 498 FERNANDES-ACIOLI, N.A.N. et al. First report of *Sida micrantha mosaic virus* in  
499 *Phaseolus vulgaris* in Brazil. **Plant Disease**, v. 95, p.1196, 2011.  
500  
501
- 502 FERREIRA, Pde.T.O. et al. One-step cloning approach for construction of agroinfectious  
503 begomovirus clones. **J. Virol. Methods.**, v. 147, p. 351-354, 2008.  
504  
505
- 506 FERREIRA, S.S. et al. Characterization of Passionfruit severe leaf distortion virus, a novel  
507 begomovirus infecting passionfruit in Brazil, reveals a close relationship with tomato-  
508 infecting begomoviruses. **Plant Pathology**, v. 59, p. 221–230, 2010.  
509  
510
- 511 FERRO, M.M.M. et al. New approach for the construction of infectious clones of a circular  
512 DNA plant virus using Gibson Assembly. **Journal of Virological Methods**, v. 263, p. 20–23,  
513 2019.  
514

- 515 FONTENELE, R.S. et al. First Report of *Macropodium yellow spot virus* in *Desmodium*  
516 *glabrum* in Brazil. **Plant Disease**, v. 100, p. 657, 2016.  
517
- 518 FONTENELLE, M.R. et al. Functional analysis of the naturally recombinant DNA-A of the  
519 bipartite begomovirus Tomato chlorotic mottle virus. **Virus research**, v. 126, p. 262-267,  
520 2007.  
521  
522
- 523 GALVÃO, R.M. et al. A naturally occurring recombinant DNA-A of a typical bipartite  
524 begomovirus does not require the cognate DNA-B to infect *Nicotiana benthamiana*  
525 systemically. *Journal of General Virology*, v. 84, p. 715-726, 2003.  
526  
527
- 528 GIBSON, G.D. et al. Chemical synthesis of the mouse mitochondrial genome. **Nat. Methods**,  
529 v. 11, p. 901-903, 2010.  
530  
531
- 532 GIBSON, G.D. et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases.  
533 **Nat. Methods**, p. 343-345, 2009.  
534  
535
- 536 HOU, Y.M., PAPLOMATAS, E.J., GILBERTSON, R.L. Host Adaptation and Replication  
537 Properties of Two Bipartite Geminiviruses and Their Pseudorecombinants. **Mol Plant**  
538 **Microbe Interact.**, v. 11, p. 208-217, 1998.  
539  
540
- 541 IDRIS, A.M. et al. Two newly described begomoviruses of *Macropodium lathyroides* and  
542 common bean. **Phytopathology**, v. 93, n. 7, p. 774-783, 2003.  
543  
544
- 545 INOUE-NAGATA, A.K.; LIMA, M.F.; GILBERTSON, R.L. A review of geminivirus  
546 (begomovirus) diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches  
547 for management. **Hortic. bras.**, v. 34, 18p., 2016.  
548  
549
- 550 KEARSE, M. et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform  
551 for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics.**, v. 28, p. 1647-1649,  
552 2012.  
553  
554
- 555 LINDBO, J. TRBO: A high-efficiency Tobacco mosaic virus RNA-based overexpression  
556 vector. **Plant Physiol.**, v. 145, p. 1232-1240, 2007.  
557  
558
- 559 LIMA, A.T.M. et al. Synonymous site variation due to recombination explains higher genetic  
560 variability in begomovirus populations infecting non-cultivated hosts. **Journal of General**  
561 **Virology**, v. 94, p. 418-431, 2013.  
562  
563
- 564 McALLASTER, M.R. et al. A unified approach towards *Trypanosoma brucei* functional  
565 genomics using Gibson assembly. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 210, p. 13-21, 2016.

- 566 MORALES, F.J. Distribution and dissemination of begomoviruses in Latin America and the  
567 Caribbean. In: *Bemisia* bionomics and management of global pest; Stansly PA & Naranjo SE  
568 (eds), pp: 283-318, 2010.  
569  
570
- 571 NAGATA, T., INOUE-NAGATA, A.K. Simplified Methods for the Construction of RNA  
572 and DNA Virus Infectious Clones. Plant Virology Protocols, **Methods Mol Biol.**, v. 1236, p.  
573 241-254, 2015.  
574  
575
- 576 NAVAS-CASTILLO, J. ELVIRA FIALLO-OLIVE, F.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S. Emerging  
577 Virus Diseases Transmitted by Whiteflies. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 49, p. 219–48, 2011.  
578  
579
- 580 RAMOS-SOBRINHO, R., et al. Contrasting genetic structure between two begomoviruses  
581 infecting the same leguminous Hosts. **Journal of General Virology**, v. 95, p. 2540–2552,  
582 2014.  
583  
584
- 585 RIBEIRO, S.G. et al. Molecular and biological characterization of *Tomato chlorotic mottle*  
586 *virus* suggests that recombination underlines the evolution and diversity of Brazilian tomato  
587 begomoviruses. **Pytopatology**, v.97, p. 702-711, 2007.  
588  
589
- 590 ROJAS, M.R. et al. Exploiting chinks in the plant’s armor: evolution and emergence of  
591 geminiviruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 361–394, 2005.  
592  
593
- 594 SIRIDECHADILOK, B. et al. A simplified positive-sense-RNA virus construction approach  
595 that enhances analysis throughput. **J. Virol.**, v. 23, p. 12667-12674, 2013.  
596  
597
- 598 SILVA, S.J.C. et al. Species diversity, phylogeny and genetic variability of begomovirus  
599 populations infecting leguminous weeds in northeastern Brazil. **Plant Pathology**, v. 61, p.  
600 457–467, 2012.  
601  
602
- 603 STENGER, D.C. et al. Replicational release of geminivirus genomes from tandemly repeated  
604 copies: Evidence for rolling-circle replication of a plant viral DNA. **Proceedings of the**  
605 **National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 8029-8033, 1991.  
606  
607
- 608 SUHARDIMAN, M. et al. Generation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus  
609 by in vitro assembly of viral genomic cDNA fragments. **Virus Res.**, v. 195, p. 1–8, 2015.  
610  
611
- 612 VANDERGAAST, R. Generation of west nile virus infectious clones containing amino Acid  
613 insertions between capsid and capsid anchor. **Viruses**, v. 6, p. 1637–53, 2014.  
614  
615

- 616 VARSANI, A. et al. Establishment of three new genera in the family Geminiviridae:  
617 Becurtovirus, Eragrovirus and Turncurtovirus. **Archives of Virology**, Springer Vienna, v.  
618 159, p. 2193-2203, 2014.  
619  
620  
621 VARSANI, A. et al. *Capulavirus* and *Grablovirus*: two new genera in the family  
622 *Geminiviridae*. **Archives of Virology**, p. 1-13, 2017.  
623  
624  
625 WETZEL, V. et al. Production of a *Beet chlorosis virus* full-length cDNA clone by means of  
626 Gibson assembly and analysis of biological properties. *Journal of General Virology*, v. 99, p.  
627 1522-1527, 2018.  
628  
629  
630 WU, C.Y. et al. A simplified method of constructing infectious clones of begomovirus  
631 employing limited restriction enzyme digestion of product of rolling circle amplification. **J.**  
632 **Virol. Methods**, v.147, p. 355-359, 2008.  
633  
634  
635 ZERBINI, F.M. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae. **Journal of General**  
636 **Virology**, v. 98, p. 131-133, 2017.  
637  
638  
639  
640  
641  
642  
643  
644  
645  
646